



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

DINÁMICA MICROBIANA Y FLUJO DE NUTRIENTES EN UN
SISTEMA ACUÍCOLA DE INTEGRACIÓN MULTITRÓFICA:
CAMARÓN, OSTIÓN Y MACROALGA.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Acuicultura)

P r e s e n t a

Alexia Omont

La Paz, Baja California Sur, enero de 2022.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 09 horas del día 14 del Mes de diciembre del 2021, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

" **DINÁMICA MICROBIANA Y FLUJO DE NUTRIENTES EN UN SISTEMA ACUÍCOLA DE INTEGRACIÓN MULTITRÓFICA: CAMARÓN, OSTIÓN Y MACROALGA** "

Presentada por la alumna:

Alexia Morgane Omont

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Acuicultura**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Alberto Peña Rodríguez
Co-Director de Tesis



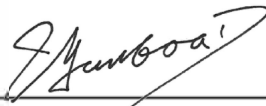
Dr. Francisco Javier Magallón Barajas
Co-Director de Tesis



Dra. Regina Elizondo González
Co-Tutora



Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Co-Tutora



Dr. Julián Gamboa Delgado
Co-Tutor



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

La Paz, Baja California Sur, a 10 de enero de 2022

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante ALEXIA MORGANE OMONT del Programa de Doctorado en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio: Ithenticate
- Filtros utilizados: Citas excluidas, Bibliografía excluida
- Porcentajes de similitud: 13%
Se muestra captura de pantalla



Preguntas	
Citas excluidas	13%
Bibliografía excluida	SIMILAR
Resumen de Coincidencias	
1	Internet 688 palabras eprints.uanl.mx 2%
2	Internet 281 palabras Copiado el 21-Jul-2020 cibnor.repositorioinstitucional.mx 1%
3	Internet 212 palabras Copiado el 18-Nov-2020 aprenderfy.com <1%
4	Crossref 185 palabras Alexia Omont, Regina Elizondo-González, Eduardo Quiroz-Guzmán, Cristina Escobedo-Fregoso et al. "Digestive micr <1%
5	Crossref 179 palabras Alexia Omont, Regina Elizondo-González, Cristina Escobedo-Fregoso, Daniel Tovar-Ramírez et al. "Bacterial commun <1%
6	Internet 163 palabras hdl.handle.net <1%
7	Internet 161 palabras Copiado el 25-Oct-2020 www.scielo.org.mx <1%

Firmas del comité



Dr. Alberto Peña Rodríguez



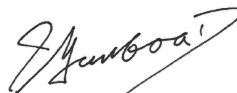
Dr. Francisco Magallón Barajas



Dra. Regina Elizondo González



Dra. Cristina Escobedo Fregoso



Dr. Julián Gamboa Delgado

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Alberto Peña Rodríguez
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Co-Director de Tesis

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Co-Director de Tesis

Dra. Regina Elizondo González
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Co-Tutora de Tesis

Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Co-Tutora de Tesis

Dr. Julián Gamboa Delgado
Universidad Autónoma de Nuevo León
Co-Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Alberto Peña Rodríguez
Dr. Francisco Javier Magallón Barajas
Dra. Regina Elizondo González
Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Dr. Julián Gamboa Delgado

Jurado de Examen

Dr. Alberto Peña Rodríguez
Dr. Francisco Javier Magallón Barajas
Dra. Regina Elizondo González
Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Dr. Julián Gamboa Delgado

Suplentes

Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra
Dr. Dariel Tovar Ramírez

Resumen

Los sistemas de monocultivo de camarón presentan grandes retos para continuar con su crecimiento sostenido, en parte debido a la dependencia de harina de pescado, la contaminación de las aguas costeras por las aguas residuales y los brotes de enfermedades emergentes. El desarrollo de sistemas acuícolas de integración multitrófica (IMTA, por sus siglas en inglés) representa una alternativa para el desarrollo de una acuicultura productiva y sostenible en México y el mundo. El principio radica en convertir los “desechos” de una especie que requiere ser alimentada con alimentos balanceados, en activos útiles para otras especies llamadas “filtrantes” de materia orgánica (p. ej. *Crassostrea gigas*) e inorgánica (p. ej. *Ulva lactuca*), lo que ofrece mayor bioseguridad, diversificación de productos y bajo impacto ambiental. Por otro lado, el uso de ingredientes funcionales a base de macroalga como nueva fuente de proteína es una de las propuestas de la industria de alimentos acuícolas para sustituir la harina de pescado en los alimentos balanceados. Este proyecto de tesis se centró en desarrollar, optimizar y evaluar un sistema IMTA con *P. vannamei*, *C. gigas* y *Ulva sp.* con la finalidad de mejorar la productividad, eficientizar el uso de nutrientes y mejorar el control microbiológico, respecto a sistemas tradicionales de monocultivo. El sistema IMTA permitió una eficiencia de retención de nitrógeno y fósforo de 82% y 59.6% respectivamente, con un aumento de 34% en el crecimiento del camarón respecto al monocultivo y una diversificación de la producción con ostiones y macroalga; mientras el sistema de monocultivo de camarón retiene solamente 37% de nitrógeno y 13% de fósforo en la biomasa producida. De la biomasa generada de macroalga, se realizó una predigestión química, enzimática y biológica para producir detritos, los cuales se lograron incorporar al 20% como sustituto parcial de la harina de pescado en el alimento balanceado para camarón sin afectar el rendimiento productivo del camarón. La inclusión de este alimento en el sistema IMTA resultó en una mejora en el aprovechamiento de los nutrientes (90.3% del nitrógeno y 78% del fosforo) principalmente a favor de una mayor biomasa de macroalga. Finalmente, con el nuevo alimento y el cultivo integrado, se observó una modulación de la actividad digestiva de los organismos asociada a cambios significativos en su microbiota digestiva. En términos de control microbiológico, el sistema IMTA permitió reducir la abundancia relativa de *Vibrionaceae* en el tracto digestivo de los camarones y en la glándula digestiva de los ostiones, así como en camarones alimentados con los detritos de *U. lactuca*. Adicionalmente el alimento con inclusión de detritos de *U. lactuca* mejoró la resistencia hasta 7 días post-infección en el camarón contra el virus de la mancha blanca. Con estos resultados se demuestra la efectividad de los sistemas IMTA para enfrentar los desafíos de la acuicultura y seguir con el crecimiento continuo de la actividad para garantizar la seguridad alimentaria mundial.

Palabras claves: Acuicultura sustentable, Detrito, *Penaeus vannamei*, *Crassostrea gigas*, *Ulva lactuca*

<https://orcid.org/0000-0002-4337-3128>

Vo.Bo. Co-Directores de Tesis



Dr. Alberto Peña Rodríguez



Dr. Francisco Javier Magallón Barajas

Summary

Shrimp monoculture systems present great challenges to continue their sustained growth, in part due to dependence on fishmeal, to pollution of coastal waters by sewage, and to outbreaks of emerging diseases. The development of integrated multitrophic aquaculture systems (IMTA) represents an alternative for the development of a productive and sustainable aquaculture in Mexico and the world. The principle lies in converting the "waste" of a species that needs to be fed with balanced food, into useful assets for other species called "filtering" of organic matter (e.g., *Crassostrea gigas*) and inorganic (e.g., *Ulva lactuca*), offering greater biosecurity, product diversification and low environmental impact. On the other hand, the use of functional ingredients based on macroalgae as a new source of protein is one of the proposals of the aquaculture industry to replace fishmeal in diets. This PhD project focused on developing, optimizing and evaluating an IMTA system with *P. vannamei*, *C. gigas* and *Ulva* sp. in order to improve productivity, to make the use of nutrients more efficient and to improve microbiological control, compared to traditional monoculture systems. The IMTA system allowed an efficiency of nitrogen and phosphorus retention of 82% and 59.6% respectively, with an increase in shrimp growth by 34% compared to monoculture and a diversification of the production with oysters and macroalgae; while the shrimp monoculture system retains only 37% nitrogen and 13% phosphorus in the biomass produced. From the biomass generated from macroalgae, a chemical, enzymatic and biological predigestion was carried out to produce detritus, which was able to incorporate 20% as a partial substitute for fish meal in the balanced feed for shrimp, without affecting the productive performance of the shrimp. The inclusion of this food in the IMTA system resulted in an improvement in the use of nutrients (90.3% of nitrogen and 78% of phosphorus) mainly in favour of a greater macroalgae biomass. Finally, with the new diet and the integrated culture, a modulation of the digestive activity of the organisms associated with significant changes in their digestive microbiota was observed. In terms of microbiological control, the IMTA system made it possible to reduce the relative abundance of *Vibrionaceae* in the digestive tract of shrimp and in the digestive gland of oysters, as well as in shrimp fed with *U. lactuca* detritus. Additionally, the feed with the inclusion of *U. lactuca* detritus improved the resistance up to 7 days post-infection in the shrimp against the white spot syndrome virus. These results demonstrate the effectiveness of IMTA systems to face the challenges of aquaculture and pursue with the continuous growth of the activity to guarantee world food security.

Keywords: Sustainable aquaculture, Detritus, *Penaeus vannamei*, *Crassostrea gigas*, *Ulva lactuca*

<https://orcid.org/0000-0002-4337-3128>

Vo.Bo. Co-Directores de Tesis



Dr. Alberto Peña Rodríguez



Dr. Francisco Javier Magallón Barajas

Dedicatoria

Je dédie ce travail à :

Mon Pou, le 1^{er} homme de ma vie et ma maman. Il y a plus de 13 ans que vous m'avez laissé à l'aéroport pour poursuivre mes études, plus de 13 ans que nous vivons à plus de 10000 km de distance, que nous nous voyons seulement quelques semaines tous les 2 ou 3 ans. C'est aussi grâce à vous qu'aujourd'hui j'en suis là, professionnellement et personnellement. Merci pour votre soutien. Je vous aime !

Mi topo hermoso, le 2^e homme de ma vie. Mon futur époux. La dernière personne à laquelle je m'attendais rencontrer en venant vivre au Mexique ; et la dernière chose que je pensais faire : me marier. La personne la plus censée, intelligente, amusante et merveilleuse que je connaisse. Dr. Milton Spanopoulos Zarco, j'espère continuer à écrire de nombreux articles avec toi mais surtout continuer à construire le reste de notre vie ensemble. Je t'aime !

Mon jumo, le 3^e homme de ma vie. Mon meilleur ami, le soi-disant petit ange blond complètement taré avec lequel j'ai partagé mes joies, mes peines et surtout mes flemmes et mes conneries pendant les 25 dernières années de ma vie, en espérant que ça continue. Je suis docteur maintenant, j'ai rempli ma part du marché. J'attends donc l'île déserte que tu m'as promise il y a des années pour faire mes expériences folles. Tu pues !

Moumoune, rebaptisé Chamoy par les mexicains. Mon petit compagnon de vie de ces 10 dernières années, qui a été là pour moi pendant mes nombreux moments de solitude et qui est parti trop tôt. Le meilleur chat du monde. Mon gatito panzón, tes ronronnements me manquent.

Mis peludos y plumíferos rescatados, ceux qui m'attendent pour traverser le fleuve et arriver au Mictlán et ceux qui m'accompagnent encore aujourd'hui, qui me reçoivent toujours avec leur bonne humeur. Quand je serai chercheuse, je vous promets que tous les soirs il y aura des saucisses pour le dîner.

Mes amis, tous mes amis. Les anciens, avant de partir, qui m'ont boosté pour faire le pas. Les nouveaux, que j'ai rencontré durant ces 4 dernières années, qui m'ont accueillie à bras ouverts, conseillé, aidé, montré leur pays, leur culture et m'ont offert une nouvelle famille, loin de chez moi. La liste est longue donc je ne la ferai pas, mais si tu t'es fait chier à lire cette partie c'est que tu fais clairement partie de cette liste. Merci!

Agradecimientos

Primero que nada, quiero agradecer al Dr. Alberto Peña Rodríguez por ser el mejor director de tesis de todo el CIBNOR, por arriesgarse en aceptarme como su primer estudiante de doctorado, ya que ni siquiera hablaba bien español. También por ser una persona tan humana y comprensible en los momentos más difíciles. No lo hubiera logrado igual con otro director y no hubiera disfrutado tanto estos 4 años de doctorado. ¡Muchas gracias!

También quiero agradecer a los miembros de mi comité tutorial: Dr. Francisco Magallón Barajas, Dra. Regina Elizondo González, Dra. Cristina Escobedo Fregoso, Dr. Julián Gamboa Delgado por su apoyo valioso en las diferentes etapas del doctorado y por compartir sus conocimientos conmigo.

Agradezco a las empresas Larvas Gran Mar y Marimex del Pacífico por las donaciones de organismos. Le envío igualmente miles de gracias al personal del CIBNOR que me ayudó a realizar esta tesis, y en particular a Gabriela Mendoza Carrión, Roberto Hernández-Herrera, Pablo Molsalvo Spencer, Sindi Areli Juan Antúnez, María Dolores Rondero Astorga, Sandra De La Paz Reyes, Gabriel Robles Villegas, Ernesto Goytortua Bores, José Luís Ramírez Arce. Gracias a ustedes por su acompañamiento y su amabilidad en todos los momentos que invadí los laboratorios que tienen a cargo. Agradezco también al personal de la unidad de Hermosillo, especialmente al Dr. José Arturo Sánchez Paz, Fernando Mendoza-Cano y Trinidad Encinas. Gracias por recibirme, ayudarme y hacer que mi estancia pasó excelente.

Gracias al equipo del Fish and Culture Laboratory de la Tokyo University of Marine Science and Technology (TUMSAT, Tokio, Japón) por recibirme y compartir sus espacios durante mi estancia. En particular, gracias al Dr. Masato Endo, la Dra. Ayako Matsui y a sus estudiantes.

Agradezco al CIBNOR las becas institucionales #808 y #809 y CONACyT por la beca nacional 894930. En especial quiero agradecer a la Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro por todo lo que hizo para que la estancia de los estudiantes en el CIBNOR sea más agradable (ante y post-Covid-19) y a Tania Verónica Núñez Valdez, Osvelia Ibarra Morales, Leticia González Rubio Rivera y Horacio Sandoval Gómez, por siempre estar disponibles para nosotros en los momentos de pánico que acompañan los trámites administrativos.

Por fin, quiero volver a agradecer a mis amigos y familia por su soporte estos últimos años. Unos están lejos, muy lejos, y otros cerca, pero pienso en ustedes en cada momento. ¡Gracias por hacerme feliz!

¡Gracias a todos!

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido.....	v
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Producción acuícola en México.....	4
2.1.1 Cultivo de camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i>	4
2.1.2 Cultivo del ostión <i>Crassostrea gigas</i>	6
2.1.3 Cultivo de macroalgas	8
2.2 Retos de la acuicultura	10
2.2.1 Aguas residuales.....	10
2.2.2 Control microbiológico	12
2.2.3 Alimentos funcionales	14
2.3 Sistemas acuícolas de integración multitrófica (IMTA).....	17
2.3.1 Cultivos multitróficos para el manejo de la calidad del agua	18
2.3.2 Cultivos multitróficos para el control microbiológico.....	20
2.3.3 Productividad de los cultivos multitróficos	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVOS	25
5.1 Objetivo general	25
5.2 Objetivos particulares	25
6. MATERIAL Y MÉTODOS	26
6.1 Objetivo 1: Evaluar la capacidad del ostión y las macroalgas para la remoción de nutrientes en el agua residual de cultivo híper-intensivo de camarón	26
6.1.1 Ensayo 1: Capacidad del ostión para la remoción de los nutrientes en un sistema IMTA ostión-camarón y efecto en la microbiota digestiva de ambas especies	26
6.1.1.1 Sistemas experimentales	26
6.1.1.2 Agua residual.....	27
6.1.1.3 Parámetros zootécnicos.....	28
6.1.1.4 Comunidades bacterianas digestivas	28
6.1.1.5 Predicción funcional de bacterias	30
6.1.1.6 Análisis de los datos	30
6.1.2 Ensayo 2: Capacidad de las macroalgas para la remoción de los nutrientes del agua residual de cultivo híper-intensivo de camarón	30
6.1.2.1 Sistemas experimentales	30
6.1.2.2 Agua residual y crecimiento de las macroalgas	32
6.1.2.3 Análisis de los datos	32

6.2 Objetivo 2: Evaluar el uso de detritos de macroalga como alimento para camarón y ostión.....	32
6.2.1 Ensayo 1: Crecimiento, actividad digestiva y microbiota intestinal de <i>P. vannamei</i> alimentado con detritos de <i>Ulva lactuca</i> como ingrediente funcional	32
6.2.1.1 Producción de los detritos de <i>Ulva lactuca</i>	32
6.2.1.2 Formulación y evaluación de los alimentos experimentales	33
6.2.1.3 Ensayo de alimentación	34
6.2.1.4 Parámetros zootécnicos	35
6.2.1.5 Actividad enzimática digestiva	35
6.2.1.6 Comunidades bacterianas digestivas	36
6.2.1.7 Predicción funcional de bacterias	37
6.2.1.8 Análisis de los datos	37
6.2.2 Ensayo 2: Contribución nutricional de los detritos de <i>U. lactuca</i> en el crecimiento y la actividad digestiva de <i>C. gigas</i>	37
6.2.2.1 Producción de los detritos de <i>Ulva lactuca</i>	37
6.2.2.2 Diseño y evaluación de los regímenes de alimentación experimentales	38
6.2.2.3 Ensayo de alimentación	38
6.2.2.4 Parámetros zootécnicos	39
6.2.2.5 Isótopos estables, contribución de los nutrientes en el crecimiento y tiempos de residencia elemental en los tejidos.....	39
6.2.2.6 Actividad enzimática digestiva	41
6.2.2.7 Análisis de los datos	42
6.3 Objetivo 3: Evaluar el efecto antiviral de la macroalga en el sistema IMTA contra el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV).....	42
6.3.1 Producción de los detritos y formulación de los alimentos experimentales.....	42
6.3.2 Ensayo de alimentación.....	43
6.3.3 Reto infeccioso	44
6.3.4 Supervivencia, resistencia, parámetros fisiológicos y replicación viral	45
6.3.5 Análisis de los datos	45
6.4 Objetivo 4: Evaluar la productividad y la dinámica de flujo de nutrientes del sistema de cultivo integrado multitrófico IMTA.....	46
6.4.1 Producción de los detritos y formulación de los alimentos experimentales.....	46
6.4.2 Sistemas experimentales	47
6.4.3 Agua residual	50
6.4.4 Productividad.....	50
6.4.5 Análisis de los datos	50
7. RESULTADOS	51
7.1 Objetivo 1: Evaluar la capacidad del ostión y las macroalgas para la remoción de nutrientes en el agua residual de cultivo híper-intensivo de camarón	51
7.1.1 Ensayo 1: Capacidad del ostión para la remoción de los nutrientes en un sistema IMTA ostión-camarón y efecto en la microbiota digestiva de ambas especies	51
7.1.1.1 Calidad del agua	51
7.1.1.2 Parámetros zootécnicos.....	54
7.1.1.3 Comunidades bacterianas digestivas.....	55

7.1.1.4 Predicción funcional de comunidades bacterianas.	58
7.1.2 Ensayo 2: Capacidad de las macroalgas para la remoción de los nutrientes del agua residual de cultivo híper-intensivo de camarón	63
7.1.2.1 Calidad del agua	63
7.1.2.2 Crecimiento de las macroalgas	64
7.2 Objetivo 2: Evaluar el uso de detritos de macroalga como alimento para camarón y ostión.....	65
7.2.1 Ensayo 1: Crecimiento, actividad digestiva y microbiota intestinal de <i>P. vannamei</i> alimentado con detritos de <i>Ulva lactuca</i> como ingrediente funcional	65
7.2.1.1 Composición proximal de los detritos de <i>U. lactuca</i> y de los alimentos	65
7.2.1.2 Parámetros zootécnicos.....	66
7.2.1.3 Actividad enzimática digestiva.....	66
7.2.1.4 Comunidades bacterianas digestivas.....	67
7.2.1.5 Predicción funcional de comunidades bacterianas.	71
7.2.2 Ensayo 2: Contribución nutricional de los detritos de <i>U. lactuca</i> en el crecimiento, la actividad digestiva y la microbiota intestinal de <i>C. gigas</i>	74
7.2.2.1 Estructura y composición proximal de los detritos y de la microalga	74
7.2.2.2 Parámetros zootécnicos.....	75
7.2.2.3 Contribución de los nutrientes en el crecimiento y tiempos de residencia elemental en los tejidos.	76
7.2.2.4 Actividad enzimática digestiva.....	79
7.3 Objetivo 3: Evaluar el efecto antiviral de la macroalga en el sistema IMTA contra el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en el camarón.....	80
7.3.1 Composición proximal de los detritos y de los alimentos experimentales.....	80
7.3.2 Supervivencia y resistencia a WSSV.....	81
7.3.3 Parámetros fisiológicos en hemolinfa	83
7.4 Objetivo 4: Evaluar la productividad y la dinámica de flujo de nutrientes del sistema de cultivo integrado multitrófico IMTA.....	84
7.4.1 Parámetros zootécnicos y crecimiento del alga	84
7.4.2 Calidad del agua	86
7.4.3 Flujo de nutrientes	88
8. DISCUSIÓN	91
8.1 Biorremediación de los nutrientes en sistemas IMTA	91
8.1.1 Capacidad de <i>C. gigas</i> en la biorremediación del agua en un sistema IMTA camarón-ostión.....	91
8.1.2 Capacidad de las macroalgas en la biorremediación del agua residual de camarón ...	92
8.1.3 Biorremediación del agua en un sistema IMTA con <i>P. vannamei</i> , <i>C. gigas</i> y <i>U. lactuca</i>	93
8.2 Productividad en sistemas IMTA.....	95
8.2.1 Productividad en el sistema IMTA camarón-ostión	95
8.2.2 Productividad de las macroalgas cultivadas con agua residual de camarón.....	97
8.2.3 Productividad de <i>P. vannamei</i> , <i>C. gigas</i> y <i>U. lactuca</i> en un sistema IMTA	98
8.3 Interés de los detritos de <i>U. lactuca</i> como ingrediente funcional en la alimentación del camarón y del ostión.....	100

8.3.1 Detritos de macroalga <i>U. lactuca</i> e interés para su uso en la alimentación del camarón y del ostión.....	100
8.3.2 Productividad de los camarones y ostiones alimentados con detritos	103
8.3.2.1 Productividad de los camarones alimentados con detritos.....	103
8.3.2.2 Productividad de los ostiones alimentados con detritos.....	104
8.3.2.3 Productividad de <i>P. vannamei</i> y <i>C. gigas</i> alimentados con detritos y <i>U. lactuca</i> en un sistema IMTA.....	108
8.3.3 Actividad enzimática digestiva de los ostiones y camarones alimentados con detritos.....	109
8.3.3.1 Actividad enzimática digestiva de los camarones alimentados con detritos	109
8.3.3.2 Actividad enzimática digestiva de los ostiones alimentados con detritos	111
8.3.4 Control microbiológico en los camarones y ostiones alimentados con detritos	113
8.3.4.1 Comunidades bacterianas digestivas de <i>P. vannamei</i> alimentados con detritos.....	113
8.3.4.2 Efecto antiviral de los detritos contra el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV).....	116
8.4 Dinámica microbiana en sistemas IMTA	119
8.4.1 Comunidades bacterianas en el agua de un sistema IMTA camarón-ostión.....	119
8.4.2 Comunidades bacterianas digestivas de <i>P. vannamei</i> y <i>C. gigas</i> en un sistema IMTA camarón-ostión	121
8.5 Flujo de nutrientes en sistemas IMTA e importancia económica.....	125
9. CONCLUSIONES	128
10. LITERATURA CITADA	131
11. ANEXOS	157
Anexo 1: Omont, A., Elizondo-González, R., Quiroz-Guzmán, E., Escobedo-Fregoso, C., Hernández-Herrera, R., Peña-Rodríguez, A. (2020). Digestive microbiota of shrimp <i>Penaeus vannamei</i> and oyster <i>Crassostrea gigas</i> co-cultured in integrated multi-trophic aquaculture system. <i>Aquaculture</i> , 521, 735059.	157
Anexo 2: Omont, A., Elizondo-González, R., Escobedo-Fregoso, C., Tovar-Ramírez, D., Hinojosa-Baltazar, P., Peña-Rodríguez, A. (2021). Bacterial communities and digestive enzymatic activities of <i>Litopenaeus vannamei</i> shrimp fed pre-digested seaweeds as a functional ingredient. <i>Journal of Applied Phycology</i> , 33(2), 1239-1251.	166
Anexo 3: Omont, A., Py, C., Gamboa-Delgado, J., Nolasco-Soria, H., Spanopoulos-Zarco, M., & Peña-Rodríguez, A. (2021). Nutritional contribution of seaweed <i>Ulva lactuca</i> single-cell detritus and microalgae <i>Chaetoceros calcitrans</i> to the growth of the Pacific oyster <i>Crassostrea gigas</i> . <i>Aquaculture</i> , 541, 736835.	180

Lista de figuras

Figura 1. Producción acuícola, pecuaria y de harina de pescado de 1984 a 2003 (Allan, 2004)..	15
Figura 2. Diagrama de los sistemas experimentales IMTA con camarón y ostión	27
Figura 3. Diagrama de los sistemas experimentales IMTA con camarón y macroalgas <i>U. lactuca</i> y <i>U. clathrata</i>	31
Figura 4. Diagrama de los sistemas experimentales IMTA con camarón y ostión	49
Figura 5. Concentración en (A) amonio, (B) fosfato, (C) nitrito y (D) nitrato en el agua de los sistemas de monocultivo de camarón (CM), monocultivo de ostión (OM) y cocultivo (CO) durante 4 semanas de cultivo	51
Figura 6. Concentración en partículas sedimentables totales en el agua de los sistemas de monocultivo de camarón (CM), monocultivo de ostión (OM) y cocultivo (CO) después de 4 semanas de cultivo	52
Figura 7. (A) Valor promedio de unidades formadoras de colonia en agar marino 2216 (bacterias marinas heterotróficas) y (B) agar TCBS (<i>Vibrio</i> sp.) en el agua de sistemas de monocultivo de camarón (CM), monocultivo de ostión (OM) y cocultivo (CO) durante 4 semanas de cultivo.....	53
Figura 8. Proporción del tipo de colonia bacteriana del género <i>Vibrio</i> sp. en agar TCBS en el agua de sistemas de monocultivo de camarón (CM), monocultivo de ostión (OM) y cocultivo (CO) durante 4 semanas de cultivo	54
Figura 9. (A) α -diversidad y (B) análisis de componentes principales (ACP) en 2 dimensiones de la β -diversidad de las comunidades bacterianas en la glándula digestiva de <i>C. gigas</i> y en el intestino de <i>P. vannamei</i> cultivados 30 días en sistemas de monocultivo de ostión (OM), de camarón (CM) y de cocultivo (CO).	55
Figura 10. Abundancia relativa de los principales filos bacterianos en la glándula digestiva de <i>C. gigas</i> y en intestino de <i>P. vannamei</i> cultivados 30 días en sistemas de monocultivo de ostión (OM), de camarón (CM) y de cocultivo (CO).	56
Figura 11. (A) Abundancia relativa de <i>Alphaproteobacteria</i> y (B) <i>Gammaproteobacteria</i> en la glándula digestiva de <i>C. gigas</i> y en el intestino de <i>P. vannamei</i> cultivados 30 días en sistemas de monocultivo de ostión (OM), de camarón (CM) y de cocultivo (CO).....	57
Figura 12. Proporción de OTU (%) implicados en las predicciones funcionales del programa bioinformático PICRUSt de categorías KO de segundo nivel con relevancia biológica significativa de los datos metagenómicos (A) del intestino de <i>P. vannamei</i> y (B) de la glándula digestiva de <i>C. gigas</i> cultivados 30 días en sistemas de monocultivo de ostión (OM), de camarón (CM) y de cocultivo (CO)	61
Figura 13. Concentración en (A) amonio, (B) fosfato, (C) nitrito y (D) nitrato en el agua de un sistema de monocultivo de macroalgas <i>U. lactuca</i> y <i>U. clathrata</i> fertilizadas con medio f2 (AF) y de un sistema de cultivo de macroalgas en el agua residual de camarón (AR) durante 3 horas.	63
Figura 14. Peso final de <i>Ulva lactuca</i> y <i>Ulva clathrata</i> después de 7 días en los sistemas de monocultivo (AF) y cocultivo en el agua residual de camarón (AR).	64
Figura 15. Ganancia de peso (%) de <i>P. vannamei</i> alimentados durante 30 días con un alimento control con 0% de detritos (C) y alimentos con 10 y 20% de detritos de <i>U. lactuca</i> (DLac10 y DLac20).....	66
Figura 16. Actividad enzimática (U.mg ⁻¹ proteína) de la (A) tripsina, (B) quimotripsina, (C) lipasa y (D) amilasa en el hepatopáncreas de <i>P. vannamei</i> alimentados durante 30 días con un	

alimento control con 0% de detritos (C) y alimentos con 10 y 20% de detritos de <i>U. lactuca</i> (DLac10 y DLac20)	67
Figura 17. (A) α -diversidad y (B) análisis de componentes principales (ACP) en 3 dimensiones de β -diversidad en el intestino de <i>P. vannamei</i> alimentados durante 30 días con un alimento control con 0% de detritos (C) y alimentos con 10 y 20% de detritos de <i>U. lactuca</i> (DLac10 y DLac20)	68
Figura 18. Abundancia relativa de los principales filos bacterianos en el intestino de <i>P. vannamei</i> alimentados durante 30 días con un alimento control con 0% de detritos (C) y alimentos con 10 y 20% de detritos de <i>U. lactuca</i> (DLac10 y DLac20)	69
Figura 19. Abundancia relativa de las principales órdenes de <i>Gammaproteobacteria</i> en el intestino de <i>P. vannamei</i> alimentados durante 30 días con un alimento control con 0% de detritos (C) y alimentos con 10 y 20% de detritos de <i>U. lactuca</i> (DLac10 y DLac20)	70
Figura 20. Proporción de secuencias (%) implicadas en las predicciones funcionales del programa bioinformático PICRUSt de categorías KO de segundo nivel con relevancia biológica significativa de las comunidades bacterianas identificadas en el intestino de <i>P. vannamei</i> alimentado durante 30 días con un alimento control con 0% de detritos y alimentos con 10 y 20% de detritos de <i>U. lactuca</i>	72
Figura 21. Fotos de microscopía electrónica de (A) <i>Ulva lactuca</i> y (B) detrito <i>U. lactuca</i> . Las escalas están representadas en cada fotografía	74
Figura 22. Histograma de distribución del tamaño de partícula de los detritos de <i>U. lactuca</i>	74
Figura 23. Ganancia de peso seco GPS (%) de <i>C. gigas</i> alimentados durante 35 días con diferentes proporciones de detritos de <i>U. lactuca</i> como sustituto de microalga <i>C. calcitrans</i> .	75
Figura 24. Cambios en los valores de isótopos estables en nitrógeno provocados por la dieta de <i>C. gigas</i> alimentados con diferentes proporciones de detritos de <i>U. lactuca</i> como sustituto de microalga <i>C. calcitrans</i>	77
Figura 25. Actividad enzimática específica (U.mg ⁻¹ proteína) de proteasa, peptidasa, lipasa y amilasa en la glándula digestiva de <i>C. gigas</i> alimentados con detritos de <i>U. lactuca</i> como sustituto de microalga <i>C. calcitrans</i> en diferentes proporciones	80
Figura 26. Supervivencia de <i>P. vannamei</i> inyectados con una solución salina (C-) o con el virus de la mancha blanca WSSV previamente alimentados 7 días con dieta que incluyeron <i>Ulva lactuca</i> fresca (FLac) y alimentos con 20% de detritos de <i>U. lactuca</i> como sustituto de harina de pescado (DLac20) o alimento control (C+).	82
Figura 27. Concentración en proteínas en la hemolinfa de <i>P. vannamei</i> inyectados con una solución salina (C-) o con el virus de la mancha blanca WSSV previamente alimentados 7 días con dieta que incluyeron <i>Ulva lactuca</i> fresca (FLac) y alimentos con 20% de detritos de <i>U. lactuca</i> como sustituto de harina de pescado (DLac20) o alimento control (C+).....	83
Figura 28. Concentración en (A) lactato, (B) glucosa, (C) colesterol y (D) triglicéridos en la hemolinfa de <i>P. vannamei</i> inyectados con una solución salina (C-) o con el virus de la mancha blanca (WSSV) previamente alimentados durante 7 días con dieta que incluyeron <i>Ulva lactuca</i> fresca (FLac) y alimentos con 20% de detritos de <i>U. lactuca</i> como sustituto de harina de pescado (DLac20) o alimento control (C+).	84
Figura 29. Peso semanal de (A) <i>P. vannamei</i> , (B) <i>C. gigas</i> y (C) biomasa semanal de <i>U. lactuca</i> cultivados 6 semanas en un sistema de integración multitrófica (IMTA), en un sistema IMTA con	

detritos como fuente de alimento para el camarón y el ostión (IMTA-D) y en sus sistemas respectivos de monocultivo (C).....	86
Figura 30. Concentración en (A) amonio, (B) fosfato, (C) nitrito y (D) nitrato en el agua de un sistema de integración multitrófica con <i>P. vannamei</i> , <i>C. gigas</i> y <i>U. lactuca</i> (IMTA), de un sistema IMTA con detritos como fuente de alimento para el camarón y el ostión (IMTA-D) y en un sistema de monocultivo de camarón (C)	87
Figura 31. Concentración de partículas sedimentables totales en el agua de un sistema de integración multitrófica con <i>P. vannamei</i> , <i>C. gigas</i> y <i>U. lactuca</i> (IMTA), de un sistema IMTA con detritos como fuente de alimento para el camarón y el ostión (IMTA-D) y en un sistema de monocultivo de camarón (C).....	88
Figura 32. Flujo de nitrógeno (N) y fósforo (P) en sistemas acuícolas de monocultivo de <i>P. vannamei</i> , <i>C. gigas</i> y <i>U. lactuca</i>	89
Figura 33. Flujo de nitrógeno (N) y fósforo (P) en un sistema de integración multitrófica con <i>P. vannamei</i> , <i>C. gigas</i> y <i>U. lactuca</i>	89
Figura 34. Flujo de nitrógeno (N) y fósforo (P) en un sistema de integración multitrófica con <i>P. vannamei</i> , <i>C. gigas</i> y <i>U. lactuca</i> utilizando los detritos de <i>U. lactuca</i> como fuente de proteína para el camarón y el ostión	90

Lista de tablas

Tabla 1. Requerimientos nutricionales del camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i>	6
Tabla 2. Composición bromatológica (% de materia seca) de macroalgas del género <i>Ulva</i> , extraídas del medio natural y cultivadas (Peña-Rodríguez <i>et al.</i> , 2010).....	10
Tabla 3. Cantidad de materia orgánica, nitrógeno y fósforo descargados a través de los efluentes de granjas camaronícolas por cada tonelada de camarón producida, en relación al factor de conversión alimenticia (FCA) (Tacon, 2002).....	11
Tabla 4. Tamaño del mercado y de la inversión en la investigación en sanidad acuícola en el mundo en 2004 (Bondad-Reantaso <i>et al.</i> , 2005).....	16
Tabla 5. Composición de los alimentos experimentales (g.kg ⁻¹)	34
Tabla 6. Composición de los alimentos experimentales (g.kg ⁻¹)	43
Tabla 7. Composición de los alimentos experimentales (g.kg ⁻¹): control (C) y con 20% de detritos de <i>U. lactuca</i> como sustituto de harina de pescado (DLac20).....	47
Tabla 8. Parámetros zootécnicos de <i>P. vannamei</i> en sistemas de monocultivo (CM) y de cocultivo (CO).	54
Tabla 9. Parámetros zootécnicos del ostión <i>Crassostrea gigas</i> en sistemas de monocultivo (OM) y de cocultivo (CO).	55
Tabla 10. Valores P (P-values), relevancia biológica (RB) y porcentaje de los OTU implicados en las predicciones funcionales de programa bioinformático PICRUST de categorías KO de segundo nivel de los datos metagenómicos de intestino de <i>P. vannamei</i> cultivados 30 días en monocultivo (CM) y en cocultivo con <i>C. gigas</i> (CO).....	59
Tabla 11. Valores P (P-values), relevancia biológica (RB) y porcentaje de los OTU implicados en las predicciones funcionales del programa bioinformático PICRUST de categorías KO de segundo nivel de los datos metagenómicos de la glándula digestiva de <i>C. gigas</i> cultivados 30 días en monocultivo (OM) y en cocultivo con <i>P. vannamei</i> (CO).....	60
Tabla 12. Categorías ortogonales KO de tercer nivel de las predicciones funcionales del programa bioinformático PICRUST con valores P (P-values) y relevancia biológica (RB) significativas con base a las comunidades bacterianas identificadas en el intestino de <i>P. vannamei</i> cultivados 30 días en sistemas de monocultivo de camarón (CM) y de cocultivo (CO) con <i>C. gigas</i>	62
Tabla 13. Categorías ortogonales KO de tercer nivel de las predicciones funcionales del programa bioinformático PICRUST con valores de P (P-values) y relevancia biológica (RB) significativas con base a las comunidades bacterianas identificadas en la glándula digestiva de <i>C. gigas</i> cultivados 30 días en sistemas de monocultivo de ostión (OM) y de cocultivo (CO) con <i>P. vannamei</i>	62
Tabla 14. Composición proximal de la harina y del detrito de <i>U. lactuca</i>	65
Tabla 15. Composición proximal de los alimentos control (C) y experimentales con inclusión a 10% y 20% de los detritos de <i>U. lactuca</i> (DLac10 y DLac20).....	65
Tabla 16. Supervivencia, peso final (PF), tasa de conversión específica (TCE), Consumo de alimento (CA) y factor de conversión alimenticia (FCA) de <i>P. vannamei</i> alimentados durante 30 días con un alimento control con 0% de detritos (C) y alimentos con 10 y 20% de detritos de <i>U. lactuca</i> (DLac10 y DLac20).....	66
Tabla 17. Categorías ortogonales KO de segundo nivel de las predicciones funcionales del programa bioinformático PICRUST con valores P (P-values) y relevancia biológica (RB)	

significativas con base a las comunidades bacterianas identificadas en el intestino de <i>P. vannamei</i> cultivados 30 días con un alimento control con 0% de detritos y alimentos con 10 y 20% de detritos de <i>U. lactuca</i>	71
Tabla 18. Categorías ortogonales KO de tercer nivel de las predicciones funcionales del programa bioinformático PICRUSt con valores P (P-values) y relevancia biológica (RB) significativas con base a las comunidades bacterianas identificadas en el intestino de <i>P. vannamei</i> alimentado durante 30 días con un alimento control con 0% de detritos y alimentos con 10 y 20% de detritos de <i>U. lactuca</i>	73
Tabla 19. Composición proximal de la harina, del detrito de <i>U. lactuca</i> y de la microalga	75
Tabla 20. Supervivencia (Superv.), peso vivo final (PVF), longitud final (LF), peso seco final (PSF), tasa de conversión específica (TCE) e índice de Lawrence y Scott (ILS) de <i>C. gigas</i> alimentados durante 35 días con diferentes proporciones de detritos de <i>U. lactuca</i> como sustituto de microalga <i>C. calcitrans</i>	76
Tabla 21. Tasa de crecimiento (k), tasa de renovación metabólica (m) y tiempo de vida media (t_{50}) del nitrógeno en el manto de <i>C. gigas</i> alimentados con detritos de <i>U. lactuca</i> como sustituto de microalga <i>C. calcitrans</i> en diferentes proporciones	78
Tabla 22. Proporciones relativas estimadas de nitrógeno dietario y materia seca total (\pm Intervalos de confianza) suministrada por microalga <i>C. calcitrans</i> y detritos de <i>U. lactuca</i> que contribuyen al crecimiento de <i>C. gigas</i> alimentados con diferentes proporciones de cada uno	79
Tabla 23. Composición proximal de la harina y detrito de <i>U. lactuca</i>	81
Tabla 24. Composición proximal de los alimentos control (C) y con 20% de los detritos de <i>Ulva lactuca</i> como sustituto de harina de pescado (DLac20)	81
Tabla 25. Índice de mortalidad acumulada (ICA) y reducción en mortalidad de <i>P. vannamei</i> infectado con el virus de la mancha blanca (WSSV) previamente alimentados 7 días con dieta que incluyeron <i>Ulva lactuca</i> fresca (FLac) y alimentos con 20% de detritos de <i>U. lactuca</i> como sustituto de harina de pescado (DLac20) o alimento control (C+)	82
Tabla 26. Supervivencia, peso final (PF), biomasa final a la cosecha, tasa de conversión específica (TCE) y factor de conversión alimenticia (FCA) de <i>P. vannamei</i> cultivados 6 semanas en un sistema de integración multitrófica con <i>C. gigas</i> y <i>U. lactuca</i> (IMTA), en un sistema IMTA con detritos como fuente de alimento para el camarón y el ostión (IMTA-D), y en un sistema de monocultivo tradicional (C)	85
Tabla 27. Supervivencia (Superv.), peso vivo final (PVF), longitud final (LF), peso seco final (PSF), tasa de conversión específica (TCE) e índice de Lawrence y Scott (ILS) de <i>C. gigas</i> cultivados 6 semanas en un sistema de integración multitrófica con <i>P. vannamei</i> y <i>U. lactuca</i> (IMTA), en un sistema IMTA con detritos como fuente de alimento para el camarón y el ostión (IMTA-D) y en un sistema de monocultivo tradicional (C)	85
Tabla 28. Ganancia económica (mil \$USD) teórica en un sistema de monocultivo intensivo de camarón y en un sistema IMTA	126

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, la industria acuícola participa activamente en salvaguardar la seguridad alimentaria mundial y el desarrollo económico de comunidades rurales. A nivel mundial son más de 3 mil millones de personas que dependen de los productos del mar como fuente principal de alimento (FAO, 2016). Actualmente, la producción acuícola global supera los 110 millones de toneladas, lo que corresponde a la mitad del suministro mundial aportado por pesca y acuicultura (FAO, 2018). En México, la producción acuícola en 2016 alcanzó las 377 mil toneladas, lo que corresponde a un aumento de 15% comparado con el año 2013 (CONAPESCA, 2017).

En América Latina, como en el mundo, el camarón blanco *Penaeus vannamei* es la principal especie marina cultivada (Wurmann *et al.*, 2004; Wyban, 2019). En México, 2 de cada 3 kilos de camarón se producen por acuicultura (FIRA, 2009), por lo que el cultivo de este crustáceo domina la producción acuícola marina tanto en cantidad producida como en valor comercial (Martínez-Córdova *et al.*, 2009).

Sin embargo, el crecimiento de la camaronicultura es resultado de la intensificación de los sistemas de monocultivo; cuyo esquema de cultivo se enfrenta con muchos desafíos interrelacionados. Uno de los principales retos es la disponibilidad y la estabilidad en la calidad nutricional de alimentos balanceados (Ogello *et al.*, 2014; FAO, 2016), donde la fuente principal de proteína es la harina de pescado, utilizada en gran medida por su alto contenido en proteína y por presentar un perfil de aminoácidos esenciales ideal para las especies acuícolas (Watanabe, 2002). Otro desafío, es la pérdida de nutrientes y oligoelementos por el alimento no consumido y las heces, que provocan una elevada concentración de compuestos nitrogenados y de fósforo en las aguas residuales que se descargan al medio ambiente (Hatje *et al.*, 2016). Así mismo, se descargan los residuos de antibióticos empleados de forma excesiva contra los brotes de enfermedades emergentes que generan grandes pérdidas en la camaronicultura y que están considerados como un tercer desafío para el desarrollo de esta industria (FAO, 2016). Por lo

anterior, los sistemas de monocultivo de camarón presentan grandes retos que limitan el crecimiento sostenible de la actividad.

Los sistemas acuícolas de integración multitrófica (IMTA, por su sigla en inglés) se han propuesto como una alternativa para la expansión económica y ecológicamente sostenible de la acuicultura (Fleurence *et al.*, 2012). El principio de este sistema de cultivo, radica en asociar diferentes niveles tróficos para convertir los “desechos” de una especie que requiere ser alimentada con alimentos balanceados, en activos útiles para otras especies llamadas “filtrantes” de materia orgánica e inorgánica (Xunta de Galicia, 2012).

En diferentes estudios de sistemas multitróficos se ha demostrado su eficiencia en la disminución de partículas en suspensión por la presencia de moluscos (Jones *et al.*, 2001, 2002; Astriana, 2012; Ferreira *et al.*, 2012), la reducción de nutrientes en el agua, gracias a la capacidad de biorremediación de las macroalgas (Raposo *et al.*, 2013; Brito *et al.*, 2014a; b; Castelar *et al.*, 2014; Peña-Rodríguez *et al.*, 2017; Elizondo-González *et al.*, 2018), y en la reducción del riesgo de enfermedades relacionada con un bajo nivel de bacterias patógenas en la combinación del cultivo con moluscos y/o algas (Jones *et al.*, 2001; Pang *et al.*, 2006; Brito *et al.*, 2014a; b).

Por otro lado, la industria de alimentos acuícolas ha realizado un esfuerzo importante para incluir ingredientes vegetales, especialmente fuentes de proteína vegetal más baratas, para reemplazar proteínas animales costosas, a través de nuevas técnicas de producción, extracción y procesamiento (Subasinghe *et al.*, 2003; Amaya *et al.*, 2007; Tacon y Metian, 2008; Tincy *et al.*, 2014). Las macroalgas son un grupo de interés por su composición química y propiedades nutraceuticas, por las cuales actualmente se evalúa su inclusión como ingredientes prácticos en los alimentos balanceados acuícolas, incluso como potencial sustituto de la harina de pescado (Suleria *et al.*, 2015). Se ha logrado incluir harina o extractos de macroalga por niveles debajo del 10%, sin modificar los parámetros zootécnicos de crecimiento del camarón (Chopin *et al.*, 2001; Cruz-Suárez *et al.*, 2008, 2009; Peña-Rodríguez *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014; Pallaoro *et al.*,

2016; Elizondo-González *et al.*, 2018), con efectos positivos en términos de resistencia a algunas enfermedades (Chotigeat *et al.*, 2004; Selvin *et al.*, 2004, 2011; Huang *et al.*, 2006; Ortiz *et al.*, 2006; Cruz-Suárez *et al.*, 2008).

Sin embargo, no se ha estudiado la posibilidad de desarrollar un sistema de integración multitrófica que combine biorremediación del agua y alimentos con ingredientes funcionales a base de macroalga. Además, es limitada la información de la dinámica microbiana y del flujo de nutrientes en los organismos involucrados en este tipo de sistema, que podrían permitir entender los procesos biológicos y químicos implicados en una producción económicamente y ecológicamente sostenible.

Por lo tanto, en el presente estudio se analizaron las comunidades microbianas y el flujo de nutrientes en un sistema multitrófico con camarón blanco *Penaeus vannamei*, ostión japonés *Crassostrea gigas* y macroalgas del género *Ulva*, tres especies de alto potencial comercial en México, con la finalidad de demostrar su viabilidad y beneficios para contribuir al desarrollo de la actividad acuícola sostenible.

2. ANTECEDENTES

2.1 Producción acuícola en México

En 2017, México ocupaba el tercer puesto en producción acuícola en América Latina con una producción anual de 243 mil toneladas, y con una proyección de crecimiento continuo desde 2013 (FAO, 2019). La actividad acuícola constituye una fuente importante de alimentos y de desarrollo socioeconómico en regiones rurales a lo largo del litoral mexicano (Rodríguez Vázquez y Flores Nava, 2014). Sin embargo, estos volúmenes de producción son limitados si se considera la extensión territorial. De acuerdo al área ocupada por los cuerpos de agua continentales, y la cantidad de especies acuáticas que habitan sus aguas, México puede considerarse un país "de bajo rendimiento" en producción acuícola (Amezcuca y Soto, 2014). En efecto, otros países más pequeños como Vietnam, Indonesia, Tailandia, Bangladesh y Chile tienen mayor producción, ubicándose en 2017 entre los 10 principales productores en acuicultura del mundo, mientras México estaba clasificado en el puesto 22 (FAO, 2019).

2.1.1 Cultivo de camarón blanco *Penaeus vannamei*

Para la acuicultura marina en México, el cultivo de camarón es la industria acuícola más importante, la cual representa un valor comercial de más de 17.7 mil millones de pesos mexicanos (CONAPESCA, 2017). Si bien la captura de camarón disminuye cada año (77 mil toneladas en 2017) resultado de la disminución del esfuerzo pesquero y el retiro voluntario de embarcaciones camaroneras, la producción acuícola de México continúa con su crecimiento cada año (16%) para alcanzar una producción de 169 mil toneladas en 2019 (FAO, 2020), y rebasar a partir de 2014 la producción por captura, posterior a la crisis de producción del 2013 (CONAPESCA, 2017). La mayor parte de la producción (85%) se encuentra en la costa del Pacífico, en los estados de Sonora y Sinaloa. La producción se ha fomentado principalmente mediante sistemas semi intensivos de cultivo (45.9%) con rendimientos anuales promedio entre 500 y 2,000 kg.ha⁻¹.ciclo⁻¹ con 2 ciclos al año (DeWalt *et al.*, 2002; Ponce-Palafox *et al.*, 2011; CONAPESCA, 2017). Los sistemas intensivos constituyen todavía un porcentaje relativamente pequeño tanto en número de granjas (6%) como en área cultivada (4%) pese a que ofrecen

bioseguridad y productividad de alto rendimiento de hasta 30,000 kg.ha⁻¹.ciclo⁻¹ con 2 a 3 ciclos al año (DeWalt *et al.*, 2002; Briggs, 2006).

El camarón blanco *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) es un invertebrado (familia *Penaeidae*, del orden de los decápodos), originario de la costa del Pacífico, con distribución desde México a Perú. Es detritívoro bentónico quimiotáctico y crece a través de mudas sucesivas durante su ciclo de vida. El conocimiento de su ciclo de vida y su comportamiento reproductivo permitió su alta domesticación y su tasa de crecimiento aceptable a densidades altas ha facilitado la intensificación de su cultivo lo que la ha convertido en la especie principal de camarón cultivada en todo el mundo (Wyban, 2019), la cual representa el 91% de la producción de América Latina (Wurmann *et al.*, 2004).

El crecimiento óptimo de *P. vannamei* ocurre a una temperatura de 28 a 30°C, con una salinidad entre 27 y 31‰ (CABI, 2018). El oxígeno es la variable más crítica, Fast y Lester (2013) recomiendan mantener el oxígeno disuelto cerca de la saturación para proporcionar las mejores condiciones de cultivo, con más de 5 ppm como regla general razonable. Además, a los parámetros químicos como amonio y nitritos, son tóxicos para muchos organismos marinos entre los cuales se incluye el camarón, se les busca mantener a concentraciones inferiores a 0.4 mg.L⁻¹ de amonio no ionizado y 4.5 mg.L⁻¹ de nitritos (Alcaraz *et al.*, 1999). Por su parte, el pH debe mantenerse entre 7.5 y 8.7. Valores elevados de pH provocan una reducción de la ionización del amonio en nitritos (Hopkins *et al.*, 1993).

Independientemente de la densidad de siembra en el cultivo de camarón, el manejo de la calidad del agua es un factor determinante, particularmente en estanques con densidades altas como los sistemas intensivos (Kungvankij y Chua, 1986). Con un manejo óptimo de las condiciones de cultivo, un adecuado rendimiento zootécnico de los camarones en sistemas intensivos puede desarrollarse a una densidad de 300 camarones.m⁻² (Krummenauer *et al.*, 2011). La dieta de los camarones en cultivos intensivos depende de alimentos secos peletizados, disponibles en el mercado, que buscan cubrir los requerimientos nutricionales del camarón

(Tabla 1) mediante el uso de la harina de pescado como fuente principal de proteína (Kungvankij y Chua, 1986).

Tabla 1. Requerimientos nutricionales del camarón blanco *Penaeus vannamei*.

	Rango óptimo	Referencias
Proteínas	30-36%	(Li <i>et al.</i> , 2008)
Incluyendo aminoácidos esenciales	(%proteína)	(Cuzon <i>et al.</i> , 2004)
<i>Lisina (6.4%) Arginina (7.5%) Histidina (1.9%) Leucina (6.5%) Isoleucina (3.6%) Valina (3.8%) Treonina (3.4%) Metionina (2.6%) Metionina + Cistina (3.3%) Fenilalanina (3.6%) Triptófano (1.1%)</i>		
Carbohidratos	15-30%	(Le Moullac, 1995)
Lípidos	5-8%	(Guillaume <i>et al.</i> , 1999)
Incluyendo ácidos grasos esenciales		(Julliy, 2007)
<i>C18:2n-6 Ácido Linoleico; C18:3n-3 Á. Linolénico; C20:4n-6 Á. Araquidónico; C20:5n-3 Á. Eicosapentaenoico; C22:6n-3 Á. Docosahexaenoico</i>		
Colesterol	0.5-1%	(Guillaume <i>et al.</i> , 1999)
Fosfolípidos	3-6%	(Guillaume <i>et al.</i> , 1999)
Vitamina C	1%	(Julliy, 2007)

La tasa de alimentación diaria se proporciona en función de su ingesta diaria de proteína, el peso corporal y la concentración de proteína y se proporciona como porcentaje de la biomasa (2-16%) en el cultivo (Ruvalcaba-Márquez *et al.*, 2021). La frecuencia de alimentación de los camarones en sistemas intensivos comúnmente es de 2 a 5 veces por día. Tradicionalmente se observan factores de conversión alimenticia entre 1.4 y 1.8 lo que permite alcanzar una tasa de crecimiento entre 1.0 a 1.5 gramos por semana (Fox y Treece, 2001; Briggs, 2006; Gómez Ríos, 2015).

2.1.2 Cultivo del ostión *Crassostrea gigas*

El cultivo de ostiones se ha practicado en México durante muchos años, particularmente en lagunas costeras donde se encuentran extensos bancos naturales de estos moluscos (FAO, 1978). A pesar de los esfuerzos para aumentar la producción, México es el cuarto país productor en América Latina y el cultivo de ostiones ocupa el tercer lugar de producción acuícola nacional, con 45 mil toneladas y un valor de más de 537 millones de pesos mexicanos en 2017 (CONAPESCA, 2017). Los principales Estados productores de bivalvos son Veracruz y Tabasco

(67%) en la costa Atlántica y Baja California Sur en la costa del Pacífico con solamente el 15% de la producción nacional (CONAPESCA, 2017). Las principales especies originalmente cultivadas fueron *Crassostrea virginica* en la costa Atlántica y *Crassostrea corteziensis* en la costa del Pacífico (FAO, 1978). Sin embargo, desde 1973, la especie *Crassostrea gigas* fue introducida en Baja California con el fin de impulsar actividades de acuicultura, debido a su gran tolerancia a las condiciones ambientales y a su rápido crecimiento (Chávez-Villalba, 2014). *C. gigas* es el principal bivalvo que se cultiva en el noroeste del país y representa valores comerciales altos en México (Chávez-Villalba, 2014). Además, se incrementó el interés del país por encontrar especies de bivalvos para actividades acuícolas a lo largo de la costa del Pacífico de América del Norte (Arrieche *et al.*, 2010).

La especie *C. gigas* (Thunberg, 1793) es conocida principalmente como ostión del Pacífico u ostión japonés. Es originaria de Japón y Corea donde habita en zonas estuarinas, desde la zona intermareal hasta profundidades de 40 metros (Helm, 2005). Una característica notable de la especie es que a pesar de ser habitante de zonas frías y templadas, es euritérmica y eurihalina (Miossec *et al.*, 2009), lo que le permite desarrollarse y sobrevivir dentro de rangos amplios de temperatura (de -2 hasta 35°C) y salinidad (de 0 hasta 50 ups) (Helm, 2005). Los ostiones del Pacífico son filtradores no específicos, ingieren cualquier materia orgánica particulada en la columna de agua a una intensidad que se basa en el peso seco del animal, la temperatura y la cantidad de materia suspendida. En condiciones de crecimiento óptimo, a una temperatura entre 19 y 21°C y una velocidad de flujo de 180 mL.min⁻¹, el nivel estándar de filtración es de 4.8 L.h⁻¹.g⁻¹ peso seco (Walne, 1972; Barillé *et al.*, 1997). Las partículas retenidas en el filtro branquial se pueden rechazar antes de la ingestión como pseudo heces. El proceso de rechazo comienza después de una concentración de partículas de 4.6 mg L⁻¹, que coincide con un llenado del sistema digestivo (Deslous-Paoli *et al.*, 1992; Barillé *et al.*, 1997). Durante el cultivo en laboratorio, *C. gigas* es comúnmente alimentado con microalgas (*Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis* sp.) a una concentración mayor a 200 mil células.mL⁻¹ (Vazquez, 2009).

2.1.3 Cultivo de macroalgas

El cultivo de macroalgas es una industria con una de las mejores proyecciones económicas de desarrollo, gracias a las múltiples aplicaciones y usos dentro de diversos sectores comerciales, como lo son en la industria cosmética, salud, alimentación, entre otras. A nivel mundial, en 2018, la producción de macroalgas se estimó en más de 32 millones de toneladas (FAO, 2020). En México, es una industria con alto potencial de desarrollo y con alto valor de mercado (Dodd, 2014), y fue de gran relevancia por la producción de ficocolóides en el siglo pasado (Zertuche-González, 2013). No obstante, tradicionalmente, las algas han sido utilizadas como alimento desde la época prehispánica principalmente para el tratamiento y prevención de múltiples enfermedades (González, 1987).

Hasta la fecha, toda la industria de las algas marinas en México se ha circunscrito a los estados de Baja California (McHugh, 2002) y Baja California Sur (CONAPESCA, 2017). Entre 2012 y 2013, la producción creció 46%, pero todavía representa una pequeña parte de la producción acuícola (CONAPESCA, 2013), y ha logrado ocupar el segundo lugar de la producción acuícola en ambos Estados (CONAPESCA, 2017). Por prácticamente cuatro décadas, la industria mexicana permaneció sin grandes cambios. México se ubicó como un país exportador de materia prima para la industria de los ficocolóides, con excepción de *Gelidium robustum*, industrializada para la producción de agar (Zertuche-González, 2013). El país exportó 439 toneladas de algas marinas en 2009, mientras que las importaciones de derivados de algas marinas, principalmente ficocolóides, han aumentado (FAO, 2013). Hace algunos años, se han propuesto otras opciones para la producción de macroalgas como el cultivo de especies comestibles, su utilización como biofiltros y como alimento para otros organismos de cultivo (Zertuche-González, 2013; Peña-Rodríguez *et al.*, 2017; Elizondo-González *et al.*, 2018).

Las macroalgas, son organismos agrupados en tres filos: *Rhodophyta* o algas rojas (más de 7,200 especies), *Phaeophyta* o algas cafés (acerca de 2,000 especies) y *Chlorophyta* o algas verdes (más de 1800 especies) (Guiry, 2016). A pesar de la abundante biodiversidad de las macroalgas, solo 6 especies representaron el 92.9% de la producción mundial en 2018 (FAO, 2020). Las algas

utilizan la luz solar para desarrollar su biomasa, mientras asimilan los nutrientes inorgánicos disueltos en el agua. Por lo tanto, pueden potencialmente eliminar los nutrientes contaminantes del agua residual de cultivos acuícolas y minimizar la descarga de contaminantes en el medio ambiente. Además, el cultivo de organismos de bajo nivel trófico que se alimentan de compuestos inorgánicos implica una inversión relativamente baja para su producción (Neori *et al.*, 2004). Aunque el cultivo de macroalgas es reciente en los países occidentales, limitada en diversificación de especies cultivadas y sin programas de mejora genética, la productividad de algunas especies de algas marinas ya es equivalente al rendimiento alcanzado por cultivos agrícolas que llevan décadas de investigación (Duarte *et al.*, 2009).

Las especies del género *Ulva* (Chlorophyta), macroalgas foliosas y cosmopolitas, dominan los entornos eutrofizados y son en gran parte responsables de las "mareas verdes" en muchas regiones del mundo; un fenómeno en el que la biomasa de *Ulva sp.* se acumula por su tasa de crecimiento rápida (Castelar *et al.*, 2014). En Sudáfrica, se registró el cultivo de *Ulva sp.*, con la mayor producción fuera de Asia, con más de 1000 toneladas de peso seco por año (Paul *et al.*, 2012). La alta tasa de crecimiento es frecuentemente asociada a niveles de nitrógeno elevados en la composición de los tejidos; lo que hace estas macroalgas candidatas ideales para biorremediar el agua de efluentes ricos en nutrientes, y con potencial como fuente de proteína para consumo humano y animal. Adicionalmente estas macroalgas tienen una función activa sobre el secuestro de carbono (Peña-Rodríguez *et al.*, 2010; Favot, 2017). Nutricionalmente, las algas son bajas en grasas y ricas en carbohidratos, minerales, vitaminas y micronutrientes esenciales, particularmente antioxidantes (Radulovich *et al.*, 2015). De la composición de materia seca, entre 10-30% corresponde a la proteína, donde las algas rojas y verdes típicamente presentan mayores valores que las caféas. La porción de lípidos varía entre el 1 y 5% de materia seca (The World Bank Group, 2016).

La **Tabla 2** resume la composición bromatológica de 4 especies de *Ulva* colectadas de medio natural y de cultivo, donde en este último es posible manipular la composición química del alga en función de los nutrientes presentes en el sistema de cultivo.

Tabla 2. Composición bromatológica (% de materia seca) de macroalgas del género *Ulva*, extraídas del medio natural y cultivadas (Peña-Rodríguez *et al.*, 2010).

	Medio natural			Cultivo
Especie	<i>Ulva lactuca</i>	<i>Ulva rigida</i>	<i>Ulva pertusa</i>	<i>Ulva clathrata</i>
Proteína cruda	7.06 – 29	5.9 – 29.5	20 – 26	20.7 – 27.2
Lípidos totales	0.5 – 1.7	0.3 – 1.7		1.1 – 1.5
Fibra cruda	2.8	4.7		5.4 – 5.6
Ceniza	13 – 23.6	47 - 52	29.9	18.6 – 38.4
Carbohidratos	14.6	14.1 – 18.1		ND

2.2 Retos de la acuicultura

La actividad acuícola enfrenta grandes críticas en razón de su funcionamiento poco sostenible que ocasiona impactos ambientales y desafíos importantes a enfrentar durante las próximas décadas (Naylor *et al.*, 2000; Martínez-Córdova *et al.*, 2009). Esos retos incluyen la creciente demanda y limitada producción de harina de pescado para la elaboración de alimentos, los brotes emergentes de patógenos conocidos y nuevos, así como la gestión de la calidad del agua (Subasinghe *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2016).

2.2.1 Aguas residuales

El crecimiento de la acuicultura ha traído un aumento en la contaminación del medio ambiente por la falta de tratamiento de los efluentes generados (Troell *et al.*, 2013; Ottinger *et al.*, 2016). En aras de acelerar la producción, se puede llegar a utilizar de manera excesiva e inadecuada alimentos con altos niveles de proteína o baja digestibilidad, además de fertilizantes y antibióticos (Páez-Osuna, 2001; Martínez-Córdova *et al.*, 2009), lo cual genera una sobrecarga de nutrientes (nitrógeno y fósforo principalmente), sólidos suspendidos, patógenos (bacterias y virus) y contaminantes (otros compuestos tóxicos) en el agua de cultivo (Páez-Osuna, 2001; Soheli y Ullah, 2012). Una práctica común para mantener la calidad del agua adecuada en los tanques es realizar recambios parciales del agua del estanque, sin embargo, dichas aguas residuales no suelen ser tratadas y se arrojan directamente en los cuerpos de agua de las zonas adyacentes (Burford *et al.*, 2003; Ottinger *et al.*, 2016), lo cual contribuye a incrementar los

niveles de eutrofización de los ecosistemas acuáticos y el consiguiente impacto ecológico (Cao *et al.*, 2007; Hatje *et al.*, 2016; Sánchez-Romero *et al.*, 2016).

La industria camaronícola en monocultivo contribuye en este impacto al ambiente (Cao *et al.*, 2007; Hatje *et al.*, 2016). Entre más alto es el grado de intensificación del cultivo, mayor es la densidad de carga, uso de agua, alimentos y fertilizantes, por lo que genera un mayor nivel de materia orgánica e inorgánica en el agua residual (Páez-Osuna, 2001). Numerosos trabajos evidencian como los alimentos nutricionalmente deficientes y las malas prácticas de alimentación pueden provocar altos valores de factor de conversión alimenticia (FCA) y altas cantidades de materia orgánica desechada en el agua. La **Tabla 3** estima las pérdidas en nutrientes en función del factor de conversión alimenticia en la camaronicultura. En México, bajo un escenario con un FCA de 2.5, se descargarían al ambiente 130,000 toneladas de materia orgánica, 9,360 toneladas de nitrógeno y 3,040 toneladas de fósforo por cada ciclo de cultivo (Martínez-Córdova *et al.*, 2009).

Tabla 3. Cantidad de materia orgánica, nitrógeno y fósforo descargados a través de los efluentes de granjas camaronícolas por cada tonelada de camarón producida, en relación al factor de conversión alimenticia (FCA) (Tacon, 2002).

FCA	Materia orgánica (kg)	Nitrógeno (kg)	Fósforo (kg)
1	500	26	13
1.5	875	56	21
2	1250	87	28
2.5	1625	117	38

Para contrarrestar este efecto, se propone la biorremediación como una potencial solución para la degradación de desechos orgánicos e inorgánicos, principalmente con el uso de moluscos bivalvos filtradores, microalgas y macroalgas marinas (Subasinghe *et al.*, 2003; Neori *et al.*, 2004; Ostroumov, 2005). Esos organismos prometen ser una solución que se puede integrar a los sistemas acuícolas para minimizar el impacto ambiental (Otoshi *et al.*, 2003).

2.2.2 Control microbiológico

En América Latina, las enfermedades se consideran entre uno de los tres problemas más importantes que afectan el futuro de la industria acuícola, y especialmente en camaronicultura desde que se ha convertido en una actividad industrial masiva (Páez-Osuna, 2001; Naylor y Burke, 2005; Anderson *et al.*, 2016).

Los agentes patógenos que afectan la acuicultura son principalmente virus y bacterias (Martínez-Córdova *et al.*, 2009; Ottinger *et al.*, 2016), y comúnmente están asociados a problemas de bioseguridad y malas prácticas de manejo (Kitikiew *et al.*, 2013). Desde el primer reporte de enfermedad en camarón en los años 80 en Taiwán con *Baculovirus monodon* (MBV), han seguido otras igual o más devastadoras: virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV), virus de la cabeza amarilla (YHV), virus del síndrome de Taura (TSV) y virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) (Flegel *et al.*, 2008). Este último apareció en la costa del Pacífico de México en 1999 y fue responsable de pérdidas importantes en el periodo 2000-2005 (Primavera, 2006; Juárez, 2007). Es considerado como uno de los principales patógenos en la camaronicultura debido a la severidad de la infección y las mortalidades masivas dentro de 7-10 días de iniciado al brote (Martínez-Córdova *et al.*, 2009). Además de los virus, las bacterias, principalmente del género *Vibrio*, causan aproximadamente 10% de las pérdidas en granjas de camarón (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2003). Los efectos y la gravedad de la vibriosis van en función de las especies y las cepas de *Vibrio*, de su concentración en la microflora del camarón o del agua, de la especie y la edad del camarón, de las prácticas de manejo y el más importante, de la calidad del agua (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2003). En particular, Los *Vibrios* portadores del plásmido que genera las biotoxinas causantes de la enfermedad AHPND fueron causantes de la crisis de producción de 2013 en el Noroeste de México (Soto-Rodríguez *et al.*, 2015).

El empleo de medicamentos antimicrobianos, pesticidas, desinfectantes y productos químicos es la primera estrategia elegida en los sistemas intensivos para evitar y controlar la propagación de enfermedades (Shen *et al.*, 2010). Sin embargo, estos usualmente son usados de manera excesiva e irrestricta, lo cual ha generado serias preocupaciones sobre el desarrollo de

resistencias en las poblaciones bacterianas (Ottinger *et al.*, 2016) y virales (Subasinghe *et al.*, 2003). Así mismo, esas prácticas pueden provocar la bioacumulación de los productos químicos en los tejidos e inmunodepresión en los camarones de cultivo (Kitikiew *et al.*, 2013); y de manera indirecta tienen un efecto sobre los ecosistemas por la liberación de desechos en los efluentes, además del potencial efecto en la salud humana (Cabello, 2006; Primavera, 2006).

Se han explorado estrategias alternativas para prevenir o disminuir la actividad de los patógenos, mientras se mejora la productividad: la implementación de buenas prácticas de cultivo, la selección genética de líneas de organismos resistentes a enfermedades, la desinfección del agua con UV y ozono, la vacunación, la terapia de fagos, y la estimulación inmune mediante el uso de factores nutricionales derivados de fuentes bacterianas, animales o alga (Wang *et al.*, 2008; Watts *et al.*, 2017). Entre estas, la vacunación esta reportada como el método más eficaz para la prevención de enfermedades bacterianas y virales. Sin embargo, para los invertebrados no se ha reportado mecanismos de inmunidad adquirida y las vacunas son dependientes de sistemas inmunológicos de memoria, razón por la cual no se han aplicado hasta ahora para controlar las enfermedades virales en el camarón (Wang *et al.*, 2017). Además, la forma de aplicación usual vía inyección puede ser desafiante para su aplicación a poblaciones numerosas de organismos. Al contrario, los inmunoestimulantes mejoran los mecanismos de defensa no específicos y de esa forma activan o aumentan el sistema inmune innato de los camarones (Kitikiew *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017). Los principales inmunoestimulantes aplicados en acuicultura son: polisacáridos (β -glucanos, peptidoglicanos, quitosano), vitaminas (C y E), bacterias (vivas o metabolitos secundarios que producen) y plantas o algas en forma fresca, de harina o extractos (carotenoides, lectina, péptidos antimicrobianos) (Wang *et al.*, 2017). En el camarón, se han evaluado diferentes formas de administración de inmunoestimulantes, mediante inmersión, inyección o por vía oral en el alimento, y se ha reportado la vía *per os* como el método más práctico para suministrar los inmunoestimulantes (Huang *et al.*, 2006; Ochoa-Álvarez *et al.*, 2021).

2.2.3 Alimentos funcionales

La industria de producción de alimentos para la acuicultura se ha ampliado rápidamente, con tasas de crecimiento que alcanzan más del 30% por año. La disponibilidad de recursos y sus usos permitieron un crecimiento 3 veces más rápido que la producción en el sector agrícola (FAO, 2015). Pero su viabilidad económica se ve amenazada por su dependencia en la disponibilidad de ingredientes costosos, especialmente la harina y el aceite de pescado usados como principales fuentes de nutrientes (Martínez-Córdova *et al.*, 2009; FAO, 2016). Su elección como ingredientes fundamentales en el alimento de camarones y peces, se debe a su calidad nutricional ideal: la harina de pescado proporciona aminoácidos esenciales como la lisina y la metionina, y el aceite de pescado, los ácidos grasos esenciales como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), en ambos casos deficientes en fuentes vegetales (Watanabe, 2002). Sin embargo, la materia prima está limitada en disponibilidad (**Figura 1**), debido a la sobreexplotación pesquera de las especies de peces comerciales.

El suministro de harina de pescado ha permanecido estable en los últimos años, mientras que la demanda, relacionada con la producción acuícola, ha crecido en 25% de 1988 a 2003 (Allan, 2004). Con el fin de responder a la demanda que se ha duplicado en estos últimos 10 años, la producción acuícola también siguió incrementando para alcanzar una producción de 114.5 millones de toneladas en peso vivo en 2018 (FAO, 2020). Debido a su alto costo y la inestabilidad del suministro, la harina de pescado pasó de 35% a 25% de inclusión en el alimento de camarón en las últimas décadas (Hardy, 2006; Tacon y Metian, 2008). Recientemente se ha reportado que la inclusión de harina de pescado puede ser inferior al 20% sin afectar la eficiencia proteica (Martínez-Antonio *et al.*, 2019).

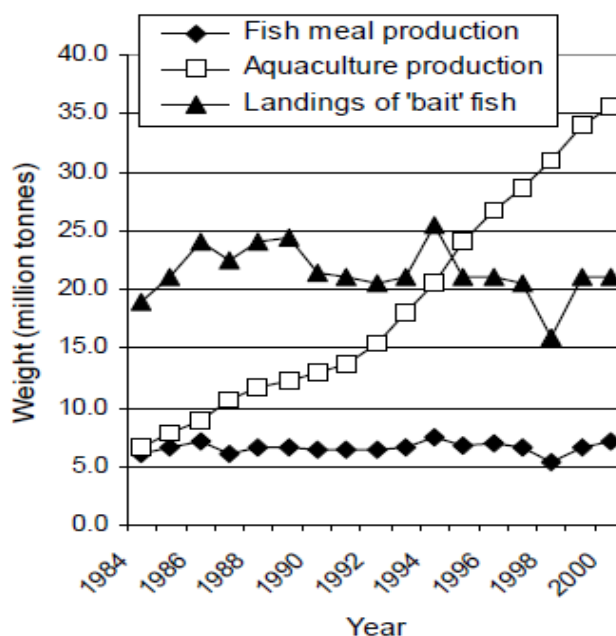


Figura 1. Producción acuícola, pecuaria y de harina de pescado de 1984 a 2003 (Allan, 2004).

La FAO destaca la necesidad de optimizar la producción de alimentos y las prácticas de manejo del mismo en la acuicultura (FAO, 2016). Por lo tanto, el desarrollo de la acuicultura en los últimos años ha incluido la investigación de métodos para una alimentación más eficiente (mejor crecimiento y conversión alimenticia) y ofrece oportunidades para el desarrollo de alternativas a la harina de pescado (Subasinghe *et al.*, 2003).

La industria de alimentos acuícolas ha realizado un esfuerzo importante por incluir ingredientes alternativos, especialmente las fuentes de proteína de origen vegetal, más baratas, para reemplazar las costosas proteínas animales, mediante a nuevas técnicas de producción, extracción y procesamiento (Subasinghe *et al.*, 2003; Amaya *et al.*, 2007; Tacon y Metian, 2008; Tincy *et al.*, 2014). Los métodos recientemente desarrollados de fermentación de algas con levaduras y bacterias son prometedores para el desarrollo de fuentes superiores de proteínas y aceites para uso en alimentos formulados. La gran variedad de especies de algas con su producción diversa de biomoléculas útiles podría proporcionar cualidades nutricionales (aminoácidos esenciales, ácidos grasos, vitaminas, minerales y metabolitos secundarios) a la industria de insumos alimenticios (Harel *et al.*, 2007).

Por otro lado, los nutraceuticos están a la vanguardia en la investigación acuícola (**Tabla 4**) (Bondad-Reantaso *et al.*, 2005). Estos nuevos alimentos mejoran el crecimiento y la utilización de nutrientes al regular positivamente las vías metabólicas, mientras reducen los efectos de los factores estresantes y actúan como agentes amortiguadores del sistema inmune no específico (Tincy *et al.*, 2014); de esta forma los nutraceuticos contribuyen a los principios básicos de la formulación de alimentos (Harel *et al.*, 2007).

Tabla 4. Tamaño del mercado y de la inversión en la investigación en sanidad acuícola en el mundo en 2004 (Bondad-Reantaso *et al.*, 2005).

Sector	Tamaño del mercado (M \$USD)	(%)	Inversión en la investigación (M \$USD)
Nutraceuticos	431.2	44	21.6
Biológicos	68.6	7	10.3
Antibióticos	274.4	28	8.2
Higiene	137.2	14	6.9
Anti parasíticos	29.4	3	2.1
Otros	39.2	4	1.2

Como fuente de origen vegetal, las macroalgas son el grupo que más se investiga en la industria nutraceutica para su inclusión en alimentos acuícolas y como sustitución de la harina de pescado (Suleria *et al.*, 2015). Las algas, además de ser un recurso natural renovable, son de alto valor nutricional con respecto a su contenido en fibra dietética, vitaminas, proteínas, lípidos y minerales. Por lo tanto, las algas comestibles tienen un gran interés en el desarrollo de alimentos de bajo costo y tienen un alto potencial para la nutrición humana y animal (Ortiz *et al.*, 2006; Cruz-Suárez *et al.*, 2008).

Adicionalmente, se ha demostrado que la inclusión de las macroalgas en las formulaciones del alimento de camarón tiene efectos positivos adicionales. A niveles de inclusión por debajo del 10%, se observó una mejora de la calidad del alimento, de su ingesta, de la eficiencia alimenticia, del crecimiento, de la calidad del producto animal, en relación con la movilización de lípidos y el contenido de vitaminas y minerales, lo que permite una mayor pigmentación del producto (Cruz-Suárez *et al.*, 2008; Peña-Rodríguez *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014). En un estudio analizando isótopos estables, se observó que los camarones emplean para la formación de

tejido (crecimiento) mayores cantidades de carbono estructural (65-89%) y casi la totalidad del nitrógeno de las macroalgas que del alimento balanceado (Gamboa-Delgado *et al.*, 2011).

No obstante, la limitación de la inclusión de macroalga en el alimento del camarón se ha atribuido a un bajo contenido de proteína y altos niveles de ceniza y fibra cruda en la alga, que pueden afectar su digestibilidad (Ostroumov, 2005; Cruz-Suárez *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009; Rodríguez-González *et al.*, 2014; Serrano *et al.*, 2015). La formación de partículas detríticas de macroalgas en forma de células individuales (o single-cell detritus SCD, inglés), es un proceso de degradación descrito por primera vez por Uchida (1996). El proceso sugiere transformar las macroalgas marinas a un nivel celular mediante el uso de enzimas digestivas y la fermentación bacteriana, ya que resulta en el desarrollo de fuentes superiores de proteína y aceites para uso en alimentos formulados (Uchida y Murata, 2002; Harel *et al.*, 2007). En efecto, las SCD tienen un tamaño entre 2 y 14 μm , son ricas en proteína en razón de su enriquecimiento con las células bacterianas del proceso fermentación y su digestión es facilitada por la degradación previa de los componentes de la pared celular de la macroalga (Cruz-Suárez *et al.*, 2008). El uso de SCD como alimento potencial en sustitución parcial de biomasa de microalgas se ha demostrado con éxito en la alimentación de crustáceos (Uchida y Murata, 2002) y moluscos (Pérez Camacho *et al.*, 2004; Tanyaros y Chuseingjaw, 2014). Entonces, la producción de detritos a partir de macroalgas, recursos marinos subexplotados, como *Ulva lactuca* y *U. clathrata*, puede ser una alternativa en la búsqueda una fuente de proteína, de bajo costo y alto valor agregado en la alimentación del camarón (Cruz-Suárez *et al.*, 2008).

2.3 Sistemas acuícolas de integración multitrófica (IMTA)

El desarrollo de sistemas acuícolas de integración multitrófica (IMTA por sus siglas en inglés) se ha propuesto como una alternativa pionera para afrontar los desafíos relacionados a la acuicultura moderna (Abreu *et al.*, 2009). Un sistema IMTA consiste en el cultivo de especies acuícolas de diferentes niveles tróficos y con funciones complementarias en el ecosistema, para aprovechar las interacciones sinérgicas entre especies, lo que permite que los desechos y alimentos no consumidos de una especie sean utilizados como fuente de nutrientes y alimento

para las otras especies en niveles tróficos más bajos (Chopin *et al.*, 2001; Neori *et al.*, 2004). Esta práctica de acuicultura se basa en un principio muy simple: "la solución a la desnitrificación no es la dilución, sino la extracción y conversión a través de la diversificación" (Chopin *et al.*, 2012). El concepto IMTA es extremadamente flexible, lo importante es que los organismos se elijan de acuerdo a sus funciones complementarias en el ecosistema, así como su valor económico (Barrington *et al.*, 2010).

Estos sistemas se fundamentan en la combinación de la acuicultura alimentada (por ejemplo, peces o camarones) con la acuicultura extractiva, que utiliza nutrientes inorgánicos (algas marinas u otra vegetación acuática) y orgánicos (consumidores de materia orgánica en depósito o en suspensión). En principio, estos sistemas fueron diseñados como una alternativa viable para la sostenibilidad ambiental (bio-mitigación del impacto sobre los ecosistemas), la estabilidad económica (con mejoras en la producción, disminución de costos, diversificación de productos, reducción de los riesgos y creación de nuevos empleos en comunidades costeras y rurales) y la aceptación social (con mejoras en prácticas de gestión, normas regulatorias y apreciación de productos diferenciados y seguros) (Ridler *et al.*, 2007; Chopin *et al.*, 2010; Xunta de Galicia, 2012; FAO, 2013). En la práctica, esta alternativa es elegida principalmente para reducir los costos de cultivo a través de la disminución de las pérdidas residuales y para aumentar los ingresos de la actividad gracias a la diversificación de la producción (Ridler *et al.*, 2007; Troell, 2009).

2.3.1 Cultivos multitróficos para el manejo de la calidad del agua

Existen numerosos estudios que justifican el efecto positivo de los cultivos multitrófico respecto a los sistemas de monocultivo, los cuales se han enfocado en analizar el rol y la eficiencia de las especies filtrantes en los sistemas de cultivo para la remediación del agua residual.

En particular, el ostión *Crassostrea sp.* tiene la capacidad de disminuir el exceso de nutrientes, metales pesados, fitoplancton, así como inhibir los procesos de eutroficación, al utilizarlo como biofiltro en los sistemas de cultivo de camarón (Astriana, 2012). La integración del ostión del

Pacífico *Crassostrea gigas* con cultivos de dorada *Sparus aurata* redujo en aproximadamente de 7% la deposición orgánica en el agua (Ferreira *et al.*, 2012). Jones y Preston (1999) evaluaron el cultivo de *Saccostrea commercialis* en el agua residual de camarones de cultivo extensivo y observaron una disminución de los sólidos suspendidos totales de 49% y con más efectividad a mayor densidad de ostiones. En un sistema de recirculación de agua, se ha observado que para alcanzar una remediación de partículas de más de 80%, el agua tiene que pasar 4 veces por el tratamiento de los ostiones (Jones *et al.*, 2002). Al contrario, se ha demostrado que en un sistema integrado con camarón y algas marinas (sin moluscos), los sólidos sedimentables pueden aumentar de 26 a 52% (Brito *et al.*, 2014a).

Por otro lado, el cultivo de macroalga en los sistemas IMTA permite mejorar la calidad del agua, particularmente reducir la concentración de compuestos inorgánicos disueltos en el agua. Se ha visto que cultivar la macroalga *Gracilaria birdiae* en un sistema multitrófico con *P. vannamei* puede contribuir a la eliminación de nitrógeno total y amonio (Brito *et al.*, 2014b). *Ulva fasciata* y *G. birdiae* mejoran la calidad del agua después de cinco días de cultivo con una reducción de más del 98% de amonio y 62.1% de fosfato (Castelar *et al.*, 2015). Estas mismas algas eliminaron 93% de nitritos y de 94% a 97% de nitratos del agua residual de los camarones (Raposo *et al.*, 2013). Igualmente, la presencia de *U. clathrata* en cocultivo con camarón café *Farfantepenaeus californiensis* resulta en una buena calidad de agua con bajo contenido de nitrógeno y fósforo (Peña-Rodríguez *et al.*, 2017). En un estudio de un sistema multitrófico integrado de camarón *Penaeus japonicus*, ostión *Saccostrea commercialis* y macroalga *Gracilaria edulis*, se demostró una mejora en la calidad del agua por la reducción de partículas en suspensión (12%) y compuestos inorgánicos (28% en nitrógeno total, 14% en fósforo total) respecto a un sistema de monocultivo de camarón (Jones *et al.*, 2001).

En las prácticas comunes de monocultivos se hace un recambio promedio de agua de 10% diario para reducir el amonio, nitrógeno total, fósforo total, potasio y clorofila A, y así mejorar la calidad del agua y proporcionar un buen ambiente de cultivo, lo que contribuye a mejorar el rendimiento productivo del sistema (Liu *et al.*, 2014). Se ha descrito que el cultivo de *U.*

clathrata permite cultivar el camarón café *Farfantepenaeus californiensis* con bajo recambio de agua (10% semanal) (Peña-Rodríguez *et al.*, 2017) y que un sistema de recirculación de agua tratada por biorremediación con *U. lactuca* no presenta diferencias significativas en la concentración de compuestos de nitrógeno y fosfato comparado con sistemas de recambio con agua limpia (Elizondo-González *et al.*, 2018). Por lo tanto, *U. lactuca* y *U. clathrata* se presentan como unas especies deseables para la biorremediación de aguas residuales en sistemas IMTA (Elizondo-González *et al.*, 2018).

2.3.2 Cultivos multitróficos para el control microbiológico

Además de disminuir la concentración de sólidos suspendidos y compuestos inorgánicos de la columna de agua, se encontró en un sistema multitrófico con *P. japonicus*, *S. commercialis* y *G. edulis*, que los ostiones tienen la capacidad de disminuir un 30% la presencia de bacterias en el agua residual y que no se presentan diferencias significativas en el conteo de bacterias totales a la salida de los tanques de macroalga (Jones *et al.*, 2001, 2002). Al contrario, en un estudio de cocultivo de abulón juvenil *Haliotis discus hannai* con *Gracilaria textorii* se observó un nivel de bacteria total más alto que en el sistema de monocultivo, sin embargo, se detectó que la presencia del alga, sin o con alimento peletizado, permitió mantener bajos los niveles de *Vibrio* total, especialmente, *V. alginolaticus* y *V. logei*, y observar además cambios en los tipos de colonias bacterianas presentes en el cultivo (Pang *et al.*, 2006). También se concluyó que cultivar *Gracilaria birdiae* y *G. domingensis* en un sistema biofloc con *P. vannamei* puede contribuir a una menor densidad de *Vibrio* y reducir la densidad de cianobacterias en presencia del virus de la mancha blanca (WSSV) (Brito *et al.*, 2014a; b).

Por otro lado, las algas marinas se consideran como un recurso natural importante en la industria farmacéutica debido a sus propiedades antiviral, antimicrobiana y capacidades inmunoestimulantes (Freile-pelegrin y Morales, 2004; Maftuch *et al.*, 2012; Castelar *et al.*, 2014). Se encontró que sus metabolitos secundarios son recursos prometedores para el desarrollo de estrategias de control ecológico para las enfermedades del camarón (Ortiz *et al.*, 2006; Cruz-Suárez *et al.*, 2008; Selvin *et al.*, 2011). Más que en cocultivo, las algas o fracciones

de estas, se han evaluado como componentes nutraceuticos incluidos en los alimentos (Castro *et al.*, 2004), observándose que a bajos niveles de inclusión en el alimento (menos de 8%) presentan efectos positivos ante patógenos en camarones de cultivo (Cruz-Suárez *et al.*, 2009). Los metabolitos secundarios de *Ulva fasciata* rociados sobre el alimento estimularon los factores de defensa no específicos del camarón contra agentes patógenos: redujo el conteo total de hemocitos comparado a un control infeccioso con una mezcla de bacteria, eliminó 88% de las células de *Vibrio*, e incremento la tasa de fagocitosis hasta 6% después de una hora (Selvin *et al.*, 2004). También se ha descrito el incremento en la actividad inmune y la resistencia a las vibriosis en el camarón *Fenneropenaeus chinensis* por el efecto de los extractos de polisacáridos de *Sargassum fusiforme* incluidos en el alimento (Huang *et al.*, 2006). La administración oral de fucoïdan crudo extraído de *Sargassum polycystum* inhibió el crecimiento de *Vibrio harveyi*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* a concentraciones mínimas de inhibición y encontraron que esos extractos también disminuyeron el impacto de la infección por el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en *Penaeus monodon* (Chotigeat *et al.*, 2004). Además, se ha reportado que la alimentación del camarón con un alimento que incluye polisacáridos aislados de *Acrosiphonia orientalis* es efectiva en el control del virus de la mancha blanca (WSSV) (Manilal *et al.*, 2009). También, la administración de fucoïdan de *Cladosiphon okamuranus* en el alimento inhibe la unión de WSSV a las células del camarón *P. japonicus*, lo que resulta en la prevención de la infección por WSSV y permite una supervivencia del 77% comparado al control sin inclusión de alga (0% de supervivencia) (Takahashi *et al.*, 1998).

2.3.3 Productividad de los cultivos multitróficos

Los sistemas acuícolas de integración multitrófica han demostrado un mejoramiento de la productividad final, primero por la diversificación de los productos finales y segundo, por las ventajas recíprocas que encuentran los organismos en el sistema. Cuando *P. vannamei* está alimentado con *U. lactuca* como sustitución de una dieta comercial, se ha constatado que se puede ahorrar hasta un 50% de alimento sin generar una pérdida significativa en el rendimiento de crecimiento del camarón (Pallaoro *et al.*, 2016). Igualmente, se observó un mejor crecimiento y supervivencia en el camarón *Penaeus californiensis* en presencia de las algas

verdes *Caulerpa sertularioides* (Porchas-Cornejo *et al.*, 1999). El mejillón *Mytilus galloprovincialis* cultivado río abajo a un lado de jaulas de peces presentó mayor longitud y peso total comparado con los mejillones cultivados a 1 km río arriba de la granja (Sarà *et al.*, 2011). También, cultivado en agua residual de camarón, el ostión *Saccostrea commercialis* presenta una tenencia de mayor crecimiento comparado con su cultivo en agua limpia (Jones *et al.*, 2002). Finalmente, las macroalgas en los sistemas IMTA también tienen una mejor productividad. La comparación de 3 especies de algas verdes, rojas y cafés en sistemas IMTA con peces, demostró que las clorófitas son las especies que presentan el crecimiento más rápido, además, sus mayores tasas de absorción total de nitrógeno amoniacal promueven la producción de altos niveles de proteína en sus tejidos (Castelar *et al.*, 2015; Ashkenazi *et al.*, 2018). El cultivo de *Gracilaria sp.* mostró un mejor rendimiento si se encuentra cerca de jaulas de cultivo de salmón (Abreu *et al.*, 2009) y cuando esta cultivada en el agua residual de camarón *P. japonicus* (Jones *et al.*, 2002). Entonces, los efluentes del cultivo de camarón son considerados como una buena fuente de nutrientes para el cultivo de las macroalgas, que permiten también mejorar su valor comercial debido al aumento de compuestos fenólicos, flavonoides y carotenoides, como se observó en el alga roja *Kappaphycus alvarezii* cultivada con el camarón blanco *P. vannamei* (La Macchia Pedra *et al.*, 2017).

Los sistemas acuícolas de integración multitrófica permiten maximizar el flujo de nutrientes, mejorar el control microbiológico y en consecuencia directa aumentar la productividad. Por otro lado, la inclusión de detritos o SCD de macroalgas en la alimentación del camarón tiene un alto potencial en el desarrollo de alimentos de costo bajo y tiene un efecto positivo sobre la salud animal. Por lo tanto, el desarrollo de un sistema acuícola de integración multitrófica (IMTA) con *P. vannamei* y un especie con capacidad de biorremediación de alto valor comercial (*C. gigas* y *Ulva sp.*) y la inclusión de esta macroalga como ingrediente funcional en el alimento de camarón y del ostión presenta como una alternativa viable para enfrentar los desafíos actuales y contribuir a desarrollar una acuicultura productiva y sostenible en México.

3. JUSTIFICACIÓN

Los sistemas de monocultivo de camarón presentan grandes retos para continuar con su crecimiento debido a brotes de enfermedades emergentes, a la contaminación del medio ambiente, y la creciente demanda de alimentos balanceados. El desarrollo de sistemas acuícolas de integración multitrófica (IMTA) con especies de alto valor comercial representa una alternativa potencial para el desarrollo de una acuicultura productiva y sostenible en México.

Este proyecto de tesis se enfocó en desarrollar, optimizar y evaluar la eficiencia de un sistema IMTA para el cultivo de camarón blanco *Penaeus vannamei*, con el ostión japonés *Crassostrea gigas* y una macroalga *Ulva* sp., con la finalidad de mejorar la productividad a través de la maximización del uso de nutrientes y del mejoramiento del control microbiológico respecto a sistemas de monocultivo.

4. HIPÓTESIS

Si es posible integrar el cultivo intensivo de camarón *Penaeus vannamei* con cultivos de ostión *Crassostrea gigas* y de macroalga *Ulva sp.*, además de utilizar la macroalga como alimento para los organismos; entonces, el sistema acuícola de integración multitrófica (IMTA) permitirá una mayor productividad mediante una mejor utilización de nutrientes y control microbiológico respecto a sistemas tradicionales de monocultivo.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Desarrollar, optimizar y evaluar la eficiencia de un sistema multitrófico (IMTA) para el cultivo de camarón *Penaeus vannamei*, ostión *Crassostrea gigas* y macroalga *Ulva sp.*, en términos de rendimiento productivo, disminución de efluentes y control microbiológico.

5.2 Objetivos particulares

- 1) Evaluar la capacidad del ostión y las macroalgas para la remoción de nutrientes en el agua residual de cultivo intensivo de camarón.
- 2) Evaluar el uso de detritos de macroalga como alimento para camarón y ostión.
- 3) Evaluar el efecto antiviral de la macroalga en el sistema IMTA contra el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en el camarón.
- 4) Evaluar la productividad y la dinámica de flujo de nutrientes del sistema de cultivo integrado multitrófico IMTA.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Objetivo 1: Evaluar la capacidad del ostión y las macroalgas para la remoción de nutrientes en el agua residual de cultivo hiper-intensivo de camarón

Con este objetivo se determinó si el ostión *C. gigas* y las macroalgas *U. lactuca* y *U. clathrata*, pueden usar los nutrientes residuales de los efluentes de un cultivo de camarón *P. vannamei* para su propio crecimiento y biorremediar el agua del cultivo.

6.1.1 Ensayo 1: Capacidad del ostión para la remoción de los nutrientes en un sistema IMTA ostión-camarón y efecto en la microbiota digestiva de ambas especies

6.1.1.1 Sistemas experimentales

Se diseñaron tres sistemas (**Figura 2**):

- Sistema intensivo de monocultivo de camarón (CM): 155 camarones *P. vannamei* de 0.44 ± 0.01 g de peso promedio inicial (PI), se colocaron en tanques de 600 L (equivalente a 200 camarones.m⁻²). Fueron alimentados dos veces al día (10:00 a.m. y 2:00 p.m.) con un alimento comercial Purina® de 39% de proteína y 8% de lípidos. Se inició con una tasa de alimentación del 10% de la biomasa y se ajustó la dosis diaria a saciedad con base en los restos de alimento no consumido.
- Sistema de monocultivo de ostiones (OM): 10 ostiones *C. gigas* de peso vivo promedio inicial de 1.55 ± 0.01 g, se colocaron en bolsas 15 x 15 cm de malla plástica de 5 mm y se cultivaron en tanques de 600 L. Se alimentaron una vez al día, con 10 litros de microalgas *Chaetoceros calcitrans* a una concentración de 1.25×10^6 células.mL⁻¹.
- Sistema de cocultivo de camarones con ostiones (CO): 155 camarones y 10 ostiones (de misma talla y peso que los sistemas CM y OM), fueron colocados en una bolsa de malla de plástico, se cultivaron juntos en tanques de 600 L como sistema de cocultivo de camarón y

ostión (CO). Los camarones se alimentaron de la misma manera que por el sistema CM y los ostiones no se alimentaron.

Las condiciones de todos los cultivos se mantuvieron a una temperatura de $29 \pm 0.5^\circ\text{C}$, con un nivel de oxígeno disuelto superior a $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, un fotoperíodo de 12:12h de luz:oscuridad. El recambio de agua se realizó semanalmente al 20%. El ensayo se procesó por triplicado y duró 30 días.

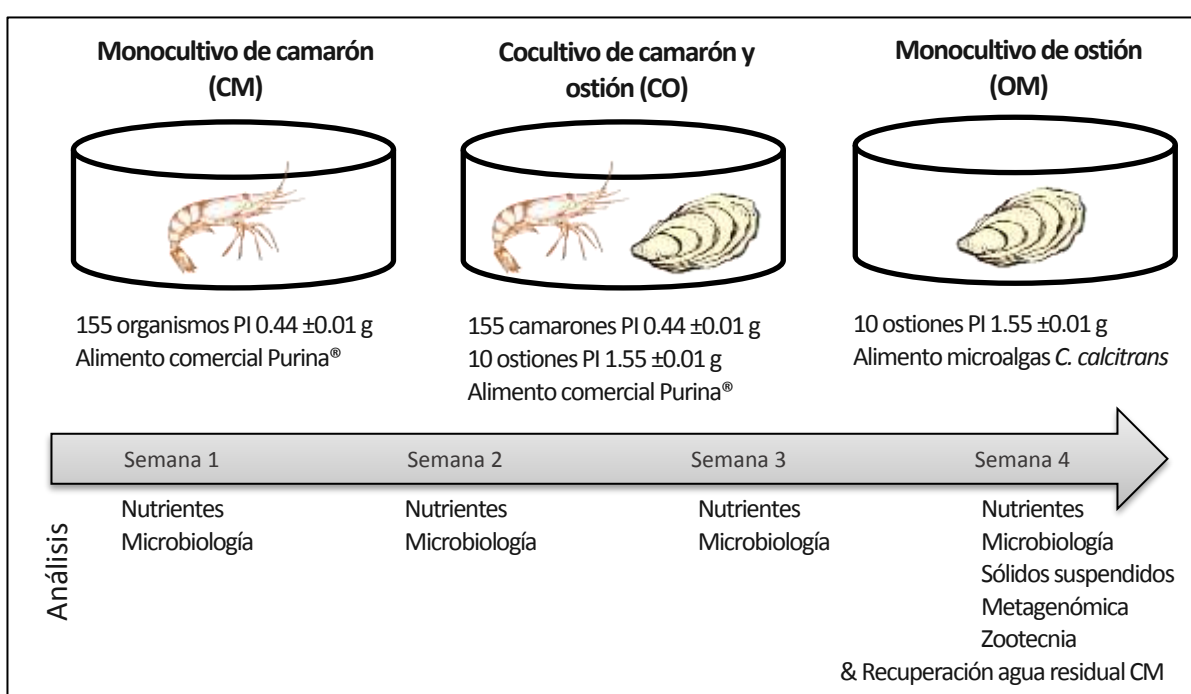


Figura 2. Diagrama de los sistemas experimentales IMTA con camarón y ostión.

6.1.1.2 Agua residual

Cada 3 días, se tomaron muestras de agua y se almacenaron congeladas a -20°C hasta su análisis por métodos espectrofotométricos, de acuerdo a Murphy y Riley (1962) para fosfato, Koroleff (1969) para amonio y García-Robledo *et al.* (2014) para nitritos y nitratos. Los resultados se expresaron en ppm. Cada semana, se tomaron muestras de agua y se sembraron en placas Petri con medio de agar marino 2216 para evaluar la carga bacterias marinas heterotróficas totales y medio de agar TCBS (citrato tiosulfato biliar sacarosa) para evaluar la carga de *Vibrio*. Los

recuentos se realizaron después de 48 horas de incubación a 28°C y se expresaron en ufc.mL⁻¹. Durante la última semana de cultivo, se determinó el volumen de partículas sedimentables totales (mL.L⁻¹) con conos Imhoff, en los tres sistemas.

6.1.1.3 Parámetros zootécnicos

Al final del ensayo, se calculó la productividad de los ostiones – supervivencia, peso final (PF) y ganancia de peso (GP) – y la productividad de los camarones – supervivencia, PF, GP, consumo individual (CI), tasa de crecimiento específica (TCE), factor de conversión de alimentación (FCA) cuyas ecuaciones son las siguientes:

$$\begin{array}{llll}
 \text{Ecuación (1)} & \text{Ecuación (2)} & \text{Ecuación (3)} & \text{Ecuación (4)} \\
 GP = \frac{PF - PI}{PI} \times 100 & CI = \frac{\text{Consumo total}}{\text{Número de individuos}} & TCE = \frac{\ln PF - \ln PI}{\text{Días}} \times 100 & FCA = \frac{GP}{CI}
 \end{array}$$

6.1.1.4 Comunidades bacterianas digestivas

Al final del ensayo, se tomaron muestras de intestino de 8 camarones y la glándula digestiva de 2 ostiones de cada triplicado en cada sistema, se colocaron en 1.5 ml de etanol al 96% y se almacenaron a -20°C hasta análisis.

Los tejidos se homogeneizaron con pistilo estéril y se incubaron en 400 µL de buffer de lisis (NaCl 100 mM, Tris 50 mM, EDTA 100 mM, SDS 1%) y 10 µL de proteinasa K (20 mg.L⁻¹) durante 1h a 60°C. Después de la lisis, se añadieron 200 µL de NaCl 6 M, la mezcla se agitó y se colocó en hielo durante 10 min. Cada muestra se centrifugó durante 10 minutos a 12,000 g a 25°C. El sobrenadante se transfirió en tubos con 1 mL de etanol absoluto y se centrifugó (10 min, 12000 g, 25°C). Posteriormente, se añadió 1 mL de etanol al 70% en el sobrenadante y se centrifugó nuevamente (10 min, 12000 g, 25°C). Las muestras se secaron durante 20 minutos en un concentrador vacío (Speed Vac) y se diluyeron en agua libre de nucleasas (100 µL). La concentración de ADN se cuantificó con el fluorómetro Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, 168 3rd Ave, Waltham, MA 02451, EE. UU.) y la calidad se evaluó mediante electroforesis en geles

de agarosa al 1%, se tiñó con colorante de ácido nucleico de diamante (H1181, Promega, Madison, WI, EE. UU.) y se visualizó bajo luz UV. El ADN de cada muestra se diluyó en agua libre de nucleasas para obtener una concentración de $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, que se utilizó para realizar una PCR dirigida a la región hipervariable V3 del gen ARNr 16S. Las bibliotecas de cada muestra se prepararon de acuerdo con el protocolo de Illumina, Parte # 15044223 Rev. B. Para las reacciones de PCR, los cebadores utilizados (en minúsculas) para V3 con adaptadores salientes (mayúsculas) fueron 16S-V3_338f (TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG acy cct acg ggr ggc agc ag) y 16S-V3_533r (GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA G tta ccg cgg ctg ctg gca c). Las amplificaciones se realizaron de acuerdo con las siguientes condiciones: un ciclo a 95°C durante 3 min, seguido de 30 ciclos de 95°C durante 30 s, 60°C durante 30 s y 72°C durante 30 s, y un ciclo final de 72°C durante 5 min. Los amplicones de PCR se purificaron con perlas magnéticas AMPure XP. Se agregaron índices de Illumina para cada muestra con una segunda PCR a 95°C durante 3 minutos, seguido de ocho ciclos de 95°C durante 30 s, 55°C durante 30 s y 72°C durante 30 s, y un ciclo final de 72°C durante 5 min. Los productos de PCR se limpiaron con perlas y los amplicones se cuantificaron en fluorómetro Qubit. Los amplicones de PCR finales se agruparon en proporciones equimolares y se ajustaron a 4 nM para dilución a 2 pM, se cargaron en una celda de flujo de salida media y se secuenciaron en la plataforma Illumina MiniSeq (2x 150 pb) en el laboratorio de genómica y bioinformática del CIBNOR.

Las secuencias se depositaron en el NCBI Short Read Archive con el número de acceso del Bioproyecto: PRJNA594718. Los archivos FASTQ resultantes se recortaron mediante el paquete de software MOTHUR v1.35.1 con calidad mínima Q25 y longitud mínima de 200 pb (Kozich *et al.*, 2013). Se eliminaron los errores de PCR mediante el script screen.seqs y las secuencias quiméricas con el algoritmo VSEARCH. Se realizó la alineación y la identificación de las unidades taxonómicas operativas (OTU, por sus singlas en inglés), y las secuencias de cada muestra recibieron asignación taxonómica (a nivel de filo, o hasta género si era posible) con un 97% de confianza mediante *SILVA-based bacterial reference alignment* y *RDP training set (v.9)* (Quast *et al.*, 2013). La diversidad alfa se calculó con el método de estimación inversa de la diversidad de Simpson mediante el comando summary.single. La diversidad beta en matriz tridimensional se

determinó mediante un enfoque basado en vectores propios por lo cual se utilizó el análisis en coordenadas principales (PCoA) basadas en la medida de disparidad de Yue y Clayton (thetayc).

6.1.1.5 Predicción funcional de bacterias

Las secuencias de cada tratamiento se agruparon con la base de datos de Greengenes con una identidad del 97% (versión 13_8_99). Los OTU con amplicones superpuestos, duplicados y quimeras se eliminaron mediante screen.seq. La tabla OTU se normalizó y se utilizó para obtener las predicciones funcionales metagenómicas a diferentes niveles jerárquicos (1, 2 y 3) de la enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG, por sus siglas en inglés) mediante el uso del programa bioinformático PICRUSt (Langille *et al.*, 2013). Las abundancias relativas de las vías KEGG, los promedios, la relevancia biológica RB y su significancia (*P*-value) se calcularon con el software STAMP (Parks *et al.*, 2014).

6.1.1.6 Análisis de los datos

Se verificó la normalidad de todos los datos con la prueba de Shapiro y la homocedasticidad con la prueba de Bartlett, mediante el uso del software R versión 3.3.0. Los datos se sometieron a una ANOVA de un factor: tipo de cultivo; seguido, en caso de corresponder, de una prueba de comparación múltiple de Tukey (95% de confianza).

6.1.2 Ensayo 2: Capacidad de las macroalgas para la remoción de los nutrientes del agua residual de cultivo híper-intensivo de camarón

6.1.2.1 Sistemas experimentales

Se diseñaron dos sistemas para cada macroalga (**Figura 3**):

- Sistema de monocultivo de macroalgas fertilizadas (AF): Las algas marinas *U. lactuca* y *U. clathrata* se colectaron en la bahía de La Paz, Baja California Sur, México, y se cultivaron en condiciones controladas. Los esporofitos se propagaron en tanques de 750 L provistos de un difusor de aire de 3 pulgadas y se fertilizaron con medio f2 (Guillard, 1975) a una concentración

constante de 0.5 ppm de nitrógeno en el agua con sin metasilicato de sodio. Para el ensayo, se colocaron 2.0 ± 0.1 g (peso húmedo) de cada alga en recipientes de 250 mL, con el mismo método de fertilización, durante 7 días.

- Sistema de cultivo de macroalgas en el agua residual de camarones (AR): El agua residual del monocultivo de camarones (CM) fue colocada en recipientes de 250 mL en los cuales se incorporaron *U. lactuca* o *U. clathrata* (2.0 ± 0.1 g peso húmedo) durante 7 días. Se realizó el 100% de recambio diario de agua residual.

Las condiciones de los cultivos se mantuvieron a una temperatura de $29 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, con un nivel mínimo de oxígeno disuelto de $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, un fotoperíodo de 12:12h de luz:oscuridad. El recambio de agua se realizó a 100% diario con agua marina fertilizada o agua residual de camarón, respectivamente. El ensayo se procesó por triplicado y duró 30 días.

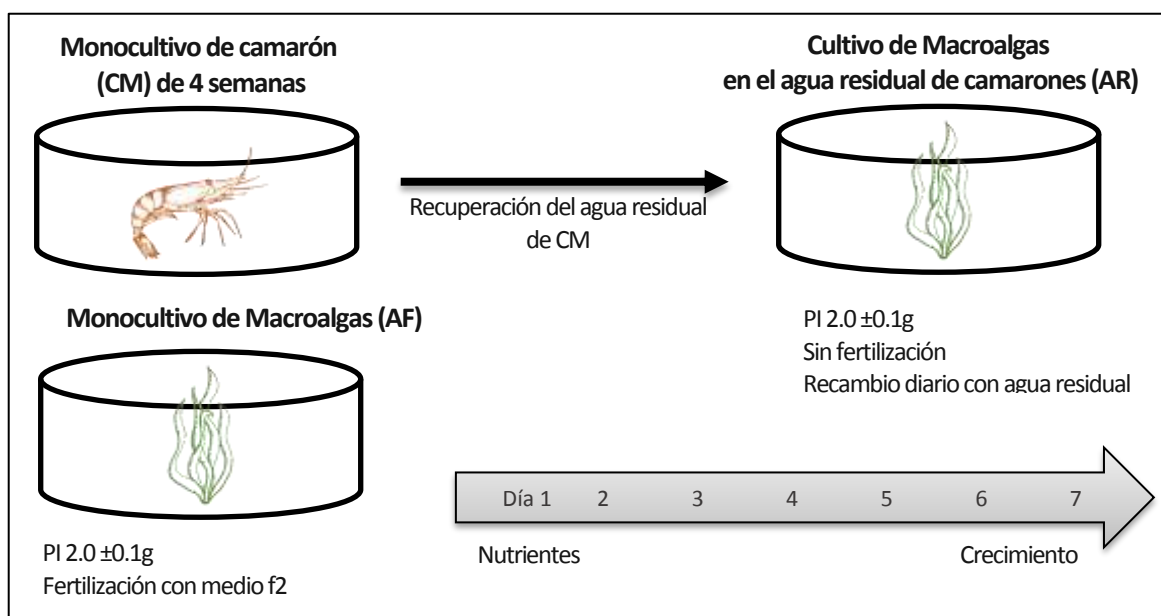


Figura 3. Diagrama de los sistemas experimentales IMTA con camarón y macroalgas *U. lactuca* y *U. clathrata*.

6.1.2.2 Agua residual y crecimiento de las macroalgas

Para ambas macroalgas y tratamientos, se tomaron muestras de agua a 30 minutos, 1h y 3h después de cada recambio de agua con agua residual. El amonio, nitrito, nitrato y fosfato en el agua, fueron medidos por métodos espectrofotométricos descritos en la sección 0.

Al final del experimento, el alga se colocó en un papel absorbente para retirar el exceso de agua. Se pesó con una balanza de precisión 0.01 g para determinar su peso húmedo vivo y evaluar su crecimiento.

6.1.2.3 Análisis de los datos

Se verificó la normalidad de todos los datos con la prueba de Shapiro y la homocedasticidad con la prueba de Bartlett, mediante el uso del software R versión 3.3.0. Los datos se sometieron a una ANOVA de dos factores: especie de macroalga y tipo de fertilización; seguido, en caso de corresponder, de una prueba de comparación múltiple de Tukey (95% de confianza).

6.2 Objetivo 2: Evaluar el uso de detritos de macroalga como alimento para camarón y ostión

Con este objetivo se evaluó el efecto de la inclusión de detritos a base de macroalga *Ulva lactuca* (seleccionada a partir de los resultados del objetivo anterior) sobre la contribución nutricional en el crecimiento, la actividad digestiva y las comunidades microbianas digestivas del camarón *Penaeus vannamei* y del ostión *Crassostrea gigas*.

6.2.1 Ensayo 1: Crecimiento, actividad digestiva y microbiota intestinal de *P. vannamei* alimentado con detritos de *Ulva lactuca* como ingrediente funcional

6.2.1.1 Producción de los detritos de *Ulva lactuca*

La producción *U. lactuca* resultó de un cultivo AF de 21 días, descrito en la sección 0. El alga se cosechó y se lavó con agua dulce en una relación 1:2 p/v para la remoción de posibles epifitos y

otros contaminantes. Posteriormente, se secó 12 h en un horno de convección a 50°C y se pulverizó 15 min en licuadora.

Los detritos de *U. lactuca* se produjeron por medio de un tratamiento enzimático asociado a un proceso de fermentación basado en el método de Felix y Pradeepa (2012). Se mezcló la harina de alga con agua destilada 1:10, se ajustó el pH entre 4.8 y 5.5, y se adiciono 5% p/v de celulasa (Celluzyme®, ENMEX S.A. de C.V., México), y se agitó a 50 rpm 1 hora a 55°C para la digestión enzimática. Después de bajar la temperatura de la mezcla a 35°C, se agregaron *Lactobacillus plantarum* (D-Gelac®, Biomiral, México) y *Saccharomyces cerevisiae* (Safmex®, Lesaffre, México) a una concentración final de 1×10^7 ufc.mL⁻¹ cada uno. Se adicionaron a la mezcla 1% de azúcar, harina de soya y almidón para promover la fermentación anaeróbica. Se incubó durante 48 horas a 35°C en agitación constante de 50 rpm. La melaza obtenida se secó en horno a 60°C durante 24 horas a 20% de humedad y se mantuvo a 4°C en bolsas refrigeradas hasta la preparación de los alimentos para los camarones.

6.2.1.2 Formulación y evaluación de los alimentos experimentales

Se formularon alimentos experimentales con los detritos de *U. lactuca* a un nivel de inclusión del 10 y 20% (DLac10 y DLac20, respectivamente), y un alimento control sin la inclusión de detritus de algas (C). Todos los alimentos se formularon para cumplir con los requisitos nutricionales del camarón, mediante el ajuste de las proporciones de harina de pescado (-8% y -15% respectivamente) y trigo (-21%) en la fórmula (**Tabla 5**).

Tabla 5. Composición de los alimentos experimentales (g.kg⁻¹).

Ingredientes	C	<i>Ulva lactuca</i>	
		DLac10	DLac20
Harina de pescado ¹	195	180	167
Harina de soya ²	315	315	315
Harina de trigo ³	407.5	322.5	322.5
Lecitina de soya ⁴	40	40	40
Aceite de pescado ¹	25	25	25
Grenetina ⁵	10	10	10
Premix vitamina minerales ⁶	5.3	5.3	5.3
Vitamina C ⁷	1	1	1
Cloruro de colina ⁸	1	1	1
Antioxidante BHT ⁸	0.2	0.2	0.2
Detritos <i>Ulva lactuca</i>		100	200

¹ Proteínas Marinas y Agropecuarias SA de CV, Jalisco, MX; ² Promotora industrial acuasistemas SA de CV (PIASA), Baja California Sur, MX; ³ Molino San Cristóbal, Sonora, MX; ⁴ Suministros AZ, Baja California Sur, MX; ⁵ Knox, Estado de México, MX; ⁶ Mezcla de vitamina y minerales: Vit. A, 4000 IU/g; B1, 24,000 mg/kg; B2, 16,000 mg/kg; DL Ca pantotenato, 30,000 mg/kg; B6, 30,000 mg/kg; B12, 80 mg/kg; K3, 16,000 mg/kg; D3, 3200 IU/g; E, 60,000 mg/kg; H, 400 mg/kg; niacina 20,000 mg/kg; ácido fólico, 4000 mg/kg ; Co 2000 mg/kg; Mn, 16,000 mg/kg; Zn, 40,000 mg/kg; Cu 20,000 mg/kg; Fe, 1 mg/kg; Se, 100 mg/kg; I 2000 mg/kg. Sigma Aldrich, Missouri, US; ⁷ Rovimix Stay C 35%, DSM, Heerlen, NL; ⁸ Sigma Aldrich, Missouri, US.

Para la elaboración de los alimentos, se mezclaron todos los ingredientes secos, se agregaron los ingredientes líquidos y agua tibia (60°C), y se homogeneizaron. La mezcla se pasó a través de un molino de carne de troquel equipado con un dado con orificios de 2 cm de diámetro. Los pellets se secaron a 40°C durante 12 h, y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Se realizaron análisis de composición proximal de la harina de *U. lactuca*, de su detrito y de los alimentos procesados de la siguiente manera: proteína cruda (Tecator, 1987), lípidos (Tecator, 1983), cenizas (AOAC, 1997, método 942.05), fibra cruda (AOAC, 1997, método 962.09) y humedad (AOAC, 1997, método 930.15). El extracto libre de nitrógeno (ELN) se calculó por diferencia a 100% de los porcentajes obtenidos de proteína cruda, lípidos, fibra cruda y cenizas.

6.2.1.3 Ensayo de alimentación

Durante 30 días, cada alimento experimental se evaluó por triplicado en tanques de fibra de vidrio de 50 L con 10 camarones *P. vannamei* cada uno, con 0.177 ±0.015 g de peso promedio inicial (PI). Cada tanque contó con aireación constante (oxígeno disuelto > 4 mg.L⁻¹), control de

temperatura (calentadores de titanio de 100W, $29.3 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$), de pH (7.8 ± 0.1), y se llenó con agua marina limpia ($38.5 \pm 0.4\%$) filtrada a $1 \mu\text{m}$ y esterilizada por luz UV. Los tanques se colocaron bajo un fotoperiodo de luz:oscuridad 12:12 h.

Los camarones fueron alimentados con una tasa inicial de 10% de biomasa y posteriormente se alimentaron *ad libitum*. La cantidad de alimento diaria se dividió en dos raciones proporcionadas a las 10:00 y 14:30. Los restos de alimento se evaluaron en porcentaje 2 horas después de la alimentación. La tasa de alimentación se ajustó diariamente para cada tanque de acuerdo con el consumo. Las heces, los restos de alimento y las mudas se eliminaron mediante sifoneo, con un recambio diario de agua del 40%.

6.2.1.4 Parámetros zootécnicos

Después de 30 días, el rendimiento productivo del camarón se evaluó por medio de: supervivencia, peso final (PF), ganancia de peso (GP), consumo individual (CI), tasa de crecimiento específica (TCE), factor de conversión de alimentación (FCA), para los cuales las ecuaciones fueron descritas en la sección 0.

6.2.1.5 Actividad enzimática digestiva

Al final de la prueba de alimentación, se tomaron muestras de hepatopáncreas de 8 camarones de cada tratamiento, se pesaron y se congelaron a -20°C para determinar la actividad enzimática de la tripsina, la quimotripsina, la lipasa y la amilasa. Las muestras de hepatopáncreas ($0.15 \pm 0.02 \text{ g}$) se homogeneizaron con 5 veces su peso en buffer Tris HCl 50 mM CaCl_2 20 mM a pH 8. Los homogeneizados se centrifugaron durante 10 minutos a 18,000 g a 4°C . El sobrenadante se recuperó en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se almacenó a -80°C hasta el análisis. Los homogeneizados se diluyeron en agua destilada (1:40).

El contenido de proteínas se determinó de acuerdo con Bradford (1976) y se usó para la normalización de la actividad enzimática específica. Las actividades enzimáticas específicas de la

tripsina y de la quimotripsina se analizaron según la metodología descrita por Erlanger *et al.* (1961), mediante el uso de benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) para tripsina y succinil-(Ala)-2-pro-phe-pnitroanilida (SAPNA) como sustrato para quimotripsina. Las unidades de tripsina y quimotripsina corresponden a la cantidad de enzima para hidrolizar 1 μmol de BAPNA y SAPNA, respectivamente. Ambas actividades específicas se expresaron en unidades por miligramo de proteína ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína). Adicionalmente, se calculó la relación amilasa/tripsina (A/T).

La actividad de la lipasa se determinó mediante el método descrito por Nolasco-Soria *et al.* (2018), mediante el uso de β -naftilcaprilato como sustrato, a pH 6.5, 25°C y 10 minutos de incubación. La absorbancia se midió a 540 nm y se usó una curva estándar de β -naftol, para medir el β -naftol liberado equivalente. Una unidad de lipasa corresponde a la cantidad de enzima requerida para hidrolizar 1 μmol de β -naftilcaprilato por minuto.

La actividad de la amilasa se determinó mediante el método descrito por Vega-Villasante *et al.* (1993), mediante el uso de almidón como sustrato, a pH 6.5 y 5 minutos de incubación. La absorbancia se midió a 550 nm y se usó una curva estándar de glucosa, para medir la glucosa liberada equivalente. Una unidad de amilasa corresponde a la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol de glucosa equivalente por minuto.

6.2.1.6 Comunidades bacterianas digestivas

Se colocaron muestras del intestino de 8 camarones de cada tratamiento en 1.5 ml de etanol al 96% y se conservaron a -20°C hasta el análisis de la secuencia del ADN ribosomal 16S, tal como fue descrito en la sección 0. Las secuencias se depositaron en el NCBI Short Read Archive con el número de acceso al Bioproyecto: PRJNA631855.

Las secuencias FASTQ se analizaron utilizando el software MOTHUR v1.35.1 (Kozich *et al.*, 2013) como se describió en la sección 0.

6.2.1.7 Predicción funcional de bacterias

Las secuencias de cada tratamiento se analizaron como se describió en la sección 0.

6.2.1.8 Análisis de los datos

Se verificó la normalidad de todos los datos con la prueba de Shapiro y la homocedasticidad con la prueba de Bartlett, mediante el uso del software R versión 3.3.0. Los datos se sometieron a una ANOVA de un factor: porcentaje de inclusión de detritus de *U. lactuca*; seguido, en caso de corresponder, de una prueba de comparación múltiple de Tukey (95% de confianza).

6.2.2 Ensayo 2: Contribución nutricional de los detritos de *U. lactuca* en el crecimiento y la actividad digestiva de *C. gigas*

6.2.2.1 Producción de los detritos de *Ulva lactuca*

La biomasa de *U. lactuca* provino de un cultivo integrado con jurel *Seriola rivoliana*. El sistema consistió en un sistema cerrado de recirculación de agua con dos tanques de 5,000 L, uno con peces y otro con macroalga para biorremediar el agua. Después de dos semanas de cocultivo, el alga se cosechó, lavó, secó y pulverizó como fue previamente descrito en la sección 0.

Los detritos de *U. lactuca* se produjeron según el método descrito en la sección 0 con algunas modificaciones. No se realizó fermentación, ya que después de una prueba previa se observó una mortalidad rápida de los ostiones con los detritos después de fermentar. La mezcla se filtró a través de una malla de 25 μm . El líquido recuperado se mantuvo a 4°C para alimentar diario los ostiones durante una semana. Cada semana se produjo un nuevo lote de detritos, de los cuales, se realizó un conteo celular en cámara Neubauer y se secaron 10 mL en horno a 40°C con el fin de determinar el peso seco de la producción. Adicionalmente, el detrito filtrado se secó y se recubrió con oro por ionización a 40 mA durante 35 s (Desk.11, Denton Vacuum Inc., Moorestown, NJ, EE. UU.). Se tomaron fotografías de microscopía electrónica (Hitachi s-3000 N High Technologies, Japón) con aumento 5000x para estimar el tamaño promedio de las partículas. La imagen de microscopía electrónica se analizó con el software ImageJ®; La escala se

ajustó con el comando “Analyse/Set Scale”, de acuerdo con la escala de la fotografía microscópica. Luego, la imagen se modificó de la siguiente manera: “Image/Type/8-bit”, “Image/Adjust/Brightness& Contrast” con el parámetro “Auto”, “Adjust/Threshold” con los parámetros predeterminados, B&N y dark background, “Process/Binary/FillHoles”. Finalmente, se determinó el tamaño de partícula mediante el comando “Analyse/Analyse Particles”, se exportaron los valores del área de los detritos a un archivo Excel y se estimó el diámetro de cada partícula.

6.2.2.2 Diseño y evaluación de los regímenes de alimentación experimentales

La dieta control (D0) fue con la microalga *Chaetoceros calcitrans* proporcionada por el Laboratorio de fitoplancton en CIBNOR, y cultivada con el medio f2. Se realizaron conteos celulares diarios en cámara Neubauer (previamente se cuantificó en peso seco de la microalga de acuerdo al conteo) y se ajustó el subministro de alimento para guardar las proporciones de microalga:detrito en base seca. Las dietas experimentales se formularon mediante la siguiente sustitución progresiva 25%, 50%, 75% y 100% del peso seco de la microalga con el detrito de *U. lactuca* (denominadas a continuación D25, D50, D75 y D100 respectivamente).

Se realizaron análisis de composición proximal de la harina de *U. lactuca*, de su detrito y de la microalga de conformidad con lo descrito en la sección 0.

6.2.2.3 Ensayo de alimentación

Durante 35 días, cada dieta se evaluó por cuadruplicado en 10 ostiones *C. gigas* con 3.4 ± 0.6 g de peso vivo promedio inicial (PVI), 0.09 ± 0.01 g de peso seco inicial (PSI) y 3.8 ± 0.3 cm de longitud inicial (LI) repartidos en bolsas 15 x 15 cm de malla plástica de 5 mm y colocados en tanques de 70 L. Cada uno de los tanques se llenó con agua marina limpia (38.5 ± 0.4 g.L⁻¹) filtrada (1 µm) y esterilizada por luz UV y fueron provistos de aireación constante (oxígeno disuelto > 4 mg.L⁻¹), control de temperatura (calentadores de titanio de 100W, 21.2 ± 0.7 °C) y un pH promedio de 7.6 ± 0.6 .

6.2.2.4 Parámetros zootécnicos

Después de 35 días, el rendimiento del ostión se determinó de acuerdo con los siguientes parámetros: supervivencia, peso vivo final (PVF), peso seco final (PSF), longitud final (LF), ganancia de peso seco (GPS), tasa de crecimiento específica (TCE), de conformidad con las ecuaciones que están descritas en la parte 0, y con el índice de condición de Lawrence y Scott (1982):

Ecuación (6)

$$ILS = \frac{PSF}{PVF-PC}$$

6.2.2.5 Isótopos estables, contribución de los nutrientes en el crecimiento y tiempos de residencia elemental en los tejidos.

Antes de empezar el ensayo, se tomaron muestras del manto de 7 ostiones. Durante el experimento, se muestreó los mantos de 3 ostiones por tratamiento los días 5, 7, 14, 21 y 28 y de 5 ostiones el día 35, antes de ser alimentados. El manto de cada ostión se limpió por enjuague con agua dulce. Las muestras de macroalgas *U. lactuca*, detritos de *U. lactuca*, microalgas y manto de ostiones se secaron a 60°C y se molieron manualmente en un mortero para obtener un polvo fino y homogéneo.

El análisis de isótopos estables se realizó de acuerdo con el método descrito por Gamboa-Delgado, *et al.* (2011). Brevemente, los lípidos en las muestras se extrajeron con el fin de estandarizar las lecturas de los isótopos de carbono, los cuales presentaron valores $\delta^{13}\text{C}$ muy bajos en los lípidos. Para este fin, las muestras de material molido se suspendieron en una solución 50:50 de cloroformo-metanol durante 2 h. Las muestras se trataron con solvente dos veces, se secaron al horno (60°C hasta peso constante), se homogeneizaron nuevamente y mantuvieron en un desecador (Beaudoin *et al.*, 2001). Se dejó una serie de muestras sin tratar para interpretar los resultados en los valores de $\delta^{15}\text{N}$. Las muestras pesaron (1 mg \pm 0.1 mg) y se envasaron en microcápsulas de estaño (D1008; Elemental Microanalysis Ltd., Okehampton, Reino Unido) y estas a su vez se organizaron en microplacas tipo ELISA. Los análisis elementales

e isotópicos se realizaron como se describe en Gamboa-Delgado y Vay (2009). Los resultados isotópicos se expresaron en notación delta (δ), que se definió como desviaciones en partes por mil (‰) de los valores $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de los materiales de referencia estándar (beelemita Pee Dee y nitrógeno atmosférico, respectivamente). Las mediciones repetidas de un estándar de calibración indicaron que la precisión del instrumento (SD) fue de 0.15 ‰ ($\delta^{13}\text{C}$) y 0.08 ‰ ($\delta^{15}\text{N}$). Una vez obtenidos los datos isotópicos y elementales, se aplicó un modelo de mezclado isotópico de 2 fuentes y 1 isótopo (Phillips y Gregg, 2001) para estimar las proporciones relativas de carbono y nitrógeno en la dieta que contribuyeron al crecimiento de los camarones y que se originan del detrito de *U. lactuca* o de la harina de pescado. Por medio de las dietas control (D0 y D100) se estimaron las diferencias isotópicas (factores de discriminación isotópica) de los camarones alimentados solo con harina de pescado como fuente de proteína y solo con detritos de *U. lactuca* después de alcanzar el equilibrio isotópico. Para obtener una estimación de la contribución relativa del nitrógeno y carbono derivados de ambos ingredientes al crecimiento de los detritos y harina de pescado, los valores promedio de isótopos estables duales para cada tratamiento y cada camarón se corrigieron a través de los factores de discriminación isotópica. Se calcularon y compararon las distancias euclidianas entre los valores isotópicos duales del detrito de *U. lactuca*, de la harina de pescado y de los camarones de cada tratamiento de los animales experimentales, los valores isotópicos obtenidos en cada tratamiento fueron incorporados al modelo de mezclado isotópico. También se calculó la contribución relativa de materia seca aportada por cada fuente de alimento. Las contribuciones de materia orgánica estimadas se obtuvieron al corregir respecto a la concentración elemental (C y N) de cada fuente de alimento y mediante la ecuación propuesta por Fry (2006). Los cambios isotópicos determinados en diferentes tiempos se integraron en un modelo exponencial que asocia el crecimiento y el tiempo (Hesslein *et al.*, 1993) (Ecuación 6). El modelo permite obtener la magnitud de la tasa de cambio isotópico en relación con el crecimiento (k) y la tasa de renovación metabólica (m). C_n es el valor isotópico en equilibrio con el nuevo alimento, C_0 el valor isotópico al inicio del ensayo y C el valor isotópico en el tiempo t . El parámetro m es desconocido y se estimó por medio de regresión no lineal iterativa. Por medio de la integración de los parámetros k y m en la ecuación 7 (MacAvoy *et al.*, 2005), se estimó el

tiempo medio de residencia en tejido (t_{50}), es decir, el tiempo necesario para reemplazar la mitad del carbono o nitrógeno estructural en tejido muscular después de consumir una nueva dieta.

$$\begin{array}{ll} \text{Ecuación (7)} & \text{Ecuación (8)} \\ C = C_n + (C_0 - C_n)e^{-(k+m)t} & t_{50} = \frac{\ln 2}{m+k} \end{array}$$

Se estimaron las proporciones relativas de carbono y nitrógeno en la dieta que contribuyeron al crecimiento de los ostiones y que se originan o del detrito de *U. lactuca* o de la microalga. Se tomaron como valores control las diferencias isotópicas de los ostiones alimentados solo con la microalga y solo con detritos de *U. lactuca* después de alcanzar el equilibrio isotópico. Para obtener una estimación de la contribución relativa de la materia seca al crecimiento de los detritos y microalga, los valores promedio de isótopos estables duales para cada tratamiento y cada ostión se corrigieron a través de los factores de discriminación isotópica.

6.2.2.6 Actividad enzimática digestiva

Al final de la prueba de alimentación, se tomaron muestras de la glándula digestiva de 3 ostiones por tratamiento, se pesaron y se conservaron a -80°C hasta realizar los análisis de actividad enzimática digestiva.

En tubos de 2 mL se colocaron las glándulas digestivas con agua destilada (dilución 1:10), y se homogeneizaron en un fastprep-24 (MP Biomedicals) durante 2 ciclos de 30 segundos a 30,000g, seguido de una centrifugación a 15,000g durante 15 minutos a 5°C . Se separó el sobrenadante para determinar la actividad de la proteasa, aminopeptidasa, lipasa y amilasa.

El contenido de proteína y las actividades específicas de la lipasa y de la amilasa se determinaron como se describió en la sección 0.

La actividad de la proteasa se determinó mediante el método descrito por Kunitz (1947), mediante el uso de caseína como sustrato, a pH 6.5, 25°C y 60 minutos de incubación. La

absorbancia se midió a 280 nm y se usó el coeficiente de extinción molar de la tirosina. Una unidad de proteasa corresponde a la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol de tirosina por minuto equivalente.

La actividad de aminopeptidasa se determinó según Maroux *et al.* (1973), mediante el uso de L-leucina-p-nitroanilida como sustrato, a pH 6.5, 25°C y 10 minutos de incubación. La absorbancia se midió a 405 nm y se utilizó el coeficiente de extinción molar de p-nitroanilida. Una unidad de aminopeptidasa corresponde la cantidad de enzima requerida para hidrolizar 1 μmol de L-leucina-p-nitroanilida por minuto.

Las actividades específicas se expresaron en $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína.

6.2.2.7 Análisis de los datos

Se verificó la normalidad de todos los datos con la prueba de Shapiro y la homocedasticidad con la prueba de Bartlett, mediante el uso del software R versión 3.3.0. Los datos se sometieron a una ANOVA de un factor: porcentaje de sustitución de microalga por detritos; seguido, en caso de corresponder, de una prueba de comparación múltiple de Tukey (95% de confianza).

6.3 Objetivo 3: Evaluar el efecto antiviral de la macroalga en el sistema IMTA contra el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV)

Con este objetivo se determinó si existe un efecto inmunoestimulante del detrito de *Ulva lactuca* incluido en el alimento del camarón *P. vannamei* contra el virus de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés).

6.3.1 Producción de los detritos y formulación de los alimentos experimentales

Ulva lactuca se cultivó, cosechó y procesó en detritos según los métodos descritos previamente en la sección 0.

Se evaluaron 3 tratamientos de alimentación en camarones: un alimento de referencia (C), una dieta constituida de 50% de alimento de referencia y *Ulva lactuca* fresca en cantidad ilimitada (FLac) y un alimento con 20% de inclusión de los detritos de *U. lactuca* en el alimento (DLac20). El alimento control y el alimento con detritos se formularon para cumplir con los requisitos nutricionales del camarón, mediante la sustitución de las harinas de pescado y de trigo en la fórmula (**Tabla 6**).

La elaboración de los alimentos se realizó como fue descrito en la sección 0. Se realizaron análisis de composición proximal de la harina de *U. lactuca*, de su detrito y de los alimentos procesados de acuerdo con los procedimientos descritos en la sección 0.

Tabla 6. Composición de los alimentos experimentales (g.kg⁻¹).

Ingredientes	C	DLac20
Harina de pescado ¹	195	156
Harina de soya ²	315	315
Harina de trigo ³	407.5	246.5
Lecitina de soya ⁴	40	40
Aceite de pescado ¹	25	25
Grenetina ⁵	10	1
Premezcla de vitamina y minerales ⁶	5.3	5.3
Vitamina C ⁷	1	0.2
Cloruro de colina ⁸	1	1
Antioxidante BHT ⁸	0.2	10
Detritos <i>Ulva lactuca</i>		200

^{a, b, c, d, e, f, g, h} Consultar Tabla 5

6.3.2 Ensayo de alimentación

Los camarones sanos, *P. vannamei* se consiguieron en una granja local de camarones en Hermosillo, Sonora, México. Antes de comenzar el experimento, los camarones se seleccionaron al azar y se tomaron muestras de hemolinfa con una jeringa que contenía un anticoagulante en proporción 50:50 (Vargas-Albores *et al.*, 1993). La mezcla se centrifugó 10 min a 100 rpm y el ADN del precipitado se extrajo siguiendo las instrucciones del kit de reactivo DNAzol®. Mediante

qPCR se realizó la detección de WSSV mediante el uso de las instrucciones SYBR® Green PCR Master Mix de la marca BioRad® para verificar que fueran libres de WSSV.

Cada tratamiento se evaluó por triplicado. Se distribuyeron aleatoriamente 20 camarones *P. vannamei* con 8.3 ± 0.9 g de peso promedio inicial (PI) en tanques de fibra de vidrio de 50 L. La temperatura y el oxígeno disuelto del agua marina limpia se mantuvieron a $29.3 \pm 0.2^\circ\text{C}$ y mayor a $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente.

Los camarones fueron alimentados con una tasa inicial de 10% de biomasa y posteriormente se alimentaron *ad libitum*. La cantidad de alimento diaria se dividió en dos raciones proporcionadas a las 10:00 y 14:30. Los restos de alimento se evaluaron en porcentaje 2 horas después de la hora de alimentación. Cada mañana, la tasa de alimentación se ajustó para cada tanque de acuerdo con el consumo. Las heces, los restos de alimento y las mudas se eliminaron mediante una bomba de agua.

6.3.3 Reto infeccioso

Para la realización del reto infeccioso, se realizó una titulación de WSSV, utilizando un inóculo viral obtenido a partir de organismos infectados naturalmente en una granja comercial del estado de Sonora, México. La titulación viral se realizó para obtener una DL_{50} /72 h. Se evaluaron 3 concentraciones del inóculo de WSSV conteniendo 5.71×10^4 , 5.71×10^3 y 5.71×10^2 copias. μL^{-1} (Wu *et al.*, 2005; Escobedo-Bonilla *et al.*, 2006), inyectando de forma intramuscular con 50 μL a 6 camarones de 5 gr por concentración. Se evaluó la supervivencia, tiempo de mortalidad y se confirmó la presencia del virus mediante qPCR, utilizando los primers VP28-140Fw (5' -AGG-TGT-GGA-ACA-ACA-CAT-CAA-G-3') y VP28-140Rv (5' -TGC-CAA-CTT-CAT-CCT-CAT-CA-3') (Mendoza-Cano y Sánchez-Paz, 2013). De acuerdo a los resultados de supervivencia, la concentración de 5.71×10^2 copias. μL^{-1} presentó una DL_{50} a las 72 h post-infección, por lo tanto, fue seleccionada para el reto infeccioso.

Una vez titulado el inóculo viral y después del período de alimentación con los diferentes tratamientos, se realizó una inyección intramuscular con 50 μL del inóculo de WSSV con concentración de 5.71×10^2 copias. μL^{-1} . Mientras tanto, los camarones de un triplicado con el alimento de referencia fueron inyectados con 50 μL de solución salina y conservados como control negativo (C-) en oposición al control infectado (C+).

6.3.4 Supervivencia, resistencia, parámetros fisiológicos y replicación viral

La supervivencia se midió durante 7 días post infección en 10 camarones por réplica. El índice de mortalidad acumulada (ICA) se calculó (ecuación 9) mediante la suma del número de camarones muertos en cada intervalo de tiempo durante el período experimental de la siguiente manera, donde D es el número de camarones muertos en el momento respectivo x (en días). Cuanto mayor sea el valor de ICA, menor será la resistencia al virus.

Ecuación (9)

$$ICA = \sum_{x=1}^7 \frac{D}{x}$$

Mediante el uso del valor de ICA, se calculó la reducción en mortalidad (%) de acuerdo al método de Immanuel y Palavesam (2001). A las 0, 24 y 48 horas post infección (hpi), se muestrearon 100 μL de hemolinfa de 3 camarones por réplica con una jeringa que contenía 100 μL de anticoagulante (Vargas-Albores *et al.*, 1993). Se evaluaron los parámetros fisiológicos siguientes: proteína, lactato, glucosa, triglicéridos y colesterol con los kits The Randox[®] assay.

6.3.5 Análisis de los datos

Se verificó la normalidad de todos los datos con la prueba de Shapiro y la homocedasticidad con la prueba de Bartlett, mediante el uso del software R versión 3.3.0. Los datos se sometieron a una ANOVA de un factor: forma del alga (fresca o detrito en el alimento); seguido, en caso de corresponder, de una prueba de comparación múltiple de Tukey (95% de confianza).

6.4 Objetivo 4: Evaluar la productividad y la dinámica de flujo de nutrientes del sistema de cultivo integrado multitrófico IMTA

Este objetivo final aunó los resultados y las conclusiones obtenidas en los objetivos previos. Se determinó la eficiencia de dos tipos de sistemas integrados multitróficos a través de la productividad de los camarones, ostiones y macroalgas, así como de la dinámica del flujo de nutrientes y de las comunidades microbiológicas en los sistemas diseñados.

6.4.1 Producción de los detritos y formulación de los alimentos experimentales

Ulva lactuca se cultivó en agua residual de un cultivo de jurel, según el método descrito en la sección 0. Se cosechó la biomasa de alga y procesó su biomasa en detritos mediante la combinación de los métodos descritos en las secciones 0 y 0. En resumen, se mezcló la harina de alga con agua destilada 1:10 y se aplicó un tratamiento ácido (pH 2.0) por 1 hora en agitación a 100 rpm a 40°C. Se ajustó el pH entre 4.8 y 5.5 y la temperatura a 55°C. Se adicionó 5% p/v de celulasa y se agitó a 100 rpm 1 hora a 55°C para la digestión enzimática. La mezcla se filtró a través de una malla de 25 µm. El líquido recuperado se congeló a -4°C para alimentar diario los ostiones. A la mezcla restante, se agregaron *Lactobacillus plantarum* y *Saccharomyces cerevisiae* a una concentración final de 1×10^7 ufc.mL⁻¹ cada uno. Se incubó durante 48 horas a 35°C en agitación constante de 100 rpm. El producto final se secó en horno a 60°C durante 24 horas a 20% de humedad y se mantuvo a 4°C en bolsas refrigeradas hasta la preparación de los alimentos para los camarones.

Los alimentos control (C) y con 20% de detritos de *U. lactuca* como sustituto de harina de pescado (DLac20), se formularon para cumplir con los requisitos nutricionales del camarón, mediante la sustitución de las harinas de pescado y de trigo en la fórmula (**Tabla 7**) y se elaboró como fue descrito previamente en la parte 0.

Se realizaron análisis de composición proximal de la harina de *U. lactuca*, de su detrito (por separado la parte líquida para el ostión y la mezcla para el camarón) y de los alimentos procesados de acuerdo a los procedimientos descritos previamente en la sección 0.

Tabla 7. Composición de los alimentos experimentales ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$): control (C) y con 20% de detritos de *U. lactuca* como sustituto de harina de pescado (DLac20).

Ingredientes	C	DLac20
Harina de pescado ¹	220	176
Harina de soya ²	320	320
Harina de trigo ³	377.5	221.5
Lecitina de soya ⁴	40	40
Aceite de pescado ¹	25	25
Grenetina ⁵	10	10
Premezclas de vitamina y minerales ⁶	5.3	5.3
Vitamina C ⁷	1	1
Cloruro de colina ⁸	1	1
Antioxidante BHT ⁸	0.2	0.2
Detritos <i>Ulva lactuca</i>	-	200

^{a, b, c, d, e, f, g, h} Consultar Tabla 5

6.4.2 Sistemas experimentales

Se diseñaron 2 sistemas IMTA con sus sistemas de monocultivo respectivos (**Figura 4**):

- Sistema IMTA sin detritos (IMTA): 150 camarones *P. vannamei* de 0.26 ± 0.01 g de peso promedio inicial (PI) se colocaron en tanques de 800 L (equivalente a $200 \text{ camarones}\cdot\text{m}^{-2}$). Fueron alimentados dos veces al día (10:00 a.m. y 2:00 p.m.) con un alimento control. Se inició con una tasa de alimentación del 10% de la biomasa y posteriormente se ajustó la dosis diaria *ad libitum* con base a los restos de alimento no consumido. El siguiente elemento del sistema lo constituye un tanque de 450 L con 15 ostiones *C. gigas*, de peso vivo inicial 0.55 ± 0.02 g y longitud inicial 1.81 ± 0.02 cm, colocado en bolsas 15 x 15 cm de malla plástica de 5 mm. Se alimentaron una vez al día, con 16 litros de microalgas *Chaetoceros calcitrans* a una concentración de 1.25×10^6 células. mL^{-1} . El último tanque del sistema fue de 400 L con 100 ± 0.02 g de biomasa inicial de macroalga *U. lactuca*.

- Sistema IMTA con detritos (IMTA-D): 150 camarones *P. vannamei* de 0.26 ± 0.01 g de peso inicial (PI) se colocaron en tanques de 800 L (equivalente a $200 \text{ camarones.m}^{-2}$). Fueron alimentados dos veces al día (10:00 a.m. y 2:00 p.m.) con un alimento experimental en el cual se incluyó 20% de detritos de *U. lactuca* como sustituto de harina de pescado (DLac20). Se inició con una tasa de alimentación del 10% de la biomasa, la cual posteriormente fue ajustada *ad libitum* con base en los restos de alimento no consumido. El siguiente elemento del sistema constituye en un tanque de 450 L con 15 ostiones *C. gigas*, de peso vivo inicial 0.57 ± 0.05 g y longitud inicial 1.82 ± 0.02 cm, colocados en bolsas 15 x 15 cm de malla plástica de 5 mm. Se alimentaron una vez al día, con 50% (equivalencia en peso seco) de detritos de *U. lactuca* y 50% de microalgas *Chaetoceros calcitrans* a una concentración de 1.25×10^6 células.mL⁻¹. El último tanque del sistema fue de 400 L con 100 ± 0.02 g de biomasa inicial de macroalga *U. lactuca*.
- Sistema intensivo de monocultivo de camarones (CM): 150 camarones *P. vannamei* de 0.26 ± 0.01 g de peso inicial (PI) se colocaron en tanques de 800 L (equivalente a $200 \text{ camarones.m}^{-2}$). Fueron alimentados dos veces al día (10:00 a.m. y 2:00 p.m.) con un alimento control (C). Se inició con una tasa de alimentación diaria del 10% de la biomasa y posteriormente fue ajustada *ad libitum* con base en los restos de alimento no consumido.
- Sistema de monocultivo de ostiones (OM): 15 ostiones *C. gigas*, de peso vivo inicial 0.56 ± 0.06 g y longitud inicial 1.82 ± 0.03 cm, se colocaron en bolsas 15 x 15 cm de malla plástica de 5 mm y se cultivaron en tanques de 450 L. Se alimentaron una vez al día, con 16 L de microalgas *Chaetoceros calcitrans* a una concentración de 1.25×10^6 células.mL⁻¹.
- Sistema de monocultivo de macroalgas fertilizadas (AF): 100 ± 0.02 g de macroalga *U. lactuca* se propagaron en tanques de 400 L provistos de un difusor de aire de 3 pulgadas y se fertilizaron a una concentración constante de 0.5 ppm de amonio en el agua complementada con medio f2 (Guillard, 1975) sin metasilicato de sodio.

Las condiciones de todos los cultivos se mantuvieron a una temperatura de $29.3 \pm 0.8^\circ\text{C}$, con un nivel de oxígeno disuelto superior a $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y un fotoperíodo natural. En los sistemas multitróficos, el agua residual se transfirió por gravedad entre cada tanque a un flujo promedio de $45 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ (135% recirculación diaria) con una bomba sumergible en un tanque residual final permitió obtener un sistema de recirculación cerrado. El recambio de agua se empezó con una tasa de 10% diario ajustándolo según la carga en nutrientes en los sistemas de monocultivo cuando fue necesario. El ensayo se procesó por cuadruplicado y duró 8 semanas.

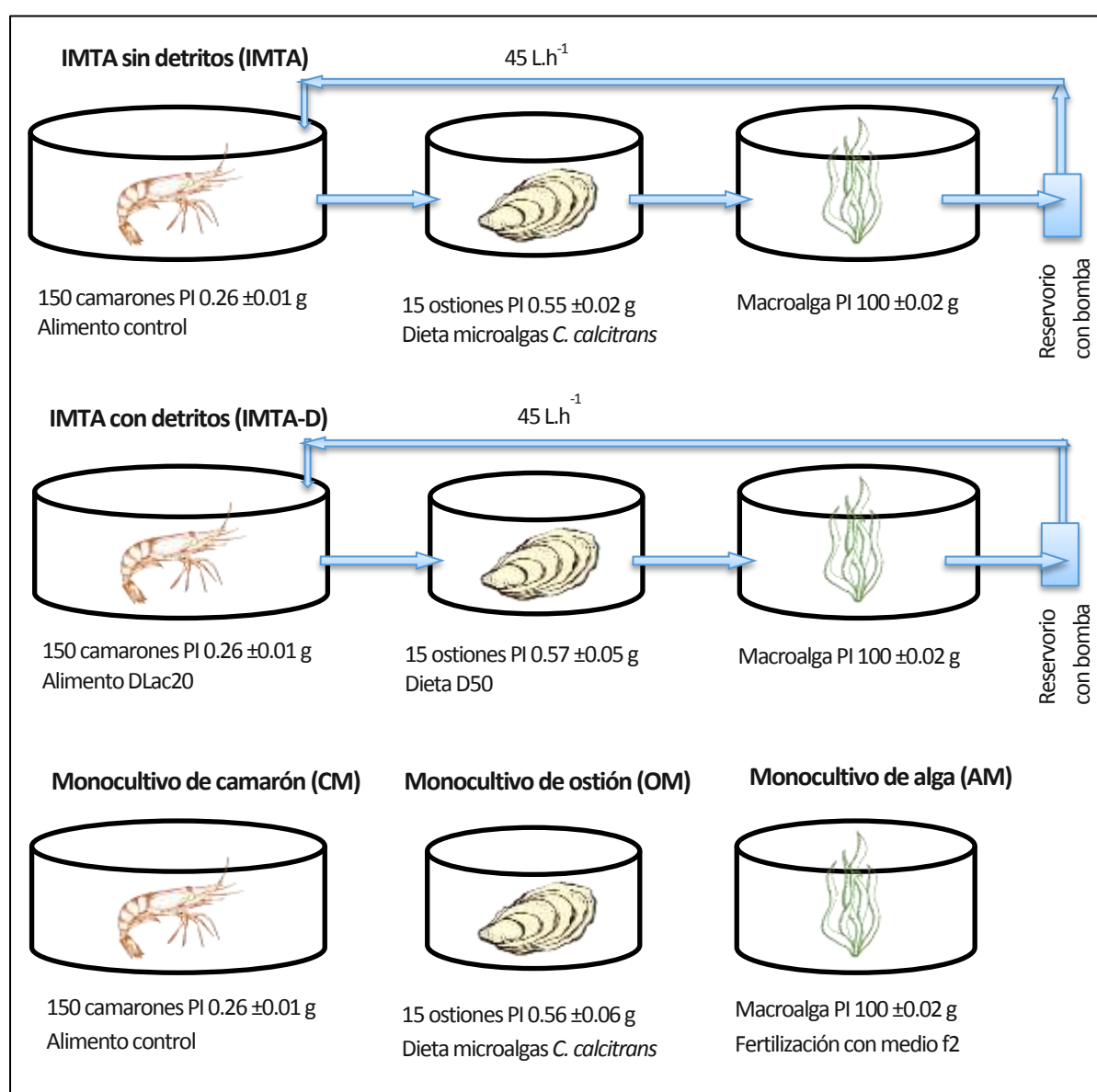


Figura 4. Diagrama de los sistemas experimentales IMTA con camarón y ostión.

6.4.3 Agua residual

Semanalmente, se realizó un seguimiento de la concentración en amonio, nitrito, nitrato y fosfato por medio de kits API® con el fin de vigilar la calidad de agua en los sistemas y ajustar los recambios de agua cuando fue necesario. También, se determinó la concentración en partículas sedimentables totales (mL.L^{-1}) con conos Imhoff.

6.4.4 Productividad

Al final del ensayo, se calculó la productividad de los ostiones, de los camarones y de la macroalga como previamente se describió en las secciones 0 y 0.

6.4.5 Análisis de los datos

Considerando los resultados de composición, de crecimiento y de biorremediación del agua, se establecieron los flujos de nutrientes (N y P) en los sistemas IMTA de *P. vannamei*, *C. gigas* y *U. lactuca*. Se verificó la normalidad de todos los datos con la prueba de Shapiro y la homocedasticidad con la prueba de Bartlett, mediante el uso del software R versión 3.3.0. Los datos se sometieron a una ANOVA de un factor: tipo de sistema de cultivo; seguido, en caso de corresponder, de una prueba de comparación múltiple de Tukey (95% de confianza).

7. RESULTADOS

7.1 Objetivo 1: Evaluar la capacidad del ostión y las macroalgas para la remoción de nutrientes en el agua residual de cultivo hiper-intensivo de camarón

7.1.1 Ensayo 1: Capacidad del ostión para la remoción de los nutrientes en un sistema IMTA ostión-camarón y efecto en la microbiota digestiva de ambas especies

7.1.1.1 Calidad del agua

El agua de monocultivo de ostión (OM) presentó una carga de nutrientes significativamente ($P < 0.05$) menor que los otros dos sistemas durante los 30 días de experimento (**Figura 5**).

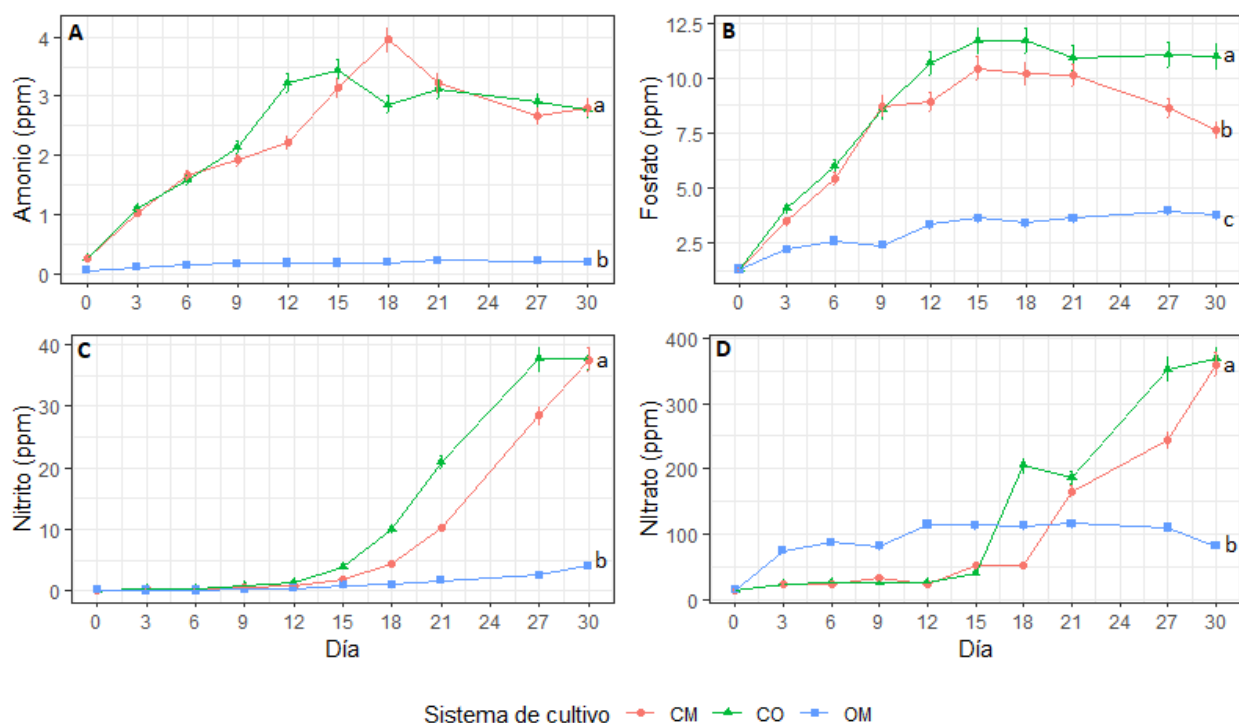


Figura 5. Concentración en (A) amonio, (B) fosfato, (C) nitrito y (D) nitrato en el agua de los sistemas de monocultivo de camarón (CM), monocultivo de ostión (OM) y cocultivo (CO) durante 4 semanas de cultivo.

En los tanques OM, los primeros 9 días, las concentraciones de fosfato, amonio y nitrato aumentaron hasta alcanzar una estabilidad con promedios de 3.7 ± 0.2 ppm, 0.2 ± 0.1 ppm y 107.2 ± 8.4 ppm, respectivamente. Mientras que, la concentración de nitrito aumentó continuamente hasta niveles de 4.1 ± 0.4 ppm.

Los nutrientes del agua de monocultivo de camarón (CM) y cocultivo (CO) mostraron variaciones similares a lo largo de las etapas de cultivo (**Figura 5**). Al final del período experimental, CO resultó en una mayor concentración de fosfatos (11.0 ± 0.5 ppm) en agua en comparación con CM (9.1 ± 0.7 ppm). Con respecto a los niveles de nitrito y nitrato, ambos fueron más altos para CO durante la mayor parte del experimento, sin embargo, al final del experimento, ambos sistemas terminaron con valores de concentración similares para los dos metabolitos (37.7 ± 0.1 ppm y 360.0 ± 7.7 ppm, respectivamente).

En términos de partículas sedimentables totales en el agua, los resultados mostraron diferencias significativas entre los sistemas de cultivo ($P < 0.05$); CM acumuló hasta 3 mL.L^{-1} , mientras que CO resultó en 1.5 mL.L^{-1} y para OM, se registraron menos de 0.1 mL.L^{-1} de partículas sedimentables en el agua (**Figura 6**).

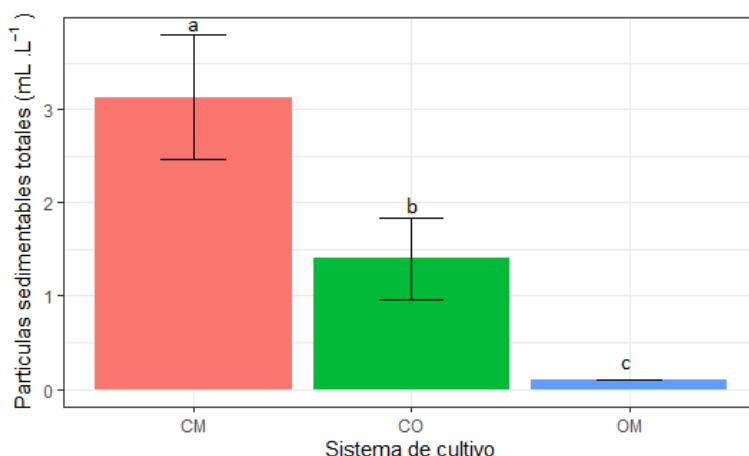


Figura 6. Concentración en partículas sedimentables totales en el agua de los sistemas de monocultivo de camarón (CM), monocultivo de ostión (OM) y cocultivo (CO) después de 4 semanas de cultivo.

En el sistema OM, se realizó la estimación de bacterias marinas heterotróficas (agar marino 2216) y *Vibrio* (agar TCBS), observando en agar marino una disminución en las unidades formadoras de colonia (UFC) al final del experimento (semana 4) comparado con el valor al inicio el experimento (semana 0) (**Figura 7**). El número total de UFC en agar marino y TCBS fue más alta en el agua de CO durante la última semana de cultivo, con promedios respectivos de

2.4×10^5 ufc.mL⁻¹ y 2.2×10^4 ufc.mL⁻¹, comparado con CM (1.6×10^5 ufc.mL⁻¹ y 1.0×10^4 ufc.mL⁻¹, respectivamente).

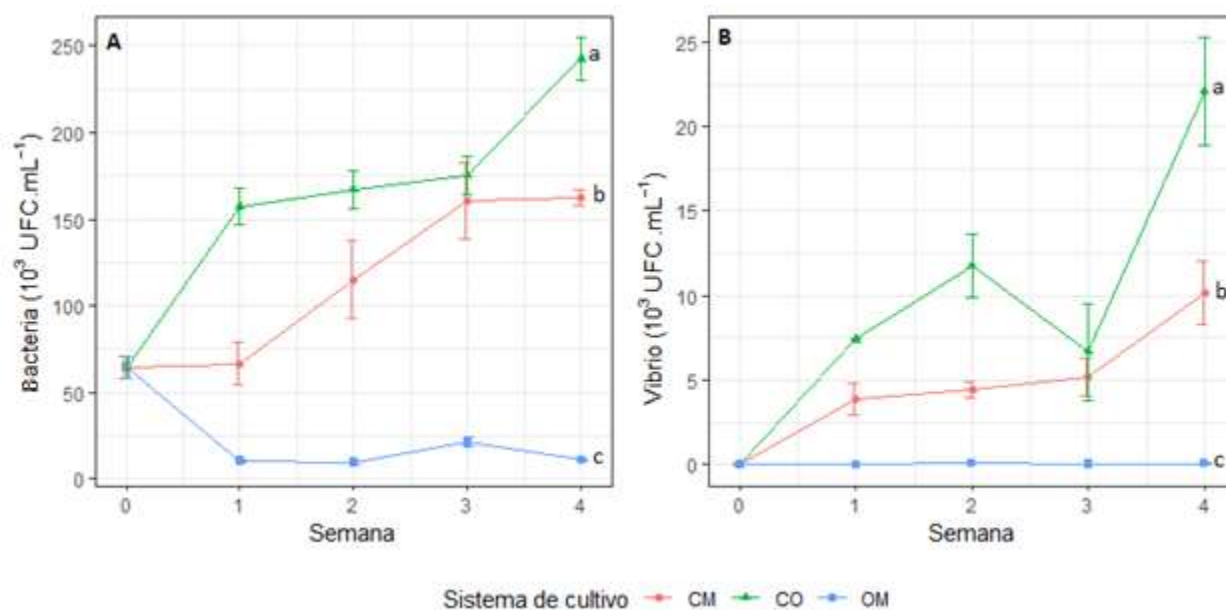


Figura 7. (A) Valor promedio de unidades formadoras de colonia en agar marino 2216 (bacterias marinas heterotróficas) y **(B)** agar TCBS (*Vibrio* sp.) en el agua de sistemas de monocultivo de camarón (CM), monocultivo de ostión (OM) y cocultivo (CO) durante 4 semanas de cultivo.

La presencia del ostión en el sistema de cultivo ocasionó cambios en la proporción del color de las colonias de *Vibrio* sp. obtenidas en agar TCBS a lo largo del experimento (**Figura 8**). En CM, las colonias amarillas fueron dominantes, mientras que, a partir de la cuarta semana en OM y CO dominaron las verdes.

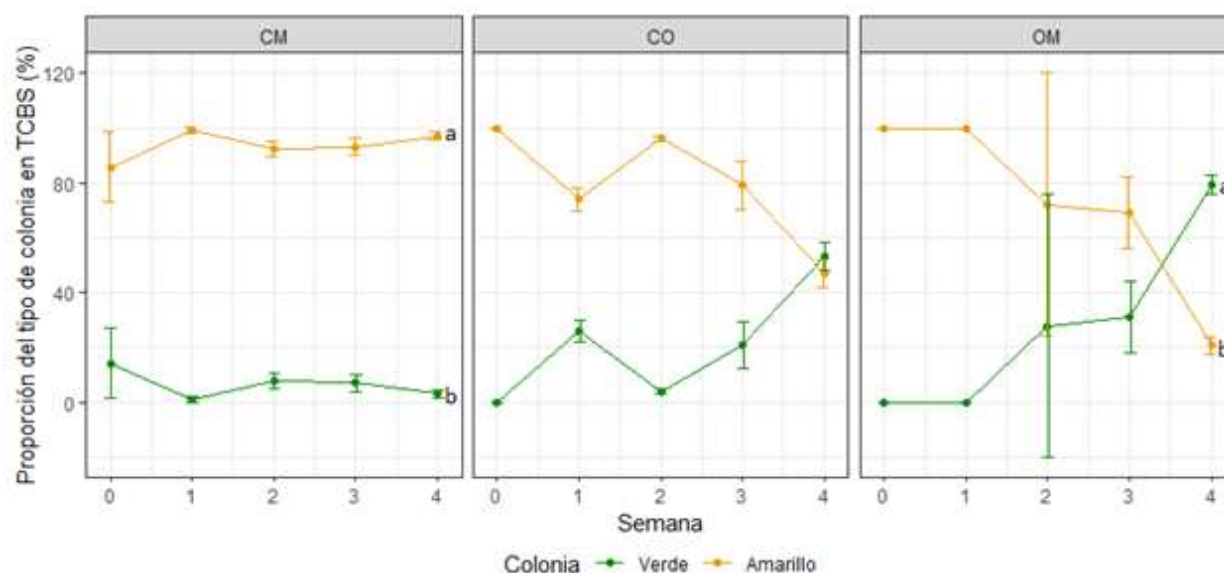


Figura 8. Proporción del tipo de colonia bacteriana del género *Vibrio* sp. en agar TCBS en el agua de sistemas de monocultivo de camarón (CM), monocultivo de ostión (OM) y cocultivo (CO) durante 4 semanas de cultivo.

7.1.1.2 Parámetros zootécnicos

Se observó un mayor peso promedio final de *P. vannamei* en el sistema de cocultivo (CO: 2.73 \pm 0.07 g) en comparación con el monocultivo (SM: 2.47 \pm 0.13 g) ($p < 0.1$; **Tabla 8**). El FCA fue menor para CO que para CM, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$).

Tabla 8. Parámetros zootécnicos de *P. vannamei* en sistemas de monocultivo (CM) y de cocultivo (CO).

	CM	CO
Supervivencia (%)	94 \pm 0.6	94 \pm 0.3
Peso final PF (g)	2.47 \pm 0.13 ^b	2.73 \pm 0.07 ^a
Ganancia de peso GP (%)	469 \pm 38	514 \pm 15
Biomasa (g)	361 \pm 16 ^b	398 \pm 11 ^a
TCE	6.20 \pm 0.23	6.48 \pm 0.09
CI (g)	2.83 \pm 0.04	2.93 \pm 0.06
FCA	1.40 \pm 0.10	1.28 \pm 0.04

Ambos sistemas dieron como resultado una supervivencia del camarón del 94%, sin embargo, se observó una disminución en la supervivencia de *C. gigas* (83 \pm 4%) en el CO a partir del día 27

(Tabla 9). No se observó diferencia en el peso final en los ostiones al final del experimento entre los tratamientos OM y CO ($P > 0.05$).

Tabla 9. Parámetros zootécnicos del ostión *Crassostrea gigas* en sistemas de monocultivo (OM) y de cocultivo (CO).

	OM	CO
Supervivencia (%)	100 ± 0 ^a	83 ± 4 ^b
Peso inicial PI (g)	1.55 ± 0.01	1.55 ± 0.01
Peso final PF (g)	1.61 ± 0.01	1.57 ± 0.01
Ganancia de peso GP (%)	4.03 ± 1.38 ^a	1.20 ± 1.51 ^b

El estudio de las correlaciones demostró que la mortalidad de los ostiones está principalmente correlacionada con las concentraciones de nitrito (-72.2%) y nitrato (-70.5%) en el agua del sistema de cocultivo CO.

7.1.1.3 Comunidades bacterianas digestivas

Las comunidades bacterianas de las glándulas digestivas de los ostiones en CO demuestran la mayor diversidad α (13.8 ± 3.5) mientras que las pertenecientes a OM resultan en la más baja (2.4 ± 0.5) ($P < 0.05$). Para los camarones, la diversidad α no presentó una diferencia significativa entre los sistemas de cultivo ($P > 0.05$) (Figura 9A).

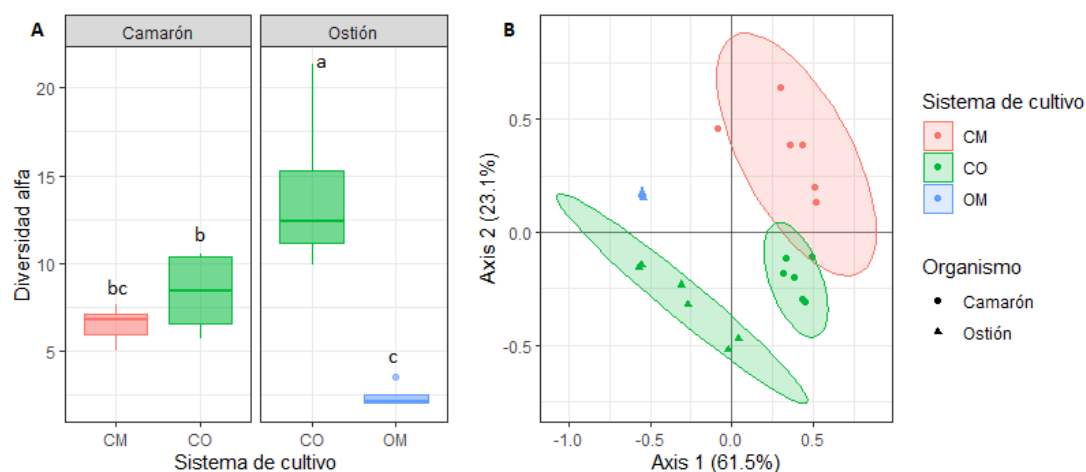


Figura 9. (A) α -diversidad y (B) análisis de componentes principales (ACP) en 2 dimensiones de la β -diversidad de las comunidades bacterianas en la glándula digestiva de *C. gigas* y en el intestino de *P. vannamei* cultivados 30 días en sistemas de monocultivo de ostión (OM), de camarón (CM) y de cocultivo (CO).

El análisis de componentes principales (ACP) de la diversidad β (**Figura 9B**) reveló que las muestras de microbiota intestinal de una misma especie y de un mismo sistema de cultivo se agruparon, donde OM presentó la menor variabilidad. Los dos primeros componentes explican el 84.6% de la variación. El primer componente (Axis 1) está correlacionado positivamente con OTU de *Rhodobacterales* ($90.2 \pm 1.2\%$) y negativamente con los OTU de *Sphingomonadales* ($91.3 \pm 1.7\%$) y *Rhizobiales* (92.6%). Como los camarones presentaron más *Rhodobacterales* y menos *Sphingomonadales* y *Rhizobiales* que los ostiones, el Axis 1 separa las muestras de camarones de las muestras de ostiones. El segundo componente está correlacionado negativamente con *Bacteroidetes* (73.0%), *Gammaproteobacteria* no clasificada (69.9%) y otras bacterias no clasificadas (72.3%). Considerando que el ostión como el camarón de CO presenta una mayor abundancia de *Bacteroidetes*, el Axis 2 permite diferenciar cada sistema de cultivo.

Los principales filos para ambas especies fueron, en orden descendente de abundancia: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, Bacterias no clasificadas, *Firmicutes* y *Verrucomicrobia* (**Figura 10**).

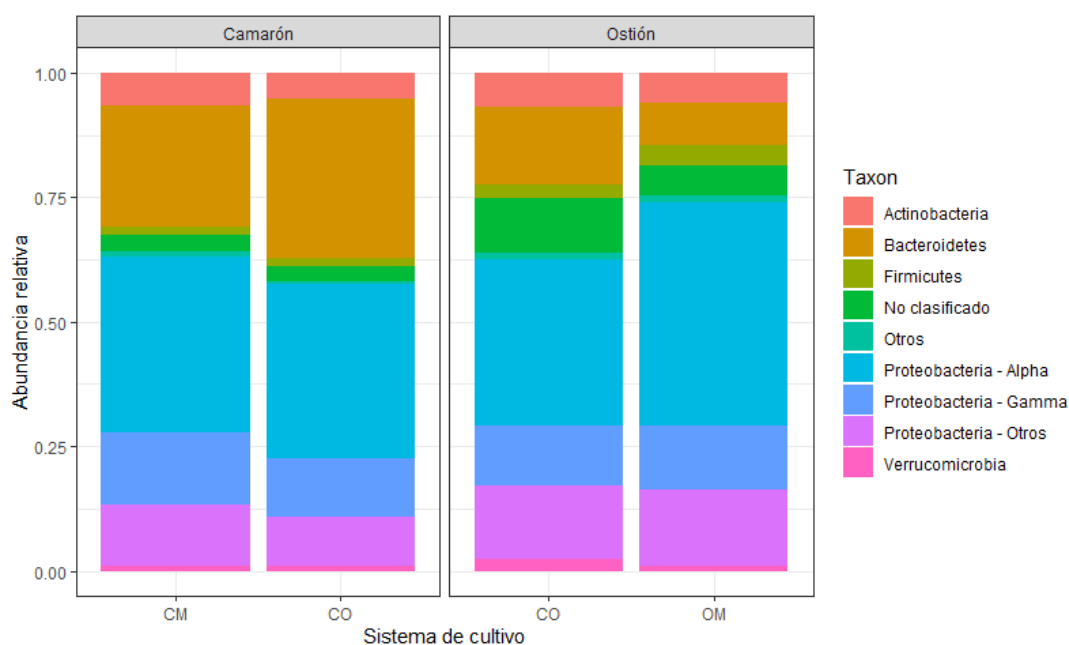


Figura 10. Abundancia relativa de los principales filos bacterianos en la glándula digestiva de *C. gigas* y en intestino de *P. vannamei* cultivados 30 días en sistemas de monocultivo de ostión (OM), de camarón (CM) y de cocultivo (CO).

Dentro de las Proteobacterias ($59.2 \pm 8.6\%$ y $66.0 \pm 7.6\%$, para camarones y ostiones respectivamente), los *Rhodobacterales* únicamente representados por la familia *Rhodobacteraceae* y los *Alteromonadales* fueron más abundantes en el intestino del camarón. Los *Caulobacterales*, *Rhizobiales*, *Rhodospirillales*, *Sphingomonadales* fueron más abundantes en la glándula digestiva de los ostiones (**Figura 11**). En cuanto a los *Bacteroidetes* en camarones ($28.0 \pm 10.8\%$) y ostiones ($12.2 \pm 5.1\%$), la mayor proporción estuvo representada por el orden de *Flavobacteriales* en el intestino de camarones ($82.6 \pm 4.3\%$) y en la glándula digestiva de los ostiones ($47.8 \pm 7.4\%$) seguido de *Sphingobacteriales*. Finalmente, los ostiones presentaron más *Firmicutes* ($3.56 \pm 1.70\%$) y *Verrucomicrobia* ($1.77 \pm 0.88\%$) que los camarones ($1.79 \pm 1.02\%$ y $1.01 \pm 0.33\%$, respectivamente).

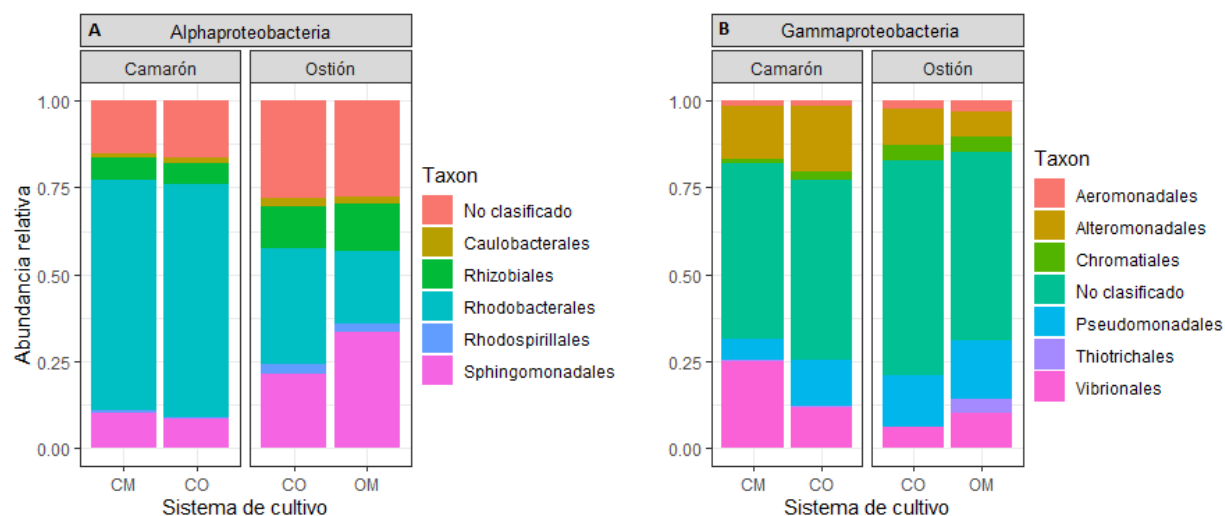


Figura 11. (A) Abundancia relativa de *Alphaproteobacteria* y **(B)** *Gammaproteobacteria* en la glándula digestiva de *C. gigas* y en el intestino de *P. vannamei* cultivados 30 días en sistemas de monocultivo de ostión (OM), de camarón (CM) y de cocultivo (CO).

Según el sistema de cultivo, las comunidades bacterianas digestivas del camarón de CM y CO diferían significativamente en la abundancia de los filos *Chlamydiae* ($0.21 \pm 0.12\%$ y $0.08 \pm 0.06\%$, respectivamente) y *Planctomycetes* ($0.41 \pm 11\%$ y $0.12 \pm 0.11\%$, respectivamente). Se mostraron pocas diferencias a nivel de orden: en el CO se observa una disminución de la abundancia de *Chlamydiales*, *Planctomycetales*, *Acidimicrobiales*, *Rhodobacterales* y *Vibrionales* totalmente representados por la familia *Vibrionaceae*, en el intestino del camarón.

Las comunidades bacterianas digestivas de los ostiones difirieron en abundancia relativa para tres filos. Las *Proteobacterias* fueron menos abundantes en la glándula digestiva de los ostiones de CO (60.2 ±3.7%) comparado a los de OM (73.0 ±2.3%), pero se observó una abundancia significativamente mayor de *Bacteroidetes* y *Verrucomicrobia* (15.4 ±4.3% y 2.4 ±0.6%, respectivamente) para los ostiones de CO en comparación con el tratamiento OM (8.3 ±2.7% y 1.0 ±0.3% respectivamente). Sin embargo, dentro de varios filos hubo variación en las proporciones de varios órdenes bacterianos según el sistema de cultivo. Los ostiones de OM presentaron significativamente más *Sphingobacteriales*, *Bacillales*, *Sphingomonadales*, *Thiotrichales* (*Piscirickettsiaceae*) y *Vibrionales* (*Vibrionaceae*) y menos *Rhodobacterales* (*Rhodobacteraceae*), *Flavobacteriales* (principalmente *Flavobacteriaceae*), *Verrucomicrobiales* y *Puniceicoccales* en comparación con los ostiones de CO.

7.1.1.4 Predicción funcional de comunidades bacterianas.

Se detectaron un total de 329 vías en la base de datos de ortólogos funcionales KEGG (KO). Las secuencias relacionadas con el metabolismo para ostiones y camarones representaron respectivamente el 52.8% y el 51.7% de las vías KEGG (nivel 1), seguido del procesamiento de información genética (17.9% y 20.0%), el procesamiento de información ambiental (15.6% y 15.3%), los procesos celulares (7.7% y 6.9%) y otras vías (5.9% y 6.0%).

En el caso de los camarones, 90% de las secuencias estaban relacionadas con 17 vías del nivel 2 (**Tabla 10**); 5 de ellos eran biológicamente relevantes ($P < 0.05$), 3 perteneciendo a las vías del metabolismo del camarón y 2 a las vías de procesamiento de información genética.

Tabla 10. Valores P (P-values), relevancia biológica (RB) y porcentaje de los OTU implicados en las predicciones funcionales de programa bioinformático PICRUSt de categorías KO de segundo nivel de los datos metagenómicos de intestino de *P. vannamei* cultivados 30 días en monocultivo (CM) y en cocultivo con *C. gigas* (CO).

Función nivel 1	Función nivel 2	RB	P-values	% de las secuencias
Metabolismo K09100	Metabolismo de aminoácidos K09105	0.47	2.87E-02	13.24
	Metabolismo de carbohidratos K09107	0.02	0.69	9.17
	Metabolismo energético K09102	0.02	0.62	6.09
	Metabolismo cofactores y vitaminas K09108	0.01	0.98	4.40
	Metabolismo de nucleótidos K09104	0.06	0.45	3.89
	Metabolismo lipídico K09103	0.53	1.64E-02	3.40
	Biosíntesis de metabolitos secundarios K09109+K09110	0.61	1.26E-02	3.02
	Metabolismo xenobiótico K09111	0.01	0.72	2.77
	Metabolismo de glicanos K09107	0.02	0.66	2.22
	Familias enzimáticas K09181	0.09	0.33	1.91
Procesamiento de información (PI) genética K09120	Replicación y Reparación K09124	0.59	4.23E-02	8.33
	Traducción K09122	0.62	2.04E-02	5.54
	Plegado, clasificación y degradación K09123	0.02	0.65	3.21
	Transcripción K09121	0.02	0.65	2.57
PI ambiental K09130	Transporte de membrana K09131	0.01	0.92	12.85
	Transducción de señales K09132	0.02	0.31	2.28
Procesos celulares K09140	Movilidad celular K09142	0.11	0.29	2.97

En el caso de los ostiones, 90% de las secuencias estaban relacionadas con 19 vías del nivel 2 (**Tabla 11**); 12 de ellas eran biológicamente relevantes ($P < 0.05$), 6 pertenecieron a las vías del metabolismo del ostión, 2 a las vías de procesamiento de información genética, 2 a las vías de procesamiento de información ambiental y 2 a las vías de procesos celulares.

Tabla 11. Valores P (P-values), relevancia biológica (RB) y porcentaje de los OTU implicados en las predicciones funcionales del programa bioinformático PICRUSt de categorías KO de segundo nivel de los datos metagenómicos de la glándula digestiva de *C. gigas* cultivados 30 días en monocultivo (OM) y en cocultivo con *P. vannamei* (CO).

Función nivel 1	Función nivel 2	RB	P-values	% de las secuencias
Metabolismo K09100	Metabolismo de aminoácidos K09105	0.04	0.50	13.11
	Metabolismo de carbohidratos K09101	0.42	4.10E-02	10.34
	Metabolismo energético K09102	0.11	0.27	5.98
	Metabolismo cofactores y vitaminas K09108	0.84	4.51E-03	4.52
	Metabolismo lipídico K09103	0.61	7.26E-03	3.68
	Metabolismo xenobiótico K09111	0.87	2.09E-04	3.45
	Metabolismo de nucleótidos K09104	0.37	3.56E-02	3.45
	Biosíntesis metabolitos secundarios K09109+K09110	0.61	1.35E-02	3.11
	Familias enzimáticas K09181	0.06	0.44	1.94
	Metabolismo de glicanos K09107	0.22	0.12	1.89
Procesamiento de información (PI) genética K09120	Replicación y Reparación K09124	0.15	0.22	8.06
	Traducción K09122	0.28	0.08	4.91
	Plegado, clasificación y degradación K09123	0.49	1.14E-02	2.97
	Transcripción K09121	0.90	8.95E-05	2.23
PI ambiental K09130	Transporte de membrana K09131	0.62	1.18E-02	11.71
	Transducción de señales K09132	0.84	5.26E-04	2.79
Procesos celulares K09140	Movilidad celular K09142	0.81	9.65E-04	4.06
	Transportadores de iones K04040	0.01	0.75	1.01
	Crecimiento y muerte celular K09143	0.01	1.28E-05	0.80

Si se considera el análisis de las principales predicciones funcionales del programa bioinformático PICRUSt (**Figura 12**), los camarones de cocultivo resultaron con una menor proporción de OTU implicados en el metabolismo lipídico y una mayor proporción de OTU implicados en la biosíntesis de metabolitos secundarios, metabolismo de aminoácidos, replicación y reparación del ADN, comparado con los camarones de monocultivo. Los ostiones de cocultivo presentaron menos OTU implicados en crecimiento y muerte celular, metabolismo de cofactores y vitaminas, metabolismo lipídico, metabolismo xenobiótico, movilidad celular y transducción de señales; y más OTU asociados la biosíntesis de metabolitos secundarios, metabolismo de nucleótidos y transcripción del ADN, comparado con el sistema de monocultivo.

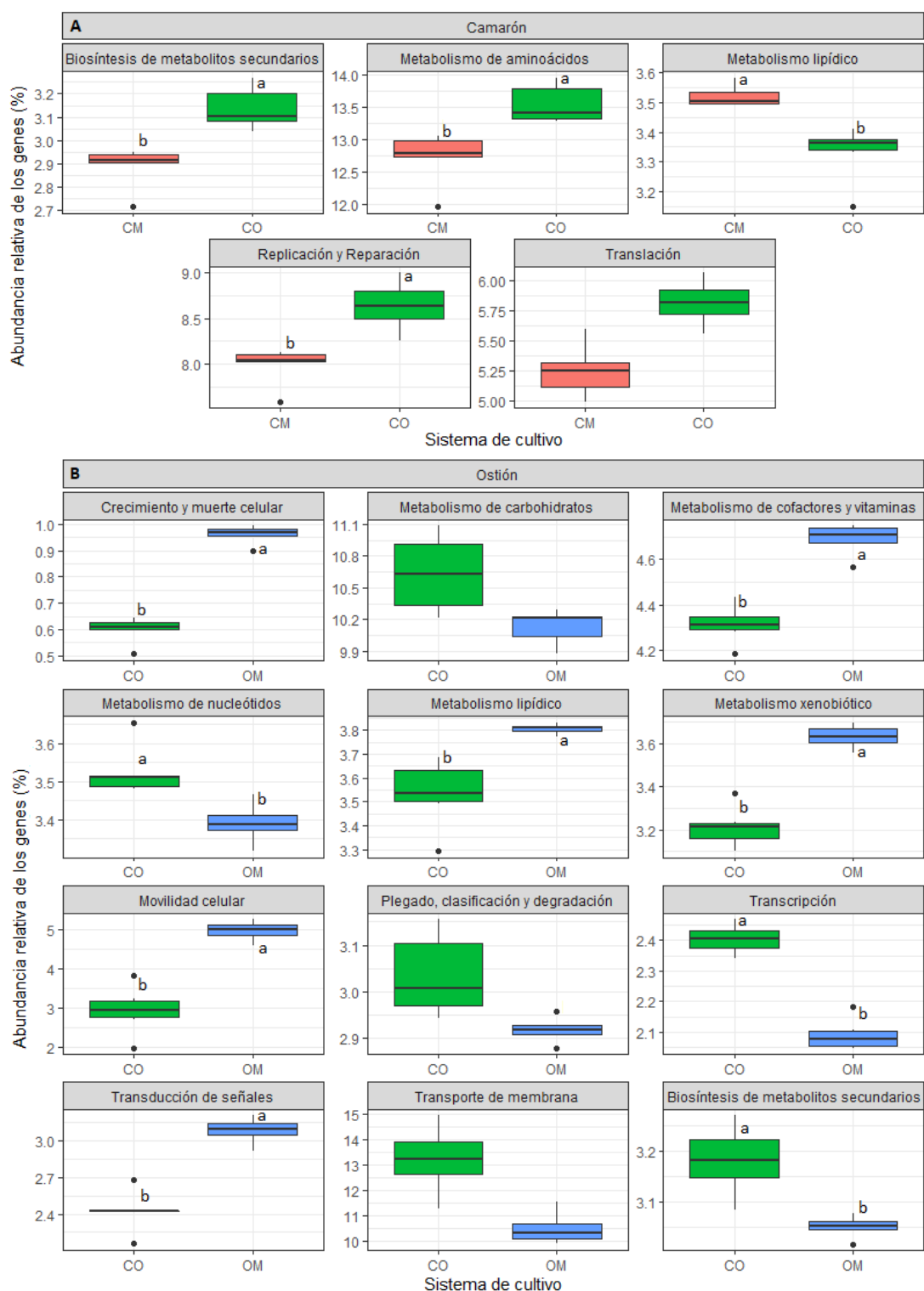


Figura 12. Proporción de OTU (%) implicados en las predicciones funcionales del programa bioinformático PICRUST de categorías KO de segundo nivel con relevancia biológica significativa de los datos metagenómicos **(A)** del intestino de *P. vannamei* y **(B)** de la glándula digestiva de *C. gigas* cultivados 30 días en sistemas de monocultivo de ostión (OM), de camarón (CM) y de cocultivo (CO).

Los resultados observados al segundo nivel de las predicciones funcionales dependen de algunas vías metabólicas específicas del tercer nivel con relevancia biológica significativa (**Tabla 12 y Tabla 13**).

Tabla 12. Categorías ortogonales KO de tercer nivel de las predicciones funcionales del programa bioinformático PICRUSt con valores P (P-values) y relevancia biológica (RB) significativas con base a las comunidades bacterianas identificadas en el intestino de *P. vannamei* cultivados 30 días en sistemas de monocultivo de camarón (CM) y de cocultivo (CO) con *C. gigas*.

Función nivel 2	Función nivel 3	RB	P-value
Metabolismo de metabolitos secundarios K09109+K09110	Biosíntesis de antibióticos tipo vancomicina K01055	0.53	1.67E-02
	Biosíntesis de unidades de azúcares policétidos K00523	0.50	2.17E-02
	Biosíntesis de ansamicinas K01051	0.41	4.41E-02
Metabolismo de aminoácidos K09105	Metabolismo de la tirosina K00350	0.55	1.36E-02
	Metabolismo de D-glutamina y D-glutamato K00471	0.51	2.02E-02
	Metabolismo de glicina, serina y treonina K00260	0.49	2.35E-02
	Metabolismo de la histidina K00340	0.42	4.27E-02
Metabolismo de lípidos K09103	Metabolismo de esfingolípidos K00600	0.54	1.52E-02
	Biosíntesis de ácidos grasos insaturados K01040	0.51	2.02E-02
	Metabolismo del ácido araquidónico K00590	0.50	2.14E-02
Replicación y Reparación K09124	Reparación por escisión de nucleótidos K03420	0.42	4.07E-02
	Proteínas de recombinación y reparación de ADN K03400	0.40	4.76E-02

Tabla 13. Categorías ortogonales KO de tercer nivel de las predicciones funcionales del programa bioinformático PICRUSt con valores de P (P-values) y relevancia biológica (RB) significativas con base a las comunidades bacterianas identificadas en la glándula digestiva de *C. gigas* cultivados 30 días en sistemas de monocultivo de ostión (OM) y de cocultivo (CO) con *P. vannamei*.

Función nivel 2	Función nivel 3	RB	P-value
Crecimiento y muerte celular K09143	Vía de señalización p53 K04115	0.96	2.36E-05
	Apoptosis K04210	0.96	5.08E-06
	Ciclo celular K04112	0.93	2.91E-06
Metabolismo cofactores y vitaminas K09108	Metabolismo de la porfirina y la clorofila K00860	0.92	3.85E-05
	Metabolismo de la vitamina B1 K00730	0.88	1.82E-04
	Biosíntesis de vitamina B5 y CoA K00770	0.85	3.20E-04
Metabolismo lipídico K09103	Biosíntesis de ácidos grasos K00061	0.75	1.19E-03
	Metabolismo de glicerolípidos K00561	0.55	1.41E-02
	Metabolismo de glicerofosfolípidos K00564	0.54	1.60E-02
Metabolismo xenobiótico K09111	Metabolismo del citocromo P450 K00980	0.91	6.30E-05
	Degradación de la caprolactama K00930	0.91	7.52E-05
	Degradación del tolueno K00623	0.90	1.13E-04
	Degradación del cloroalcano y cloroalceno K00625	0.72	3.99E-03
M. de nucleótidos K09104	Metabolismo de la pirimidina K00240	0.54	6.24E-03

Biosíntesis metabolitos secundarios K09109+K09110	Biosíntesis de carotenoides K00906	0.93	3.21E-05
	Preniltransferasas K01006	0.67	6.60E-03
	Biosíntesis de terpenoides K00900	0.53	2.50E-02
Transcripción K09121	Factores de transcripción K03000	0.79	1.29E-03
	Maquinaria de transcripción K03021	0.67	6.58E-03
Transducción de señales K09132	Vía de señalización de proteína quinasas activadas por mitógenos K04010	0.92	3.81E-05
	Sistema de dos componentes K02020	0.85	3.88E-04
Movilidad celular K09142	Quimiotaxis bacteriana K02030	0.88	1.64E-04
	Montaje flagelar K02040	0.84	5.47E-04

7.1.2 Ensayo 2: Capacidad de las macroalgas para la remoción de los nutrientes del agua residual de cultivo híper-intensivo de camarón

7.1.2.1 Calidad del agua

Al inicio del experimento ($t = 0$ horas), se pudo observar una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los nutrientes provistos por el fertilizante inorgánico f2 (AF) y por el agua residual (AR) del monocultivo de camarón (Figura 13): respectivamente, amonio 3.63 ppm y 4.36 ppm, nitrato 388.7 ppm y 359.9 ppm fosforo 22.76 ppm y 15.03 ppm, nitrito 1.05 ppm y 37.57 ppm.

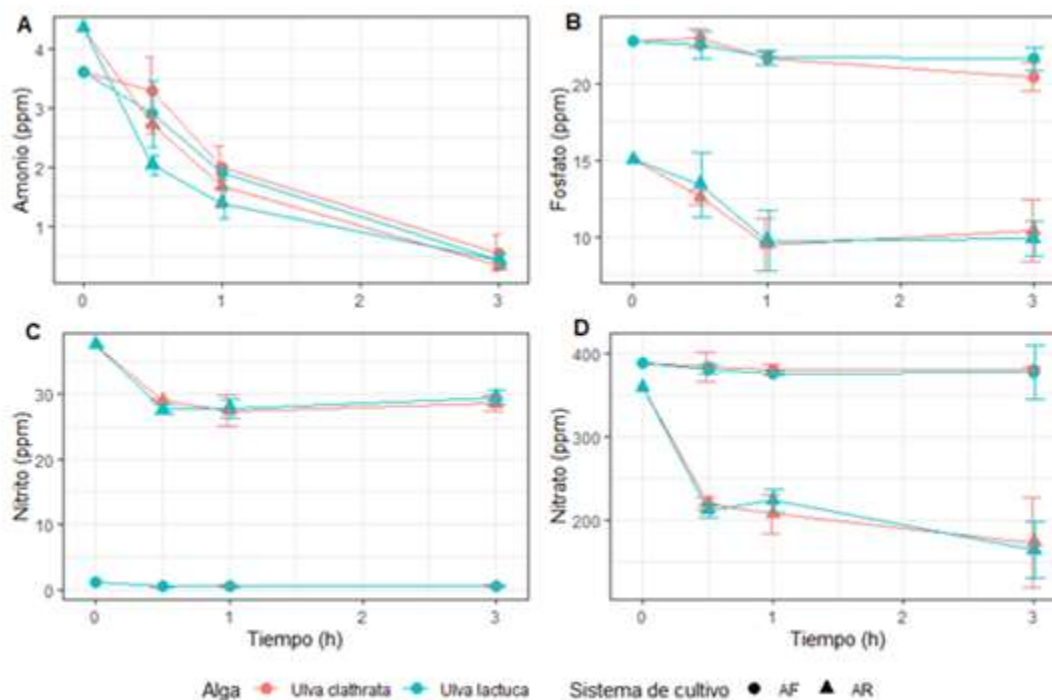


Figura 13. Concentración en (A) amonio, (B) fosfato, (C) nitrito y (D) nitrato en el agua de un sistema de monocultivo de macroalgas *U. lactuca* y *U. clathrata* fertilizadas con medio f2 (AF) y de un sistema de cultivo de macroalgas en el agua residual de camarón (AR) durante 3 horas.

En ambos casos, no hubo diferencia de capacidad de biorremediación entre *U. lactuca* y *U. clathrata*. En el sistema de algas fertilizado con f2 (AF), disminuye únicamente la concentración en amonio hasta 0.49 ± 0.14 ppm. En el sistema de algas con agua residual (AR), se observa en 3 horas una biorremediación de 32.5% de fosfato, 91.3% de amonio, 22.5% de nitrito y 51.3% de nitrato (**Figura 13**).

7.1.2.2 Crecimiento de las macroalgas

En la **Figura 14** se observa que *U. lactuca* crece más que *U. clathrata* tanto con fertilización inorgánica asistida (AF) como con el agua residual (AR). El peso final de *U. lactuca* después de 7 días de cultivo en AR alcanzó 3.57 ± 0.34 g, crecimiento significativamente mayor que con el fertilizante inorgánico (3.01 ± 0.13 g) o comparado con *U. clathrata* en ambos tratamientos de agua de cultivo (2.30 ± 0.06 g).

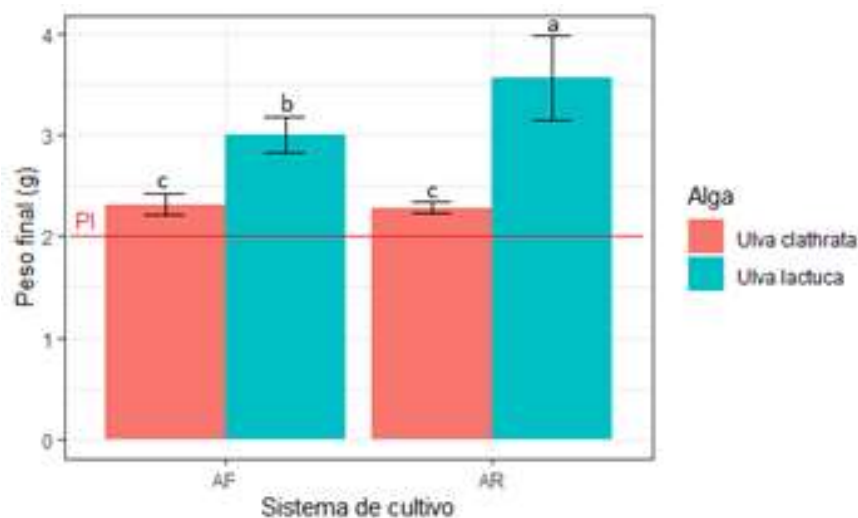


Figura 14. Peso final de *Ulva lactuca* y *Ulva clathrata* después de 7 días en los sistemas de monocultivo (AF) y cocultivo en el agua residual de camarón (AR).

7.2 Objetivo 2: Evaluar el uso de detritos de macroalga como alimento para camarón y ostión

7.2.1 Ensayo 1: Crecimiento, actividad digestiva y microbiota intestinal de *P. vannamei* alimentado con detritos de *Ulva lactuca* como ingrediente funcional

7.2.1.1 Composición proximal de los detritos de *U. lactuca* y de los alimentos

El proceso de detritos permitió recuperar la totalidad de la materia primaria y resultó en un incremento de 2 veces el contenido de proteína y 4 veces las concentraciones de lípidos con respecto a la harina integral (**Tabla 14**). Por el contrario, se redujo el contenido de fibra cruda, cenizas y extracto libre de nitrógeno (ELN).

Tabla 14. Composición proximal de la harina y del detrito de *U. lactuca*.

	Harina	Detrito
Proteína (%)	11.0 ±2.1	22.6 ±0.03
Lípidos (%)	1.0 ±0.1	4.1 ±0.3
Cenizas (%)	18.6 ±0.1	15.4 ±0.2
Fibra Cruda (%)	2.3 ±0.5	0.80 ±0.1
ELN (%)	67.1	57.1

Según la composición química, los alimentos experimentales resultaron isoproteicos (34.9 ±0.1%), con un contenido de lípidos entre el 8,2 y el 8,6% y con un aumento de cenizas con respecto al nivel de inclusión de detritos (**Tabla 15**).

Tabla 15. Composición proximal de los alimentos control (C) y experimentales con inclusión a 10% y 20% de los detritos de *U. lactuca* (DLac10 y DLac20).

	C	DLac10	DLac20
Proteína (%)	34.9 ±0.02	34.9 ±0.01	35.0 ±0.01
Lípidos (%)	8.2 ±0.03	8.4 ±0.03	8.6 ±0.08
Fibra Cruda (%)	0.9 ±0.02	1.0 ±0.03	0.8 ±0.06
Cenizas (%)	8.0 ±0.01	9.7 ±0.03	11.4 ±0.06
ELN (%)	48.0	46.0	44.3
Energía (Kcal/g)	4.6 ±1.0	4.4 ±1.1	4.3±0.5

7.2.1.2 Parámetros zootécnicos

La supervivencia del camarón fue superior al 93% en todos los tratamientos (**Tabla 16**) sin diferencias significativas entre ellos. No se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) para el peso final (1.23-1.27 g), aumento de peso (594-607%), ingesta de alimento individual (1.32-1.35 g de alimento.camarón⁻¹), tasa de crecimiento específico (6.45-6.57%.día⁻¹), y el factor de conversión alimenticia (1.22-1.29) entre todos los tratamientos (**Figura 15** y **Tabla 16**).

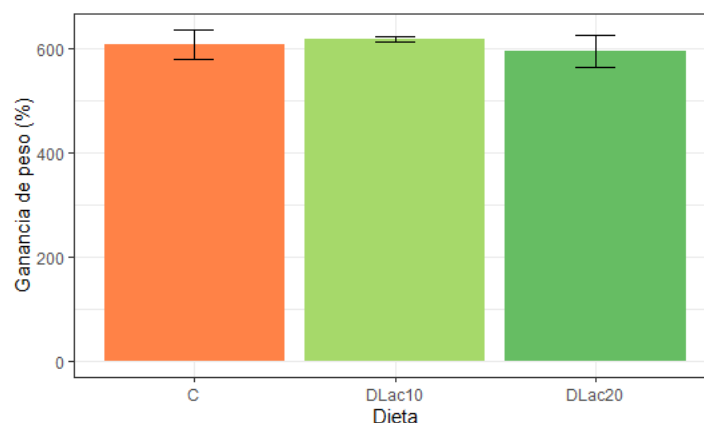


Figura 15. Ganancia de peso (%) de *P. vannamei* alimentados durante 30 días con un alimento control con 0% de detritos (C) y alimentos con 10 y 20% de detritos de *U. lactuca* (DLac10 y DLac20).

Tabla 16. Supervivencia, peso final (PF), tasa de conversión específica (TCE), Consumo de alimento (CA) y factor de conversión alimenticia (FCA) de *P. vannamei* alimentados durante 30 días con un alimento control con 0% de detritos (C) y alimentos con 10 y 20% de detritos de *U. lactuca* (DLac10 y DLac20).

Alimentos	Supervivencia (%)	PF (g)	TCE (%.día ⁻¹)	CA (g.camarón ⁻¹)	FCA
C	97 ±0.4	1.25 ±0.05	6.52 ±0.13	1.32 ±0.01	1.23 ±0.04
DLac 10	100 ±0.0	1.27 ±0.05	6.57 ±0.03	1.33 ±0.01	1.22 ±0.01
DLac 20	93 ±0.9	1.23 ±0.05	6.45 ±0.15	1.35 ±0.00	1.29 ±0.07

7.2.1.3 Actividad enzimática digestiva

En todos los tratamientos, los camarones presentaron un intervalo de concentración de proteína en el hepatopáncreas de 30.0 a 34.3 mg.mL⁻¹, sin diferencias significativas entre los tratamientos ($P>0.05$). No se observaron diferencias significativas ($P<0.05$) para la actividad quimotripsina entre tratamientos (rangos de 1.9 a 2.3 U.mg⁻¹ de proteína).

Los camarones alimentados con los alimentos DLac10 y DLac20 presentaron actividades enzimáticas específicas significativamente ($P < 0.05$) más altas de la tripsina (0.44 - $0.46 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína), lipasa (9.1 - $10.5 \text{ U} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ proteína), amilasa (8.3 - $9.9 \text{ U} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ proteína) y relación A/T (20.6 - 21.6×10^{-3}) comparado con el alimento control (tripsina: $0.34 \pm 0.01 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína, lipasa: $7.3 \pm 0.2 \text{ U} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ proteína, amilasa: $5.6 \pm 0.6 \text{ U} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ proteína, A/T: $16.8 \pm 1.5 \times 10^{-3}$) (**Figura 16**).

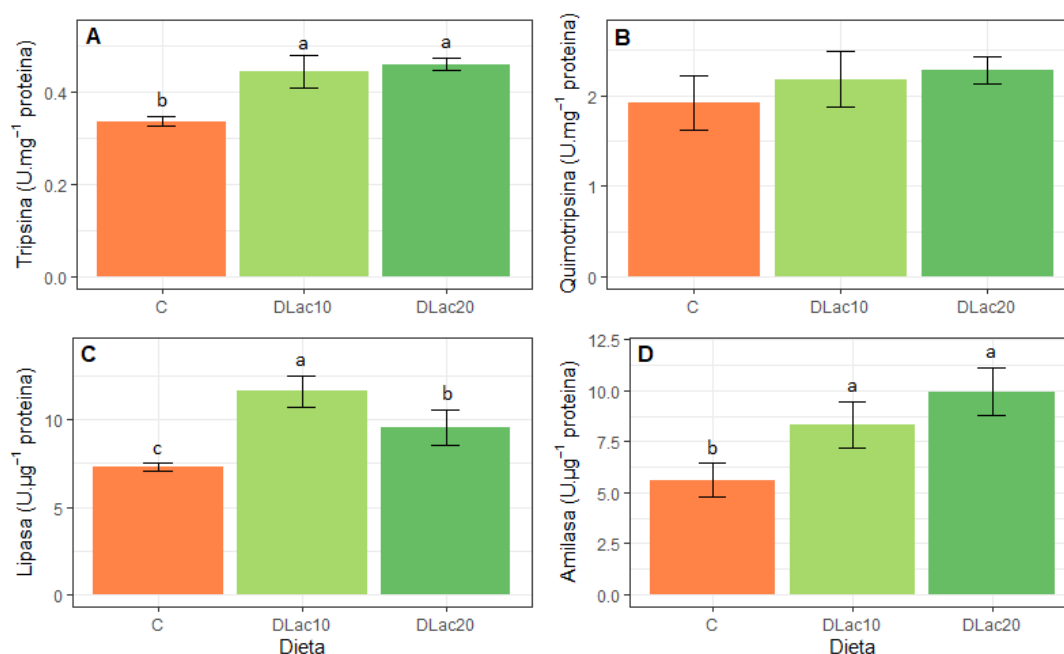


Figura 16. Actividad enzimática ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína) de la (A) tripsina, (B) quimotripsina, (C) lipasa y (D) amilasa en el hepatopáncreas de *P. vannamei* alimentados durante 30 días con un alimento control con 0% de detritos (C) y alimentos con 10 y 20% de detritos de *U. lactuca* (DLac10 y DLac20).

7.2.1.4 Comunidades bacterianas digestivas

Las comunidades bacterianas entre los tratamientos no mostraron diferencias significativas en términos de diversidad alfa (**Figura 17A**). El ACP de la beta-diversidad presentó muestras agrupadas por tratamiento, con baja variabilidad entre ellos, y su representación en 3 dimensiones explicó un total de 50.1% de la variación (**Figura 17B**). El primer eje está correlacionado positivamente ($>80\%$) con OTU de la familia *Rhodobacteraceae*, mientras el segundo eje está negativamente correlacionado con OTU de esta misma familia ($<-70\%$). El tercer eje se correlacionó positivamente con OTU de la *Caulobacteriaceae* ($>60\%$) y negativamente con los *Vibrionaceae* ($<-60\%$).

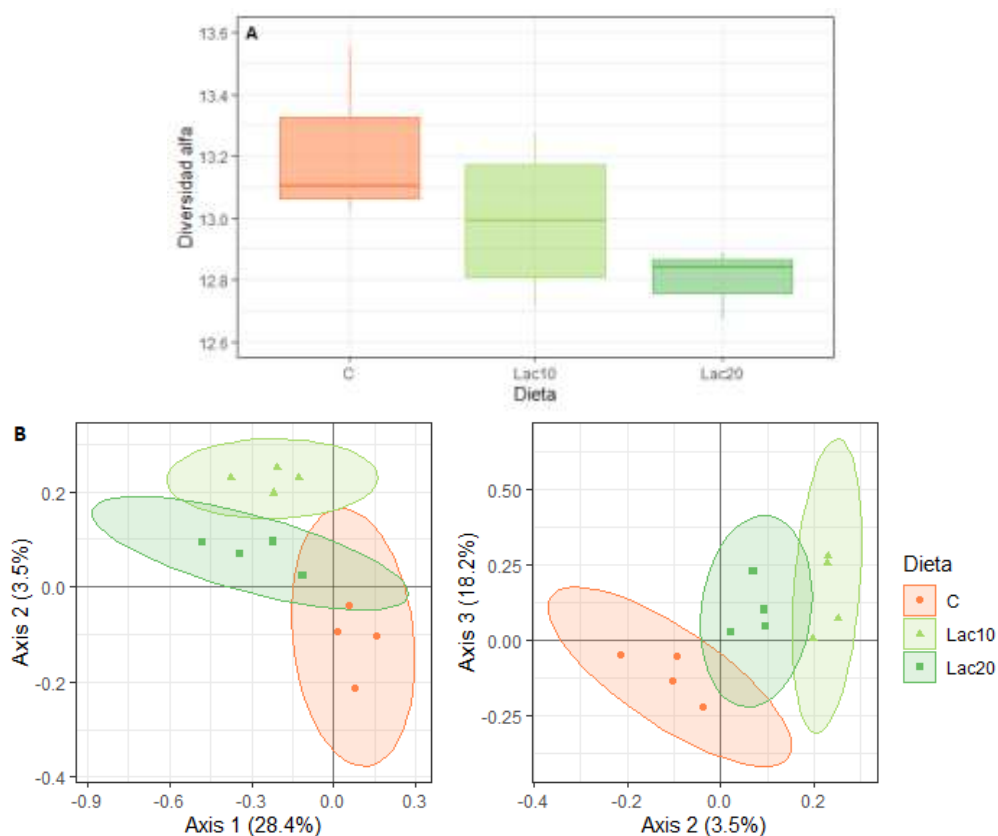


Figura 17. (A) α -diversidad y **(B)** análisis de componentes principales (ACP) en 3 dimensiones de β -diversidad en el intestino de *P. vannamei* alimentados durante 30 días con un alimento control con 0% de detritos (C) y alimentos con 10 y 20% de detritos de *U. lactuca* (DLac10 y DLac20).

Independientemente del alimento, el filo más abundante fue *Proteobacteria*, seguido de *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia* y *Actinobacteria* (**Figura 18**). Con respecto al filo de *Proteobacteria*, su abundancia relativa disminuyó en los camarones alimentados con DLac10 y DLac20, con una mayor reducción en la clase de *Gammaproteobacteria*. La clase *Alphaproteobacteria* estuvo dominada por *Rhodobacteraceae* (*Rhodobacterales*), donde los tratamientos con los detritos de *U. lactuca* mostraron una abundancia menor (78.2 y 73.5%, DLac10 y DLac 20 respectivamente) que el control (82.1%). Los detritos en los alimentos también aumentaron los *Sphingomonadales*, dominado por *Sphingomonadaceae*, abundancia relativa en el intestino del camarón (1.1 y 4.4%) en comparación con el control (0.55%).

En términos del filo de *Bacteroidetes*, los intestinos de camarón de DLac20 presentaron una abundancia relativa significativamente mayor (29.3%) en comparación con DLac10 (10.5%) y con el control (9.3%) (**Figura 18**). Los *Bacteroidetes* estaban dominados por el orden *Flavobacteriales* (89,9%), representado principalmente por la familia *Flavobacteriaceae*. Dentro de esta familia, los alimentos DLac10 y DLac20 condujeron a una disminución de la abundancia de los géneros bacterianos *Tenacibaculum* (0.5 y 0.4%, respectivamente) en comparación con el control (3.4%), y *Lutimonas* (0.02-0.04%) respecto al control (3.4 y 0.3%, respectivamente).

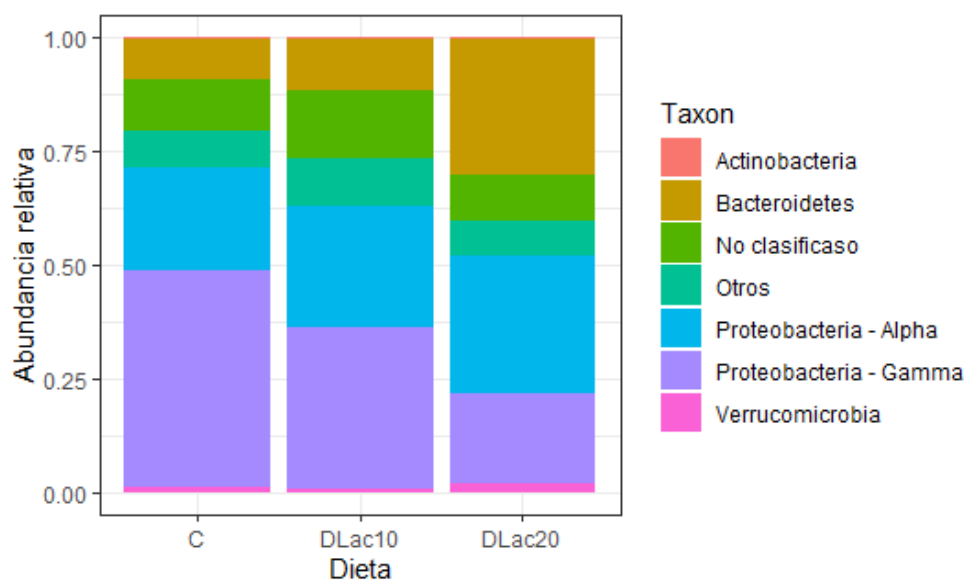


Figura 18. Abundancia relativa de los principales filos bacterianos en el intestino de *P. vannamei* alimentados durante 30 días con un alimento control con 0% de detritos (C) y alimentos con 10 y 20% de detritos de *U. lactuca* (DLac10 y DLac20).

Dentro de las *Gammaproteobacteria* (**Figura 19**), los *Vibrionales* fueron representados únicamente por la familia *Vibrionaceae*, fueron el orden identificado más abundante para el control (38.3%) y disminuyó significativamente ($P < 0.05$) en el intestino de los camarones alimentados con DLac10 y DLac20 (10.4 y 9.0% respectivamente). En particular, *Lucibacterium sp.* fue significativamente menos abundante en DLac20 y *Allomonas sp.* disminuyó con el nivel de inclusión de detritos en la alimentación. Además, los alimentos con detritos DLac10 y DLac20 disminuyeron la abundancia de *Alteromonadales* (0.1 y 2.3%) en comparación con el control (3.1%), y especialmente la inclusión de 20% de detritos (DLac20) disminuyó la abundancia

relativa de *Pseudomonadales*, en particular *Pseudomonadaceae* (1.7%) comparado con el control (6.2%).

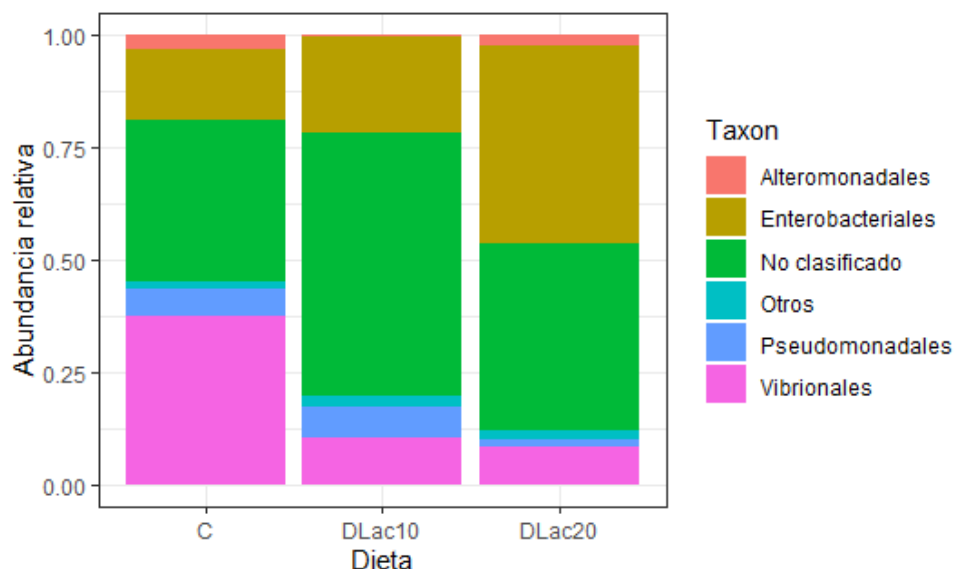


Figura 19. Abundancia relativa de las principales órdenes de *Gammaproteobacteria* en el intestino de *P. vannamei* alimentados durante 30 días con un alimento control con 0% de detritos (C) y alimentos con 10 y 20% de detritos de *U. lactuca* (DLac10 y DLac20).

La abundancia relativa del filo *Verrucomicrobia*, dominada por el orden *Verrucomicrobiales* (80.4%), también aumentó para los camarones alimentados con DLac20 (1.8%) en comparación con DLac10 y C (0.5 y 1.0% respectivamente). Particularmente, los alimentos experimentales generaron una mayor abundancia relativa de *Rubritalea* (33.4-12.5%) en comparación con el control (7.7%) y la inclusión de 20% de detritos de *U. lactuca* resultó en la abundancia relativa de *Haloferula* (DLac20: 51.6%, DLac10: 44.4% y C: 22.1%).

Se indujo un aumento del filo de *Actinobacteria* mediante la inclusión de 20% de detritos en el alimento DLac20 (0.41%) en comparación con 10% de inclusión DLac10 (0,17%) y tratamientos de control (0,20%). El filo *Actinobacteria* estuvo dominado por el orden de *Actinomycetales*, que estaban en mayor abundancia relativa en camarones alimentados con los alimentos con detritos (DLac10: 79.0 y DLac20: 82.8%) comparado con el control (62.0%). La abundancia relativa del orden *Acidimicrobiales*, representada por el género *Ilumatobacter*, mostró una disminución

significativa con los alimentos DLac10 y DLac20 (respectivamente: 7.5 y 10.1%) en comparación con el control (28.3%).

Finalmente, dentro de los filos menos representativos, los *Firmicutes* aumentaron en abundancia relativa con los alimentos DLac10 y DLac20 (0.06 y 0.08%) en comparación con el control (0.05%).

7.2.1.5 Predicción funcional de comunidades bacterianas.

Se detectaron un total de 329 vías de ortología KEGG (KO). En todos los tratamientos, las secuencias relacionadas con el metabolismo representaron el 50.5% de las vías KEGG (nivel 1), seguido del procesamiento de la información genética (18.1%), el procesamiento de información ambiental (15.3%), los procesos celulares (8.6%) y otras vías (7.5%). Más del 90% de las secuencias estaban relacionadas con las 18 vías más abundantes del nivel 2 (**Tabla 17**); 6 de ellos eran biológicamente relevantes ($P < 0.05$) y pertenecían a las vías del metabolismo del camarón.

Tabla 17. Categorías ortogonales KO de segundo nivel de las predicciones funcionales del programa bioinformático PICRUST con valores P (P-values) y relevancia biológica (RB) significativas con base a las comunidades bacterianas identificadas en el intestino de *P. vannamei* cultivados 30 días con un alimento control con 0% de detritos y alimentos con 10 y 20% de detritos de *U. lactuca*.

Función nivel 1	Función nivel 2	RB	P-values	% de las secuencias
Metabolismo K09100	Metabolismo de aminoácidos K09105	0.91	4.22E-05	12.75
	Metabolismo de carbohidratos K09101	0.74	5.53E-03	9.24
	Metabolismo energético K09102	0.84	5.08E-04	6.13
	Metabolismo de cofactores y vitaminas K09108	0.40	0.08	4.15
	Metabolismo lipídico K09103	0.81	1.16E-03	3.74
	Metabolismo xenobiótico K09111	0.22	0.40	3.25
	Metabolismo de nucleótidos K09104	0.14	0.65	3.21
	Metabolismo de metabolitos secundarios K09109	0.86	2.99E-04	3.06
	Metabolismo de glicanos K09107	0.86	2.93E-04	2.17
	Familias enzimáticas K09181	0.21	0.43	1.85
Procesamiento de	Replicación y Reparación K09124	0.07	0.88	7.60

información genética K09120	Traducción K09122	0.22	0.42	4.93
	Plegado, clasificación y degradación K09123	0.30	0.22	3.07
	Transcripción K09121	0.35	0.15	2.35
Procesamiento de información ambiental K09130	Transporte de membrana K09131	0.43	0.06	12.85
	Transducción de señales K09132	0.18	0.52	2.33
Procesos celulares K09140	Movilidad celular K09142	0.25	0.32	3.96
	Transportadores de iones K04040	0.14	0.67	1.01

Al considerar las principales predicciones funcionales del programa bioinformático PICRUSt (**Figura 20**), la inclusión de detritos de *U. lactuca*, resultó en una mayor proporción de OTU implicados en el metabolismo de aminoácidos, metabolismo de carbohidratos, metabolismo lipídico y metabolismo de metabolitos secundarios (terpenoides y policétidos). Mientras que no hubo diferencia significativa en el metabolismo energético y el metabolismo de glicanos con los alimentos experimentales comparado con el control.

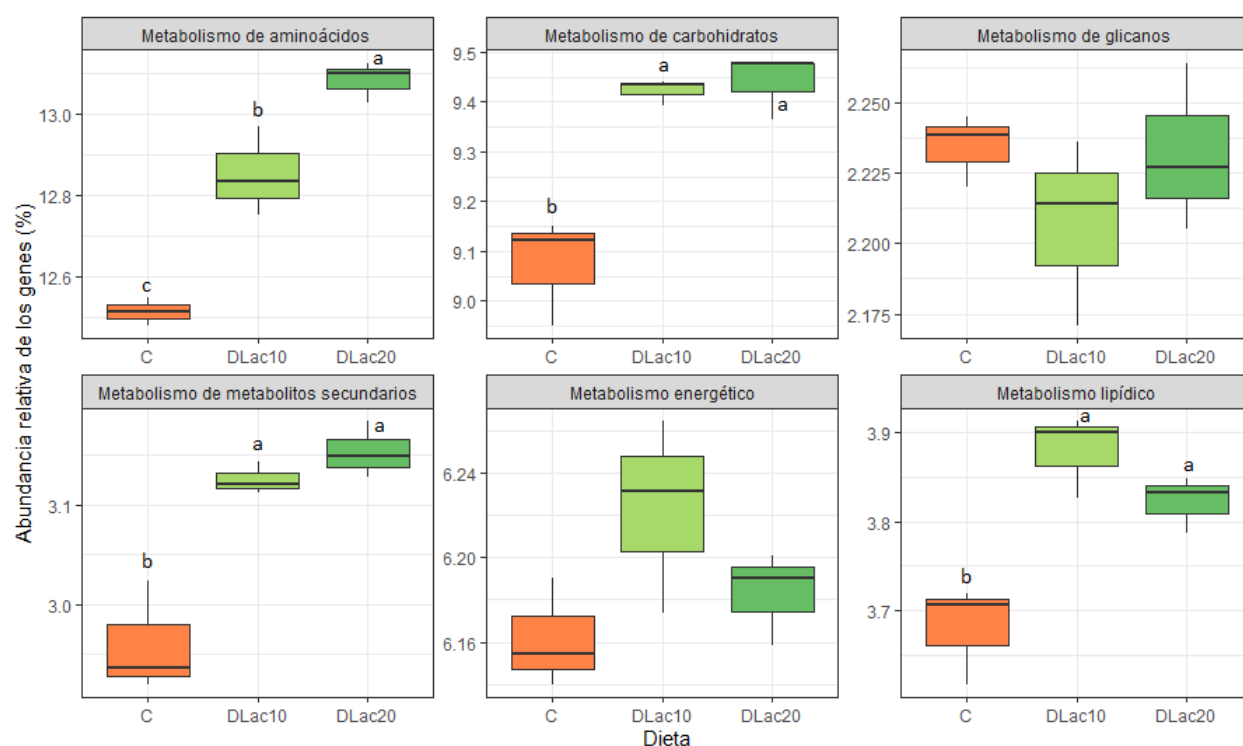


Figura 20. Proporción de secuencias (%) implicadas en las predicciones funcionales del programa bioinformático PICRUSt de categorías KO de segundo nivel con relevancia biológica significativa de las comunidades bacterianas identificadas en el intestino de *P. vannamei* alimentado durante 30 días con un alimento control con 0% de detritos y alimentos con 10 y 20% de detritos de *U. lactuca*.

Los resultados observados al segundo nivel de las predicciones funcionales dependen de algunas vías metabólicas específicas al tercer nivel que presentaron relevancia biológica significativa (**Tabla 18**).

Tabla 18. Categorías ortogonales KO de tercer nivel de las predicciones funcionales del programa bioinformático PICRUSt con valores P (P-values) y relevancia biológica (RB) significativas con base a las comunidades bacterianas identificadas en el intestino de *P. vannamei* alimentado durante 30 días con un alimento control con 0% de detritos y alimentos con 10 y 20% de detritos de *U. lactuca*.

Función nivel 2	Función nivel 3	RB	P-value
Metabolismo de aminoácidos K09105	Metabolismo de histidina K00340	0.75	8.08E-03
	Enzimas relacionadas con aminoácidos K01007	0.73	1.15E-02
	Metabolismo de arginina y prolina K00250	0.71	1.52E-02
Metabolismo de los carbohidratos K09101	Glucólisis / gluconeogénesis K00010	0.84	5.43E-04
	Ciclo de citrato (ciclo de Krebs) K00020	0.78	2.34E-03
Metabolismo energético K09102	Vía de fijación del carbono en procariontes K00720	0.82	8.37E-04
Metabolismo de glicanos K09107	Glicosil-transferasas K01003	0.84	5.06E-04
	Biosíntesis de lipopolisacáridos K00540	0.68	1.54E-02
Metabolismo de lípidos K09103	Proteínas de biosíntesis de lípidos K01004	0.88	8.80E-04
	Metabolismo de ácidos grasos K01212	0.80	3.44E-03
	Síntesis y degradación de cuerpos cetónicos K00072	0.84	5.45E-04
Metabolismo de los metabolitos secundarios K09109	Biosíntesis de antibióticos tipo vancomicina K01055	0.83	7.94E-04
	Biosíntesis de carotenoides K00906	0.81	2.36E-03

7.2.2 Ensayo 2: Contribución nutricional de los detritos de *U. lactuca* en el crecimiento, la actividad digestiva y la microbiota intestinal de *C. gigas*

7.2.2.1 Estructura y composición proximal de los detritos y de la microalga

La microscopía electrónica mostró el efecto de la predigestión sobre el tejido de *U. lactuca* (Figura 21).

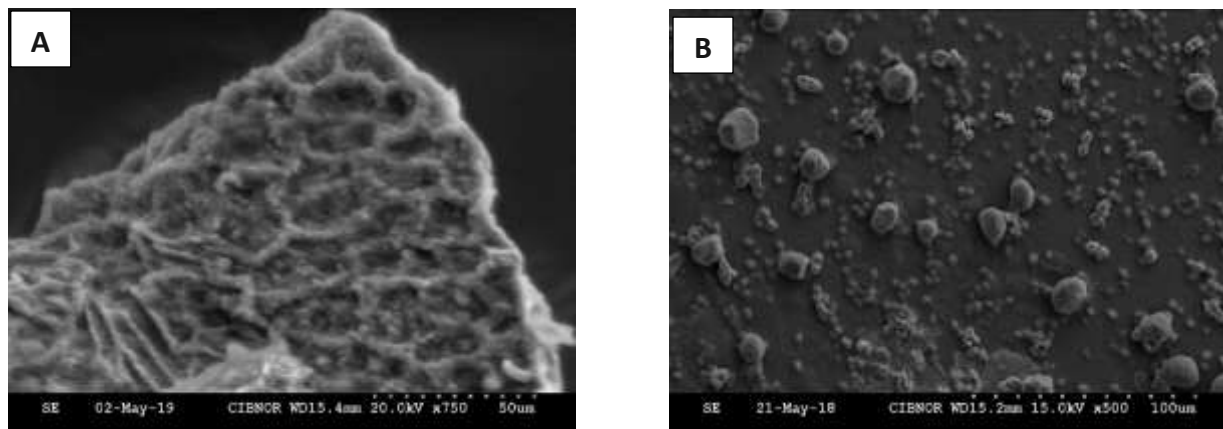


Figura 21. Fotos de microscopía electrónica de (A) *Ulva lactuca* y (B) detrito *U. lactuca*. Las escalas están representadas en cada fotografía.

Los detritos generados contuvieron 87.9% de sus partículas con tamaño entre 1 y 10 μm (Figura 22).

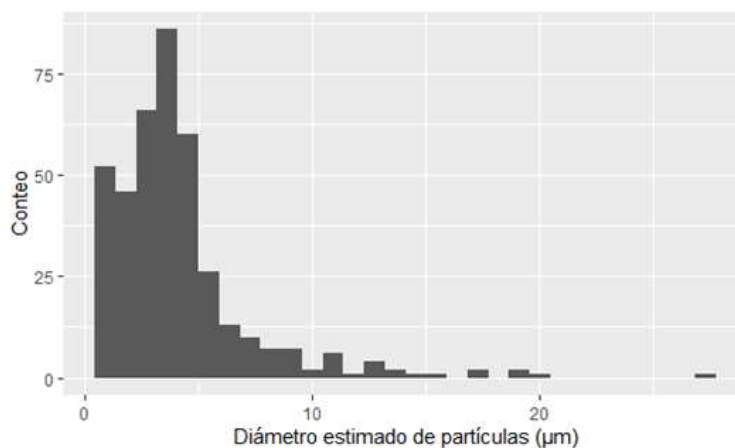


Figura 22. Histograma de distribución del tamaño de partícula de los detritos de *U. lactuca*.

El proceso de filtración de los detritos (25 μm) permitió una recuperación de $64 \pm 5\%$ de la materia primaria. En la composición del detrito se observó un aumento significativo del

contenido de lípidos, sin embargo, la microalga *C. calcitrans* contiene significativamente más lípidos (**Tabla 19**). El proceso de predigestión en este caso no incluyó fermentación por lo que no se observó un incremento en proteína en el detrito.

Tabla 19. Composición proximal de la harina, del detrito de *U. lactuca* y de la microalga.

	Harina	Detrito	Microalga
Proteína (%)	27.9 ±0.0	28.32 ±0.5	25.2 ±0.3
Lípidos (%)	0.5 ±0.0	8.8 ±0.8	15.9 ±0.5
Cenizas (%)	23.1 ±0.0	-	48.8 ±1.5
Fibra Cruda (%)	1.6 ±0.1	-	10.1 ±0.1
ELN (%)	46.9	-	-

7.2.2.2 Parámetros zootécnicos

La supervivencia del ostión fue de 100% en todos los tratamientos (**Tabla 20**). El PVF, la LF, el PSF, la TCE y el ILS no presentaron diferencia significativa para los tratamientos con 25 y 50% de detritos de *U. lactuca* comparado con el control D0. La GPS (**Figura 23**) para D25 y D50 (89.3 ±19.2 y 79.4 ±17.2%) tampoco fue significativamente diferente respecto al control (92.2 ±15.3%).

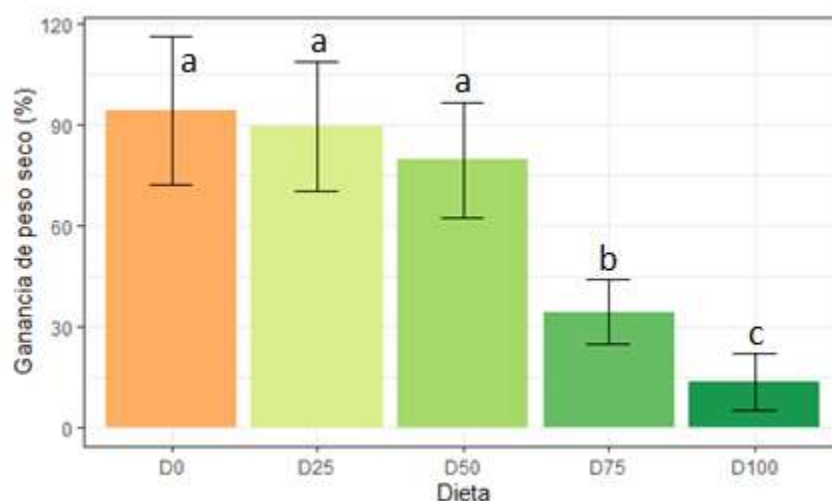


Figura 23. Ganancia de peso seco GPS (%) de *C. gigas* alimentados durante 35 días con diferentes proporciones de detritos de *U. lactuca* como sustituto de microalga *C. calcitrans*.

Los ostiones alimentados con las dietas D75 y D100 presentaron todos los parámetros zootécnicos significativamente inferiores a los del tratamiento control ($P < 0.05$). El crecimiento

de estos ostiones fue muy limitado, con una ganancia de peso de $34.2 \pm 9.6\%$ y $13.4 \pm 8.5\%$, respectivamente.

Tabla 20. Supervivencia (Superv.), peso vivo final (PVF), longitud final (LF), peso seco final (PSF), tasa de conversión específica (TCE) e índice de Lawrence y Scott (ILS) de *C. gigas* alimentados durante 35 días con diferentes proporciones de detritos de *U. lactuca* como sustituto de microalga *C. calcitrans*.

Dieta	Superv. (%)	PVF (g)	LF (cm)	PSF (g)	TCE (%.día ⁻¹)	ILS
D0	100	5.7 ^a ±0.6	4.4 ±0.4	0.17 ^a ±0.02	1.9 ^a ±0.3	81.3 ^a ±5.5
D25	100	5.6 ^a ±0.6	4.6 ±0.5	0.17 ^a ±0.02	1.8 ^a ±0.3	78.9 ^a ±6.4
D50	100	5.9 ^a ±0.6	4.4 ±0.2	0.16 ^a ±0.01	1.7 ^a ±0.3	75.0 ^a ±5.2
D75	100	5.2 ^{bc} ±0.4	4.1 ±0.5	0.12 ^b ±0.01	0.8 ^b ±0.2	59.8 ^b ±9.7
D100	100	4.8 ^c ±0.4	4.0 ±0.6	0.10 ^c ±0.01	0.3 ^c ±0.2	50.9 ^b ±7.9

7.2.2.3 Contribución de los nutrientes en el crecimiento y tiempos de residencia elemental en los tejidos.

Los detritos de *U. lactuca* y la microalga *C. calcitrans* mostraron valores isotópicos de $\delta^{15}\text{N}$ muy diferentes (9.31 ± 0.24 y $3.18 \pm 0.19\%$, respectivamente). Ambas fuentes de alimentos tuvieron una rápida influencia en los valores $\delta^{15}\text{N}$ en los ostiones para todos los tratamientos (**Figura 24**).

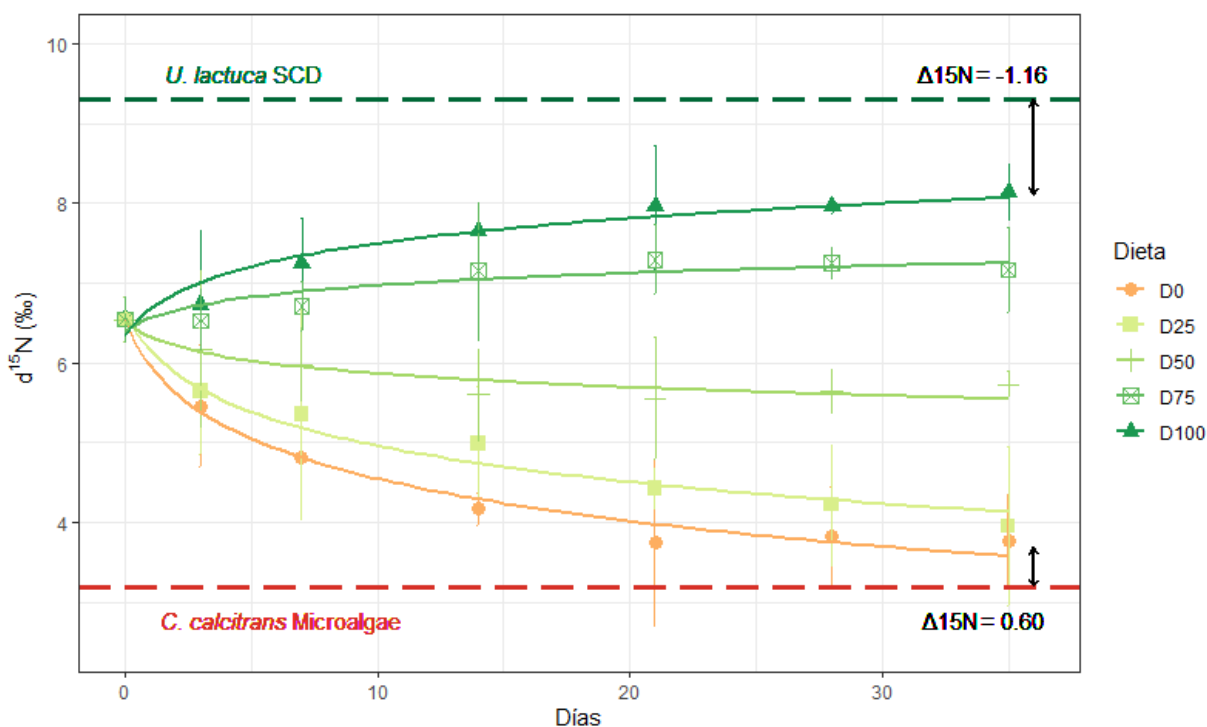


Figura 24. Cambios en los valores de isótopos estables en nitrógeno provocados por la dieta de *C. gigas* alimentados con diferentes proporciones de detritos de *U. lactuca* como sustituto de microalga *C. calcitrans*.

Por el contrario, los valores isotópicos de carbono del detrito de *U. lactuca* y la microalga *C. calcitrans* fueron similares, respectivamente -19.1 ± 0.1 ‰ y -20.5 ± 0.2 ‰. Debido a lo anterior, no fue posible detectar tendencias de cambio isotópico exponenciales en el manto de los ostiones bajo los diversos tratamientos y los valores de $\delta^{13}\text{C}$ entre los ostiones alimentados con las diferentes dietas oscilaron entre -18.2 y -16.2 ‰.

A lo largo del experimento, los valores isotópicos de tejido de ostión reflejaron los valores isotópicos del detrito de *U. lactuca* y de la microalga *C. calcitrans* de acuerdo con el nivel de inclusión de ambas fuentes de alimento; es decir con más inclusión de detritos de la macroalga, el valor isotópico de los ostiones se acercó más al valor isotópico del detrito de macroalga (**Figura 24**). Los ostiones alimentados con las dietas D0, D25 y D100 alcanzaron el equilibrio isotópico al día 21, mientras los de D50 lo alcanzaron más rápido (14 días) y los de D75 más tarde (28 días). Al contrario de los valores $\delta^{15}\text{N}$, no se observó ningún cambio exponencial en los valores $\delta^{13}\text{C}$ entre los tejidos de los ostiones alimentados con las diferentes dietas. Lo anterior

se debió a una similitud de valores isotópicos de carbono en el detrito de *U. lactuca* (19.1‰) y la microalga *C. calcitrans* (20.5‰).

Tabla 21. Tasa de crecimiento (k), tasa de renovación metabólica (m) y tiempo de vida media (t_{50}) del nitrógeno en el manto de *C. gigas* alimentados con detritos de *U. lactuca* como sustituto de microalga *C. calcitrans* en diferentes proporciones.

Dieta	k (día ⁻¹)	m (día ⁻¹)	t_{50} (días)	r^2
D0	0.0188 ^a ±0.003	0.148 ^a ±0.026	4.1 ^c ±0.7	0.82
D25	0.0181 ^a ±0.003	0.103 ^b ±0.013	5.7 ^b ±0.7	0.87
D50	0.0166 ^a ±0.003	0.097 ^c ±0.025	6.1 ^b ±1.6	0.74
D75	0.0083 ^b ±0.002	0.095 ^c ±0.032	6.7 ^{ab} ±2.3	0.66
D100	0.0035 ^c ±0.002	0.080 ^d ±0.001	8.2 ^a ±0.1	0.98

Las tasas estimadas de renovación metabólica del nitrógeno variaron de 0.080 a 0.148 por día y resultó menor con las dietas que contenían mayor nivel de inclusión de los detritos de *U. lactuca* (Tabla 21). Al contrario, los valores t_{50} en el tejido del ostión aumentaron consistentemente con el nivel de inclusión de detritos de *U. lactuca*, con valores iniciales de 4.1 ±0.7 días para D0 hasta alcanzar el doble para D100. Los resultados del modelo isotópico indicaron que los ostiones incorporaron cantidades significativamente más altas de nitrógeno provisto de la microalga que de los detritos de *U. lactuca* para la dieta D25 (Tabla 22). Al final del experimento, los ostiones en el tratamiento D25 incorporaron 96% de nitrógeno de la microalga y 4% de los detritos, significativamente más altas comparado con las proporciones esperadas de nitrógeno en la dieta (75% y 25%, respectivamente).

Al contrario, no se observó diferencia significativa entre las contribuciones del nitrógeno observadas y esperadas en las dietas D50 y D75. Aunque los valores de contribución corregidos para la concentración elemental indicaron que los ostiones alimentados con la dieta D25 incorporaron cantidades casi exclusiva (92%) de materia seca a partir de la microalga, se observó una mayor incorporación de materia seca de los detritos de *U. lactuca* (61 y 87%) en los ostiones alimentados con D50 y D75, respectivamente. Debido a su menor contenido de nitrógeno, el detrito de *U. lactuca* tuvo que ser consumido en cantidades más altas para

suministrar las contribuciones elementales (N) observadas en los mantos de los ostiones y permitir el crecimiento de los ostiones.

Tabla 22. Proporciones relativas estimadas de nitrógeno dietario y materia seca total (\pm Intervalos de confianza) suministrada por microalga *C. calcitrans* y detritos de *U. lactuca* que contribuyen al crecimiento de *C. gigas* alimentados con diferentes proporciones de cada uno.

Dieta	Esperado	Observado en el tejido del ostión		
		Min	Media	Max
Nitrógeno				
D25				
Microalga	75 ^b	79.1	95.8 ^a	100.0
Detritos	25 ^a	0.0	4.2 ^b	20.9
D50				
Microalga	50	49.4	55.2	60.9
Detritos	50	39.1	44.8	50.6
D75				
Microalga	25	11.5	22.4	33.4
Detritos	75	66.6	77.6	88.5
Materia seca				
D25				
Microalga	78.9	71.1	92.2	100.0
Detritos	21.1	0.0	7.8	28.9
D50				
Microalga	55.5 ^a	39.4	38.8 ^b	38.3
Detritos	44.5 ^b	61.7	61.2 ^a	60.6
D75				
Microalga	29.3 ^a	8.1	12.9 ^b	16.2
Detritos	70.7 ^b	83.8	87.1 ^a	91.9

7.2.2.4 Actividad enzimática digestiva

En términos del contenido en proteína de la glándula digestiva del ostión alimentado con las dietas experimentales (rangos 14.0-27.7 mg.mL⁻¹) comparado con la dieta control (21.3 \pm 3.9 mg.mL⁻¹) no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$). De igual forma, no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en las actividades específicas de la proteasa, peptidasa, lipasa y amilasa en los ostiones alimentados con las dietas D25, D50 y D75 comparado con el control (**Figura 25**). Para la dieta D100, estas mismas actividades enzimáticas específicas (0.14 \pm 0.02,

0.68 ±0.02 y 0.13 ±0.04 U.mg⁻¹ proteína, respectivamente) fueron superiores a las del control (0.08 ±0.01, 0.46 ±0.04 y 0.07 ±0.02 U.mg⁻¹ proteína, respectivamente).

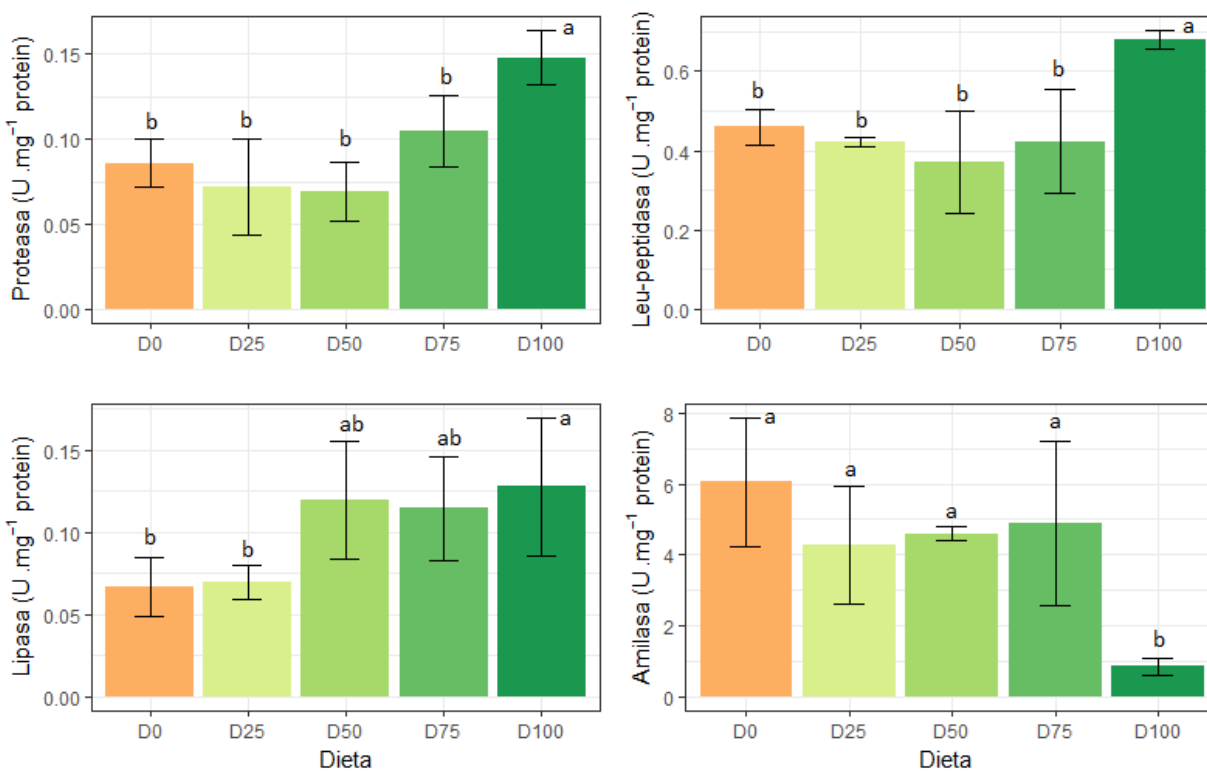


Figura 25. Actividad enzimática específica (U.mg⁻¹ proteína) de proteasa, peptidasa, lipasa y amilasa en la glándula digestiva de *C. gigas* alimentados con detritos de *U. lactuca* como sustituto de microalga *C. calcitrans* en diferentes proporciones.

La inclusión de detritos de *U. lactuca* en la dieta del ostión resultó en una disminución significativa ($P < 0.05$) de la actividad de la amilasa en las glándulas digestivas de los ostiones alimentados con D100 (0.85 ± 0.25 U.mg⁻¹ proteína) comparado con el control (6.05 ± 1.81 U.mg⁻¹ proteína).

7.3 Objetivo 3: Evaluar el efecto antiviral de la macroalga en el sistema IMTA contra el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en el camarón

7.3.1 Composición proximal de los detritos y de los alimentos experimentales

El proceso de detritos permitió recuperar la totalidad de la materia primaria y resultó en un incremento de 2 veces el contenido de proteína y 2.5 veces las concentraciones de lípidos con

respecto a la harina cruda (**Tabla 23**). Por el contrario, se redujo el contenido de fibra cruda, cenizas y extracto libre de nitrógeno (ELN).

Tabla 23. Composición proximal de la harina y detrito de *U. lactuca*.

	Harina	Detrito
Proteína (%)	10.2 ±0.05	19.7 ±0.09
Lípidos (%)	0.2 ±0.03	0.5 ±0.03
Cenizas (%)	18.6 ±0.02	15.4 ±0.01
Fibra Cruda (%)	2.7 ±0.06	0.4 ±0.06
ELN (%)	68.3	63.0

Los detritos producidos en este experimento se pueden comparar con el ensayo alimenticio descritos en la parte 6.2.1. (**Tabla 14**). Se observa una mayor digestión de la fibra cruda en la segunda producción. En ambos casos, el diferente proceso de fabricación incrementa de manera preferencial la proporción relativa en proteínas y lípidos.

Los alimentos formulados (C y DLac20) resultaron con un contenido proteico de 34.9 y 35.7%, un contenido lipídico de 8.2 y 7.7% y con un aumento de cenizas con respecto a la inclusión de detritos (**Tabla 24**).

Tabla 24. Composición proximal de los alimentos control (C) y con 20% de los detritos de *Ulva lactuca* como sustituto de harina de pescado (DLac20).

	C	DLac20
Proteína (%)	34.9 ±0.02	35.7 ±0.14
Lípidos (%)	8.2 ±0.03	7.7 ±0.08
Fibra Cruda (%)	0.93 ±0.06	0.63 ±0.06
Cenizas (%)	8.1 ±0.00	11.4 ±0.03
ELN (%)	47.9	44.6
Energía (Kcal.g⁻¹)	4.6 ±1.0	4.4 ±0.6

7.3.2 Supervivencia y resistencia a WSSV

A las 72 horas post infección (hpi), los camarones de todos los tratamientos infectados presentaron una mortalidad significativa (**Figura 26**). El tiempo en que los tratamientos alcanzaron 50% de mortalidad es significativamente diferente ($P < 0.05$) para C+ (76.6 h) respecto

a FLac y DLac20 (81.6 y 84 h). A las 96 hpi, mientras el tratamiento C+ alcanzó más del 95% de mortalidad, los camarones alimentados con macroalga, fresca o en detritos en la dieta, presentaron una supervivencia de 30% a 40% ($P < 0.05$). El tratamiento DLac20 presentó la mayor supervivencia (27%) al día 7 post infección, seguido por el tratamiento FLacR (14%).

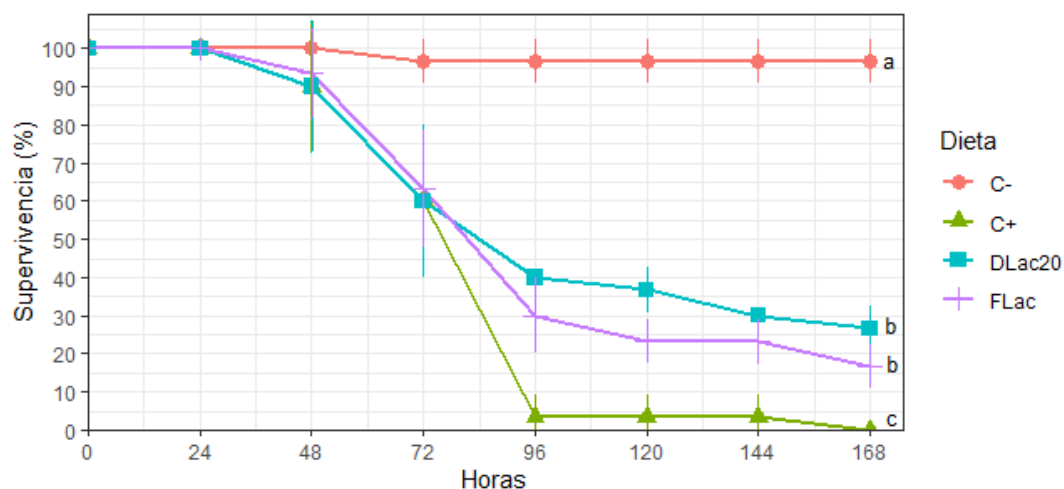


Figura 26. Supervivencia de *P. vannamei* inyectados con una solución salina (C-) o con el virus de la mancha blanca WSSV previamente alimentados 7 días con dieta que incluyeron *Ulva lactuca* fresca (FLac) y alimentos con 20% de detritos de *U. lactuca* como sustituto de harina de pescado (DLac20) o alimento control (C+).

La dieta FLac y el alimento DLac20 presentaron un menor ICA y entonces una mayor resistencia al virus de la mancha blanca (**Tabla 25**). La reducción en mortalidad fue mayor cuando *U. lactuca* está incluida en el alimento en forma de detritos (22%) comparado con la forma fresca (16.1%).

Tabla 25. Índice de mortalidad acumulada (ICA) y reducción en mortalidad de *P. vannamei* infectado con el virus de la mancha blanca (WSSV) previamente alimentados 7 días con dieta que incluyeron *Ulva lactuca* fresca (FLac) y alimentos con 20% de detritos de *U. lactuca* como sustituto de harina de pescado (DLac20) o alimento control (C+)

Tratamiento	ICA	Reducción en mortalidad (%)
C+	2.85 ± 0.35^a	
DLac20	2.23 ± 0.32^b	22.0
FLac	2.4 ± 0.16^b	16.1

7.3.3 Parámetros fisiológicos en hemolinfa

En la hemolinfa de los camarones alimentados con el alimento de referencia e infectados con WSSV (C+), se observa que la concentración de proteínas aumenta significativamente ($P < 0.05$) entre 0 y 48 hpi (112 contra $128.0 \pm 2.1 \text{ mg.mL}^{-1}$). Sin embargo, se mantiene constante en el tiempo (rangos 112 a 121 mg.mL^{-1}) para los camarones alimentados con FLac y DLac20. A las 48 hpi, no se presentaron diferencias en la cantidad de proteína entre el control no infectado (C-), DLac20 y FLac (**Figura 27**).

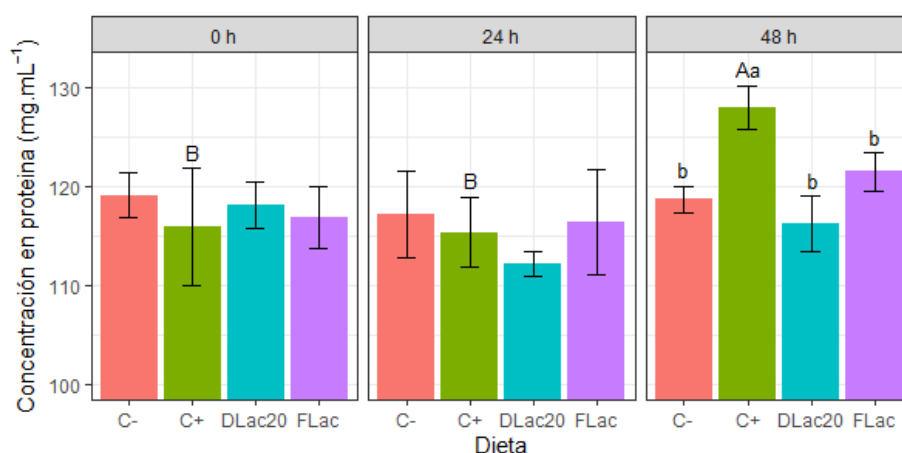


Figura 27. Concentración en proteínas en la hemolinfa de *P. vannamei* inyectados con una solución salina (C-) o con el virus de la mancha blanca WSSV previamente alimentados 7 días con dieta que incluyeron *Ulva lactuca* fresca (FLac) y alimentos con 20% de detritos de *U. lactuca* como sustituto de harina de pescado (DLac20) o alimento control (C+).

Al tiempo 0h, en la **Figura 28A**, se observa concentraciones más altas de lactato en todos los tratamientos (rangos 0.15 a 0.18 mg.mL^{-1}) comparado con C+ ($0.11 \pm 0.01 \text{ mg.mL}^{-1}$). Después, a las 24 o 48 hpi, las concentraciones de lactato disminuyen para los camarones en todos los tratamientos para alcanzar valores entre 0.01 y 0.03 mg.mL^{-1} de hemolinfa. Al contrario, se observa en la hemolinfa de los camarones C+ una mayor concentración en glucosa ($> 0.76 \text{ mg.mL}^{-1}$) durante los dos días de muestreo comparado con los otros tratamientos (**Figura 28B**). No se observó diferencias significativas en la concentración de glucosa entre FLac, DLac20 y el control negativo C- en los tres tiempos, y no hubo variabilidad entre los tiempos de muestreo (rangos 0.37 a 0.66 mg.mL^{-1}). Entre 0 y 48 hpi, la concentración de colesterol (**Figura 28C**) en la hemolinfa de los camarones C+ fue mayor ($> 0.26 \text{ mg.mL}^{-1}$) comparado a los otros tratamientos.

No se observaron diferencias significativas entre C-, FLac y DLac20 en los tres tiempos, y no hubo variabilidad en el tiempo (rangos 0.14 a 0.23 mg.mL⁻¹). Relativo a la concentración en triglicéridos (**Figura 28D**) en la hemolinfa de los camarones, no se observó diferencia significativa entre los tratamientos y durante el tiempo

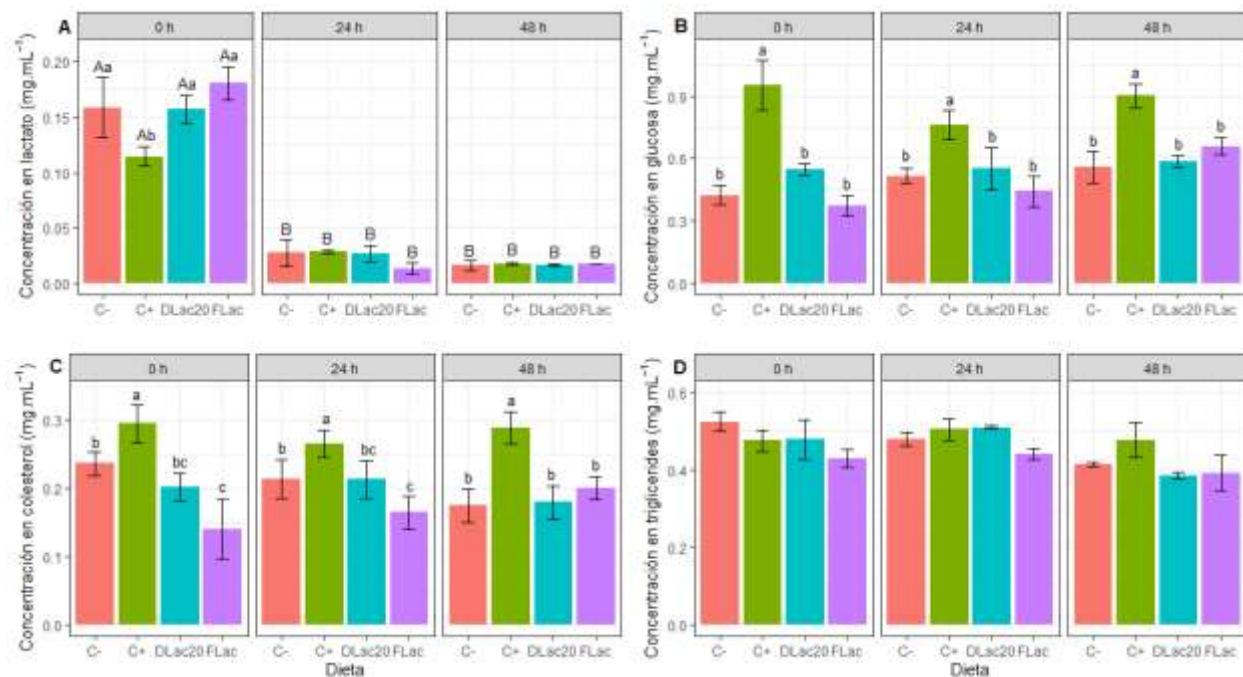


Figura 28. Concentración en (A) lactato, (B) glucosa, (C) colesterol y (D) triglicéridos en la hemolinfa de *P. vannamei* inyectados con una solución salina (C-) o con el virus de la mancha blanca (WSSV) previamente alimentados durante 7 días con dieta que incluyeron *Ulva lactuca* fresca (FLac) y alimentos con 20% de detritos de *U. lactuca* como sustituto de harina de pescado (DLac20) o alimento control (C+).

7.4 Objetivo 4: Evaluar la productividad y la dinámica de flujo de nutrientes del sistema de cultivo integrado multitrofico IMTA

7.4.1 Parámetros zootécnicos y crecimiento del alga

Respecto a los camarones, no se observaron diferencias significativas para la supervivencia entre los sistemas de cultivo (**Tabla 26**). A partir de la tercera semana se encontró una diferencia significativa ($P < 0.05$) en el peso individual de los camarones en los sistemas IMTA e IMTA-D comparado con el sistema de monocultivo. La misma tendencia siguió hasta el final del experimento (**Figura 29A**). En la sexta semana, los camarones de los sistemas IMTA e IMTA-D pesaron 34% y 28% más respectivamente, sin diferencia entre estos dos sistemas de cultivo, en

comparación con los del control. Eso resultó en la obtención de un peso final de cosecha más alto para los sistemas IMTA e IMTA-D comparado con el monocultivo (**Tabla 26**). Finalmente, la FCA fue significativamente inferior en los tratamientos IMTA e IMTA-D (1.37 y 1.44) comparado con el sistema de monocultivo (1.90).

Tabla 26. Supervivencia, peso final (PF), biomasa final a la cosecha, tasa de conversión específica (TCE) y factor de conversión alimenticia (FCA) de *P. vannamei* cultivados 6 semanas en un sistema de integración multitrófica con *C. gigas* y *U. lactuca* (IMTA), en un sistema IMTA con detritos como fuente de alimento para el camarón y el ostión (IMTA-D), y en un sistema de monocultivo tradicional (C).

Tratamiento	Supervivencia (%)	PF (g)	Biomasa final (g)	TCE (%.día ⁻¹)	FCA
C	89.3 ±4.8	4.21 ^b ±0.21	562.5 ^b ±12.2	6.65 ^b ±0.11	1.90 ^b ±0.04
IMTA	91.5 ±7.3	5.66 ^a ±0.69	773.5 ^a ±65.8	7.36 ^a ±0.28	1.37 ^a ±0.13
IMTA-D	90.8 ±6.4	5.38 ^a ±0.38	731.2 ^a ±24.4	7.23 ^a ±0.18	1.44 ^a ±0.05

Respecto a los ostiones, a partir de la cuarta semana de experimento, se observaron diferencias significativas en el peso de los organismos entre los sistemas de cultivo (**Figura 29B**). Al final del experimento, la supervivencia, el peso final, la longitud final y el índice de condición fueron significativamente menores en el sistema de cultivo IMTA-D comparado con los sistemas IMTA y C (**Tabla 27**).

Tabla 27. Supervivencia (Superv.), peso vivo final (PVF), longitud final (LF), peso seco final (PSF), tasa de conversión específica (TCE) e índice de Lawrence y Scott (ILS) de *C. gigas* cultivados 6 semanas en un sistema de integración multitrófica con *P. vannamei* y *U. lactuca* (IMTA), en un sistema IMTA con detritos como fuente de alimento para el camarón y el ostión (IMTA-D) y en un sistema de monocultivo tradicional (C).

Tratamiento	Superv. (%)	PVF (g)	LF (cm)	PSF (g)	TCE (%.día ⁻¹)	ILS
C	98.3 ^a ±3.3	1.11 ^a ±0.24	2.12 ^a ±0.05	0.12 ±0.03	4.63 ±0.31	85.3 ^a ±5.1
IMTA	91.7 ^a ±6.4	0.99 ^{ab} ±0.09	1.93 ^b ±0.05	0.11 ±0.01	4.47 ±0.16	81.4 ^a ±8.4
IMTA-D	45.0 ^b ±10.0	0.88 ^b ±0.02	1.94 ^b ±0.06	0.10 ±0.01	4.22 ±0.10	69.4 ^b ±5.3

Finalmente, la biomasa final de macroalga (**Figura 29C**) resultó significativamente más alta ($P < 0.05$) en el sistema IMTA-D desde la primera semana y alcanzó un promedio final de cosecha de 1210.5 ± 158.7 g, seguido por la producción final del sistema IMTA (868.0 ± 48.0 g) y finalmente el sistema de monocultivo de macroalgas (664.0 ± 77.3 g). Las tasas de crecimiento

específicas fueron respectivamente las siguientes: $5.9 \pm 0.3 \text{ \%}\cdot\text{día}^{-1}$, $5.1 \pm 0.2 \text{ \%}\cdot\text{día}^{-1}$ y $4.5 \pm 0.3 \text{ \%}\cdot\text{día}^{-1}$.

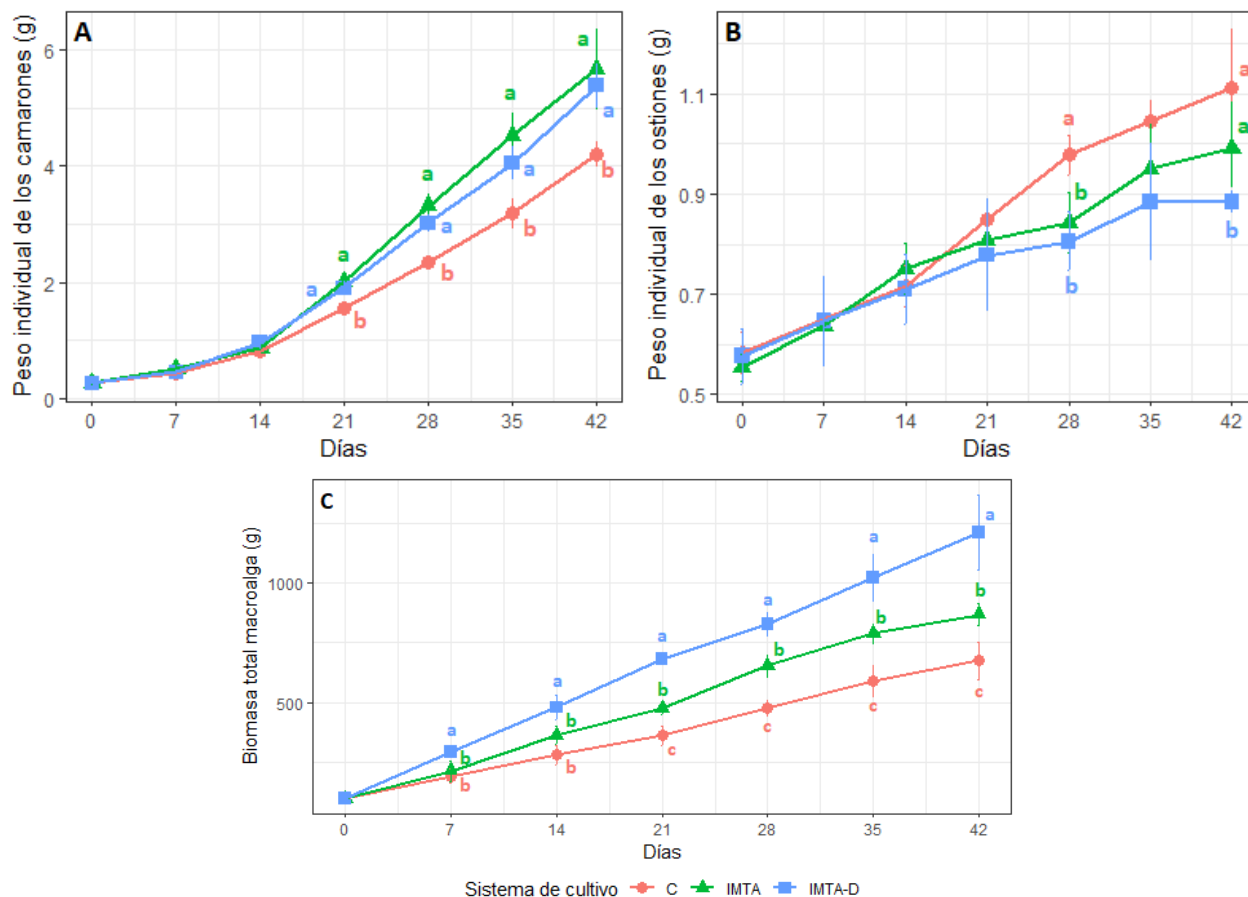


Figura 29. Peso semanal de **(A)** *P. vannamei*, **(B)** *C. gigas* y **(C)** biomasa semanal de *U. lactuca* cultivados 6 semanas en un sistema de integración multitrófica (IMTA), en un sistema IMTA con detritos como fuente de alimento para el camarón y el ostión (IMTA-D) y en sus sistemas respectivos de monocultivo (C).

7.4.2 Calidad del agua

Las concentraciones de amonio, nitrito, nitrato y fosfato fueron homogéneas entre los diferentes tanques (camarón, ostión y macroalga) a lo largo de los sistemas IMTA. Para comparar, se ilustraron las curvas de concentración únicamente de los sistemas de cultivo de camarón. Se observaron concentraciones significativamente más altas en amonio en el sistema de monocultivo a partir del día 21 comparado con los sistemas IMTA e IMTA-D, con una biorremediación máxima el día 35, del 88% y del 85% respectivamente (**Figura 30A**).

La concentración de nitrito alcanzó su máximo el día 35 en los tres sistemas de cultivo. En los sistemas IMTA e IMTA-D se observó una reducción significativa del 63% comparado con el sistema de monocultivo (**Figura 30B**). El nitrato se observó en su concentración máxima el día 42 del experimento. El sistema de monocultivo presentó un nivel 3 veces más alto comparado con los sistemas IMTA e IMTA-D (**Figura 30C**). Finalmente, la concentración en fosfato fue significativamente más alta los días 35 y 42 del cultivo. La biorremediación en los sistemas IMTA e IMTA-D del fosfato alcanzó los 47% y 50% respectivamente al día 42 del experimento (**Figura 30D**). El agua del sistema de monocultivo de ostión se mantuvo con un promedio de amonio de 0.53 ± 0.08 ppm, un máximo en nitrito de 3 ppm el día 35, en nitrato de 50 ppm el día 42 y en fosfato de 5 ppm el día 42. El agua del sistema de monocultivo de las macroalgas se mantuvo con un promedio de 0.25 ppm de amonio, un máximo en nitrito de 1.25, en nitrato de 10 ppm y en fosfato de 3.25 ppm el día 42.

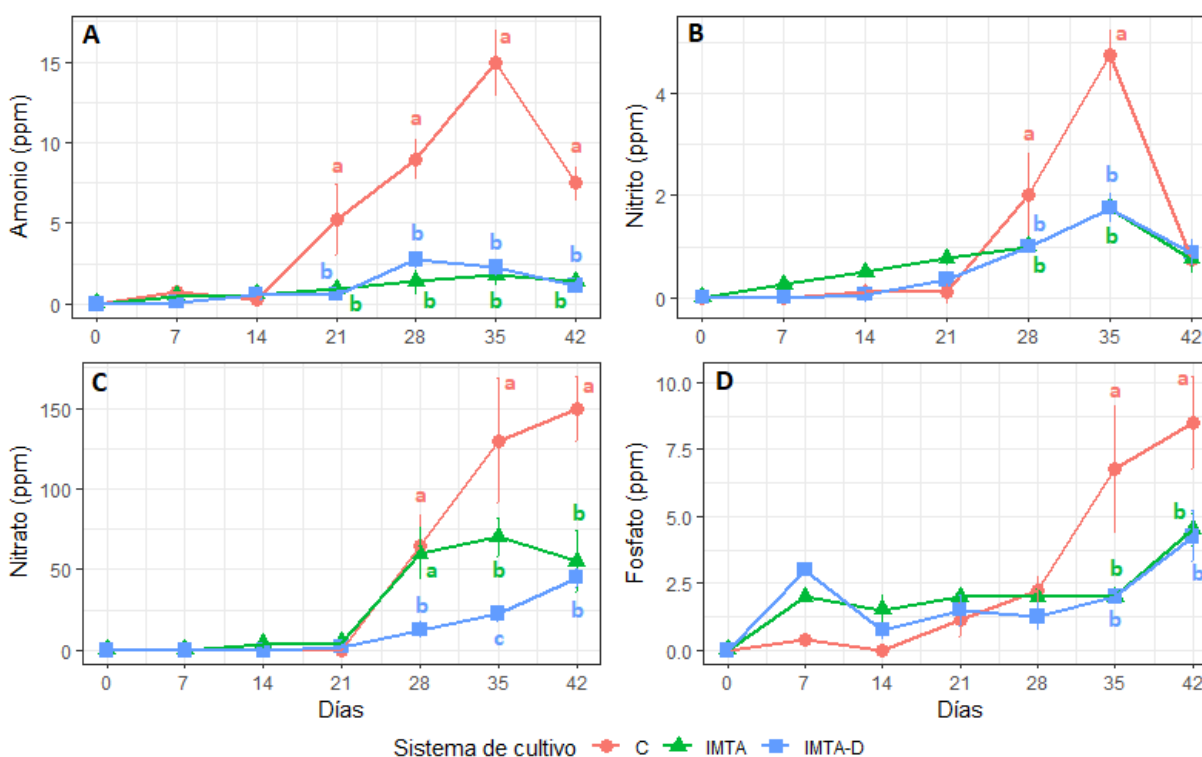


Figura 30. Concentración en (A) amonio, (B) fosfato, (C) nitrito y (D) nitrato en el agua de un sistema de integración multitrófica con *P. vannamei*, *C. gigas* y *U. lactuca* (IMTA), de un sistema IMTA con detritos como fuente de alimento para el camarón y el ostión (IMTA-D) y en un sistema de monocultivo de camarón (C).

Los sistemas de monocultivo de ostión y macroalga no presentaron partículas sedimentables totales en el agua (**Figura 31**). Respecto a los sistemas de cultivo de camarón, se observó en los sistemas IMTA e IMTA-D una disminución en la concentración de partículas sedimentables totales a partir del día 14 hasta alcanzar una biorremediación del 75% y 73% respectivo al sistema tradicional de monocultivo.

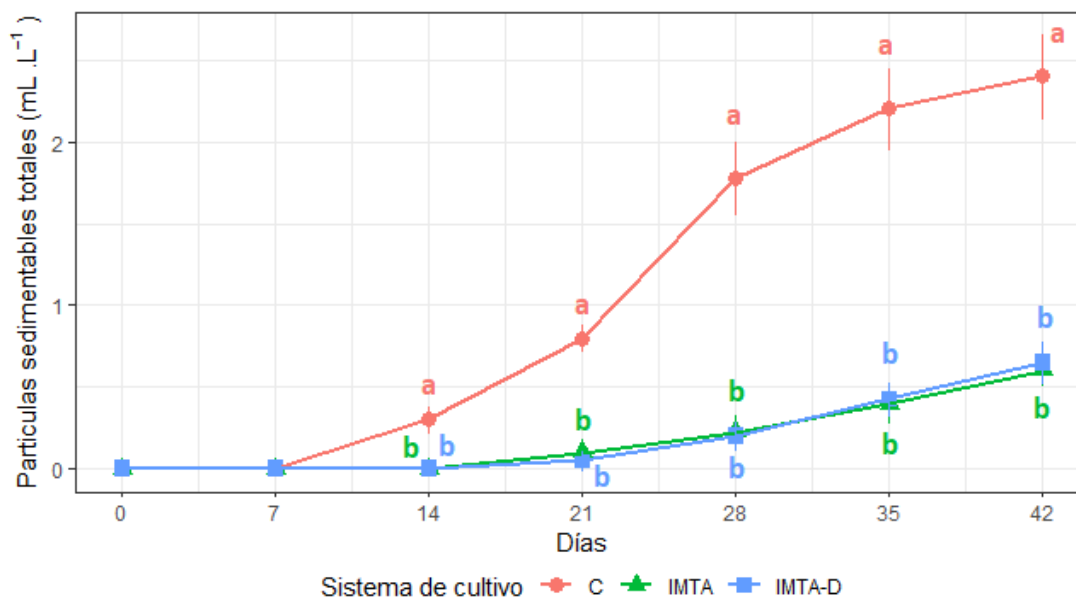


Figura 31. Concentración de partículas sedimentables totales en el agua de un sistema de integración multitrófica con *P. vannamei*, *C. gigas* y *U. lactuca* (IMTA), de un sistema IMTA con detritos como fuente de alimento para el camarón y el ostión (IMTA-D) y en un sistema de monocultivo de camarón (C).

7.4.3 Flujo de nutrientes

Los nutrientes (N y P) fueron menos aprovechados en los sistemas de monocultivo (**Figura 32**) comparado con los dos sistemas IMTA de *P. vannamei*, *C. gigas* y *U. lactuca* sin detritos (**Figura 33**) y con detritos (**Figura 34**).

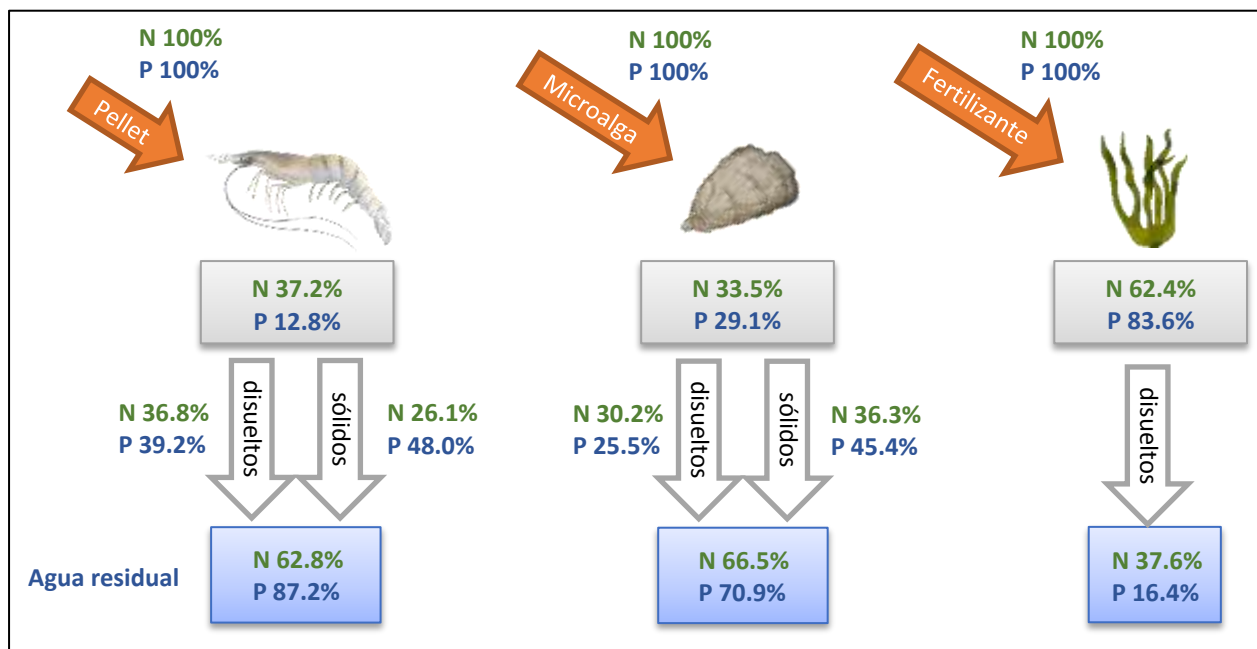


Figura 32. Flujo de nitrógeno (N) y fósforo (P) en sistemas acuícolas de monocultivo de *P. vannamei*, *C. gigas* y *U. lactuca*.

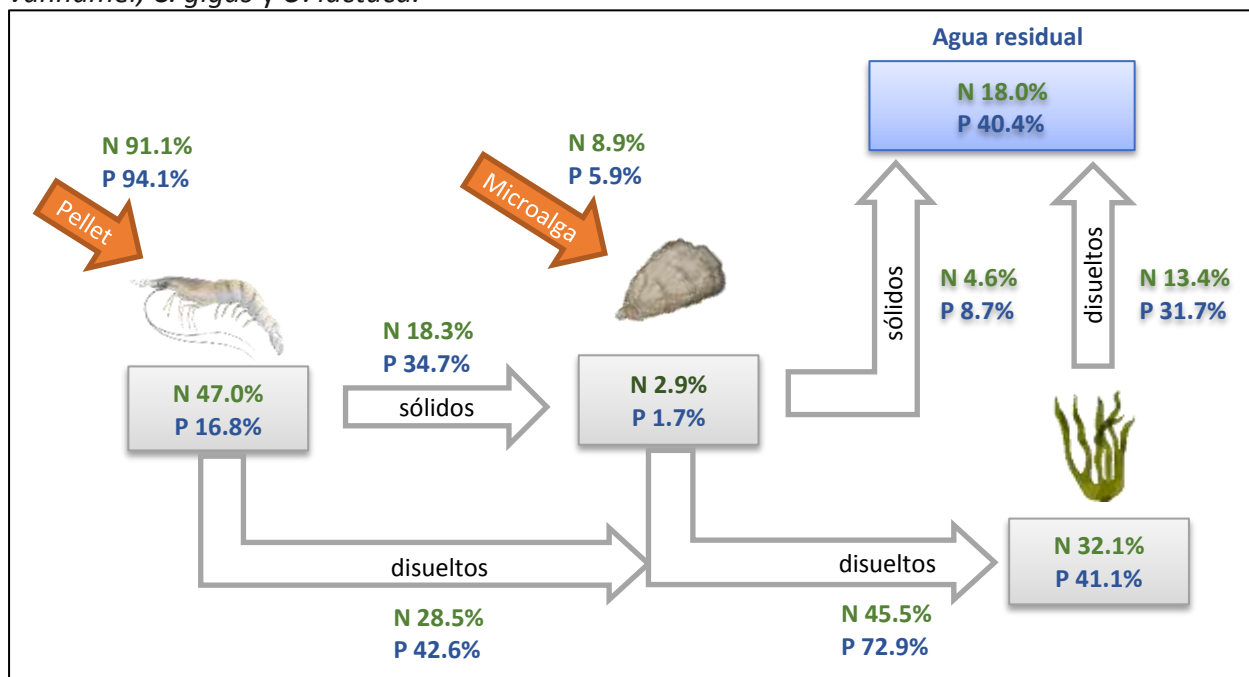


Figura 33. Flujo de nitrógeno (N) y fósforo (P) en un sistema de integración multitrofica con *P. vannamei*, *C. gigas* y *U. lactuca*.

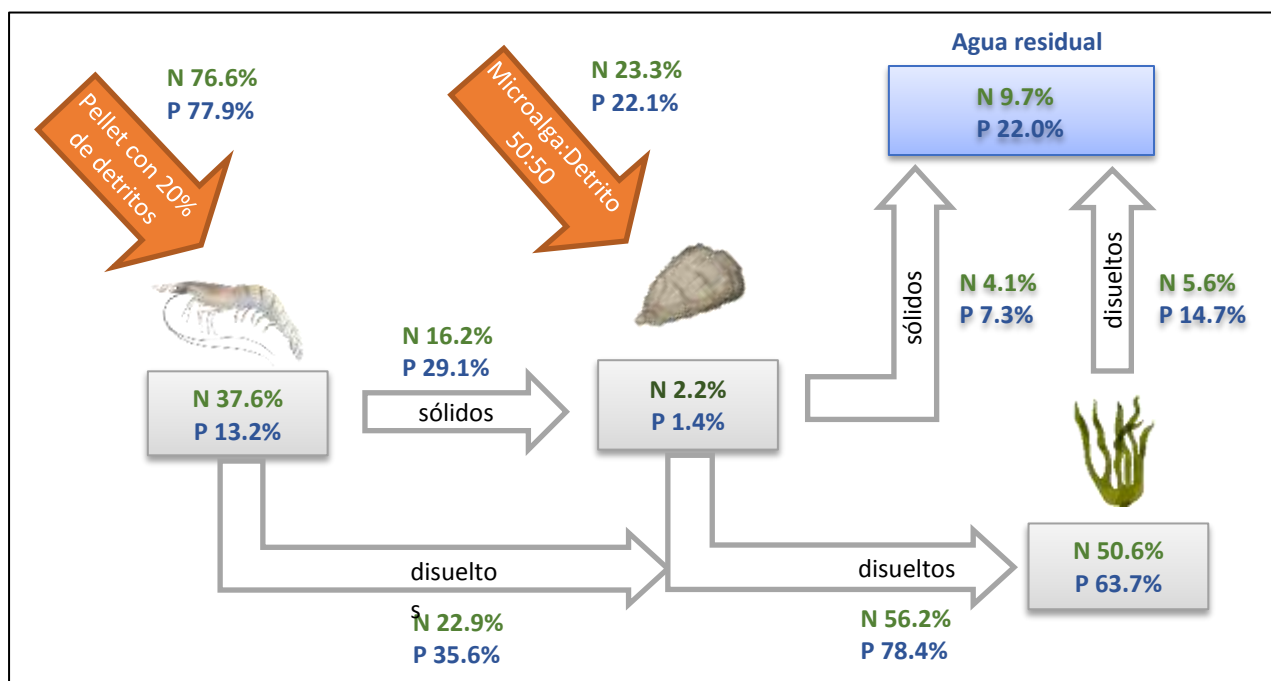


Figura 34. Flujo de nitrógeno (N) y fósforo (P) en un sistema de integración multitrófica con *P. vannamei*, *C. gigas* y *U. lactuca* utilizando los detritos de *U. lactuca* como fuente de proteína para el camarón y el ostión.

8. DISCUSIÓN

En los últimos años, la acuicultura ha evolucionado hacia prácticas ecológicas y sostenibles, por lo que la integración de diferentes organismos pertenecientes a diferentes niveles tróficos ha ganado un interés creciente debido a su potencial para generar beneficios ambientales y socioeconómicos.

8.1 Biorremediación de los nutrientes en sistemas IMTA

8.1.1 Capacidad de *C. gigas* en la biorremediación del agua en un sistema IMTA camarón-ostión

Diferentes estudios han demostrado que *Crassostrea* sp. tiene la capacidad de mitigar los procesos de eutrofización (Kellogg *et al.*, 2014), al consumir fitoplancton, bacterias y otros sólidos suspendidos de la columna de agua, razón por la cual se incluye como biofiltro en los sistemas de cultivo de camarón (Jones *et al.*, 2001; Shimoda *et al.*, 2006; Tendencia, 2007; Ramos *et al.*, 2009). En términos de nutrientes solubles en el agua, tanto los camarones como los ostiones excretan amonio y fosfato debido a su metabolismo, sin embargo, la presencia de *C. gigas* en los tanques de camarones solo aumentó significativamente la concentración de fosfato en el agua, pero no se mostraron diferencias en los compuestos nitrogenados en comparación con los camarones de monocultivo. Tendencia (2007) describió un efecto similar, con un aumento en el fosfato y sin diferencias en las concentraciones de amonio y nitrato en el agua entre los tanques de camarones *P. monodon* con ostión *S. commercialis* y los tanques control sin ostión. En contrario, Jones *et al.* (2001) queriendo mejorar el efluente del agua residual de los camarones, conectaron un tanque de cultivo de ostiones y demostraron un aumento del nitrógeno total y del fosfato en el agua. También se ha documentado que la relación de la biomasa de camarones y moluscos en un sistema integrado puede influir en la calidad del agua; Martínez-Cordova y Martínez-Porchas (2006) observaron una reducción significativa del amonio total cuando se incluyeron camarones *P. vannamei* y moluscos *C. gigas* y *Chione fluctifraga* en una proporción de ~1:1. En sistemas sin o con poca renovación de agua, el fitoplancton y las bacterias presentes en el agua son responsables de la incorporación y/o

transformación del amonio y se depositan en el sedimento como materia orgánica en partículas (Shimoda *et al.*, 2006; Da Silva *et al.*, 2013). Por lo tanto, los resultados sugieren que el sistema IMTA mantiene bacterias activas y/o comunidades vigorosas de fitoplancton (en la fase logarítmica), que utilizan preferentemente amonio (Burford y Lorenzen, 2004; Martínez-Cordova y Martínez-Porchas, 2006) y permiten mantener concentraciones de nitrógeno equivalentes al sistema de monocultivo.

Además, como se observó en este estudio, Ferreira *et al.* (2012) también informaron la capacidad de *C. gigas* para biorremediar la mitad de la acumulación de sedimentos de la dorada *Sparus aurata*. Jones *et al.* (2001) lograron biorremediar el 69% de las partículas suspendidas de los efluentes de camarones con cuatro circuitos de agua a través de estanques conteniendo *Saccostrea glomerata*. En contraste, Martínez-Cordova y Martínez-Porchas (2006) solo alcanzaron la remediación del 25% de las partículas sedimentables de camarones con *C. gigas* y *Chione fluctifraga*. Jones y Preston (1999) sugirieron que el número de ostiones podría aumentarse si se requieren incrementar las mejoras en la calidad del agua, pero podría afectar el crecimiento y la supervivencia de los mismos (Jones *et al.*, 2002; Martínez-Cordova y Martínez-Porchas, 2006).

8.1.2 Capacidad de las macroalgas en la biorremediación del agua residual de camarón

El cultivo de macroalga en los sistemas IMTA permite mejorar la calidad del agua, particularmente disminuir la concentración de materia inorgánica disuelta en el agua. *Ulva lactuca* y *Ulva clathrata* se presentan como especies deseables para la biorremediación de aguas residuales en sistemas IMTA (Elizondo-González *et al.*, 2018).

En este estudio, se observó una biorremediación en ambos casos de 91.3% del amonio en solo 3 horas de exposición al agua residual de cultivo de camarón en una relación biomasa de alga (g) volumen de agua (L) de 8:1. Entonces, se estima que para un cultivo intensivo de camarón en tanques de 800 L se necesitarían 5.6 kg de algas para obtener una tasa de biorremediación equivalente. Resultados similares de absorción de amonio se han observado para las macroalgas

Ulva fasciata y *Gracilaria birdiae* (1 g.L^{-1}) después de cinco días de cultivo en el agua residual de camarón (Raposo *et al.*, 2013; Castelar *et al.*, 2015). El efecto de la densidad de alga sobre la biorremediación de nutrientes fue descrito por Brito *et al.* (2014), en el cual una mayor densidad *G. birdiae* (de 2.5 a 7.5 g.L^{-1}) permite mejorar la absorción del nitrógeno inorgánico disuelto total, del amonio y del nitrato de 19% a 38%. Al contrario, no se observó un efecto significativo de la densidad de macroalga sobre el fosfato y el nitrito. En el experimento realizado en este trabajo, la biorremediación del fosfato, del nitrito y del nitrato no fue completa en 3 horas (respectivamente, 32.5%, 22.5% y 51.3%). Los resultados se explican por el fenómeno por el cual las algas del género *Ulva sp.* prefieren la fuente de nitrógeno en forma de amonio más que nitrito y nitrato como en plantas terrestres, debido a que el amonio puede ser absorbido directamente pero el nitrito y el nitrato requieren ser reducidos en amonio (Liu *et al.*, 2004; Ale *et al.*, 2011). Castelar *et al.* (2015) observaron una absorción del fosfato únicamente a partir del tercer día de cultivo de *Ulva flexuosa* y *Ulva fasciata* en agua eutrofizada, los cuales remediaron $98.2 \pm 3.7\%$ de amonio, $98.4 \pm 3.0\%$ de nitrato y $62.1 \pm 0.0\%$ de fosfato. Este resultado, sugiere que con más tiempo y una densidad adecuada las algas podrían biorremediar la mayor parte del amonio, nitrito, nitrato y fosfato en el agua residual de los camarones.

8.1.3 Biorremediación del agua en un sistema IMTA con *P. vannamei*, *C. gigas* y *U. lactuca*

En este trabajo, el sistema IMTA se desarrolló con *P. vannamei*, *C. gigas* y *U. lactuca*. De acuerdo con los resultados obtenidos en el sistema de cocultivo camarón-ostión (densidad ostión: camarón 1:15), se incrementó la densidad a 1 ostión por 10 camarones. De acuerdo a lo sugerido previamente por Jones y Preston (1999), un incremento de la densidad de los ostiones permitió mejorar la calidad del agua en los sistemas IMTA. Mientras en el primer ensayo de cocultivo camarón-ostión se observó una disminución de la concentración de partículas sedimentables totales del 50% comparado con el sistema de monocultivo, en este último experimento se lograron reducir al 75%. Contrario a los resultados obtenidos en estudios previos (Jones *et al.*, 2002; Martínez-Cordova y Martínez-Porchas, 2006), el incremento en la densidad de los ostiones en este trabajo no resultó en un incremento de la mortalidad o una pérdida en la ganancia de peso de los ostiones. Entonces, para disminuir significativamente la

concentración en partículas sedimentables totales, y mejorar la calidad del agua, en un cultivo intensivo de camarón blanco *P. vannamei*, se recomienda cultivarlos en un sistema multitrófico con una densidad mínima de ostiones de 1 organismo por cada 10 camarones y alimentarlos con microalga *C. calcitrans* a saciedad.

De acuerdo a lo esperado con respecto a los resultados de biorremediación de materia inorgánica, la macroalga *U. lactuca* permitió biorremediar 88% del amonio, 63% del nitrito, 66% del nitrato y 50% del fosfato con un flujo de agua en el sistema de 45 L.h⁻¹. En el ensayo de cultivo de *U. lactuca* en agua residual de cultivo intensivo de camarón, se observó que después de 3 horas, una biorremediación fue de 91%, 22%, 51% y 32% de cada elemento respectivamente, para una densidad de macroalga de 8 g.L⁻¹. Como punto de comparación, la densidad de macroalga en los sistemas IMTA desarrollados equivale a 34 g.L⁻¹, en el punto más alto de biorremediación. Por lo tanto, el incremento de la densidad de macroalga permitió mejorar la calidad del agua en los sistemas IMTA, especialmente mediante la disminución en las concentraciones de nitrito, nitrato y fosfato en el agua. De igual forma, se ha sugerido que múltiples ciclos de circulación del agua a través del sistema, permiten incrementar la capacidad de biorremediación de las macroalgas (Raposo *et al.*, 2013; Castelar *et al.*, 2015). En este estudio, el flujo de agua corresponde a una recirculación diaria del 135%. Entonces, la recirculación lenta del agua y la densidad de macroalga son dos factores que permitieron incrementar la biorremediación de la materia inorgánica en los sistemas IMTA comparado con el sistema de monocultivo de camarón.

Cultivar *P. vannamei* con *C. gigas* (biorremediador de materia orgánica) y *U. lactuca* (biorremediador de compuestos inorgánicos) en un sistema de recirculación, permite reducir significativamente la carga de nutrientes en las aguas residuales de los sistemas de producción y así atenuar el fenómeno de eutrofización debido a la camaronicultura en las zonas costeras.

8.2 Productividad en sistemas IMTA

8.2.1 Productividad en el sistema IMTA camarón-osti6n

La disminuci6n de la materia orgánica particulada en el agua causada por la presencia del osti6n en el sistema IMTA, se ha relacionado con la mejora en el rendimiento del camar6n como se ha descrito previamente en otros estudios (Jones y Preston, 1999; Martinez-Cordova y Martinez-Porchas, 2006; Ramos *et al.*, 2009). En consecuencia, la mejora de la calidad del agua del sistema de cocultivo permiti6 a los camarones hacer un uso energéticamente mäs eficiente del alimento y tener una mayor eficiencia de retenci6n de proteina para su crecimiento. Esto se puede relacionar con el incremento de bacterias que realizan las funciones relacionadas al metabolismo de los aminoácidos, obtenidos con el análisis de predicci6n funcional del programa bioinformático PICRUST; siendo mayor la abundancia de bacterias asociadas al metabolismo de la tirosina, histidina y treonina, amino ácidos reportados como presentes en mayor concentraci6n en el tejido muscular del camar6n e implicados en la renovaci6n de proteina, responsable de una gran fracci6n del presupuesto de energía (Juneta-Nor *et al.*, 2020). Ademäs, se observ6 en los resultados un incremento en la abundancia de las bacterias implicadas en el metabolismo lipídico de los camarones, especialmente en el metabolismo del ácido araquid6nico, lo que se puede relacionar con la reducci6n de la biosíntesis de los ácidos grasos insaturados en el musculo del camar6n; resultados que coinciden con Araújo *et al.* (2020), donde se demostr6 que la inclusi6n de ácido araquid6nico en la dieta de *P. vannamei* resulta en un impacto negativo en el crecimiento del camar6n. No obstante, Shanab *et al.* (2018) reportaron la ausencia de ácido araquid6nico en *U. lactuca*, pero una alta concentraci6n en ácido linolénico. Por el contrario, González-Félix *et al.* (2003) demostraron que un alimento suplementado al 0.5% con ácido araquid6nico, mejora la ganancia en peso del camar6n e incrementa los contenidos de ácidos grasos saturados con respecto a los otros ácidos grasos insaturados en el hepatopáncreas y en el musculo, mientras que la suplementaci6n a 0.5% con el ácido linolénico no permiti6 un incremento en el crecimiento del camar6n y disminuy6 los ácidos grasos saturados a favor de los poliinsaturados en la composici6n del hepatopáncreas y del musculo, comparado con los camarones alimentados con una dieta control. Debido a los

resultados del análisis de las comunidades bacterianas digestivas y sus predicciones funcionales, se demostró que el camarón modificó el metabolismo en el hepatopáncreas del camarón a favor de su crecimiento.

El mayor problema observado en el cocultivo fue la mortalidad significativa de los ostiones a partir de la tercera semana de cultivo. El estudio de las vías metabólicas KEGG resalta una disminución de las comunidades bacterianas de la glándula digestiva del ostión implicadas en el crecimiento y la muerte celular (incremento del ciclo celular) y en la vía de señalización de proteínas quinasas activadas por mitógenos necesarias para la inducción de mitosis en células eucariotas, comparado con los ostiones de monocultivo. La composición química de las partículas es un parámetro de selección importante durante el proceso de filtración de los ostiones. Los alimentos ricos en lípidos y la selección preferencial de partículas ricas en nitrógeno permiten mejorar la absorción de carbono y, por lo tanto, el crecimiento de los moluscos bivalvos (Bayne y Svensson, 2006; Bayne, 2009). Se ha informado que las heces de camarón contienen una relación C/N de 6.4 para un contenido de proteína del alimento con un 35% de proteína y una relación C/N de 6.9 (Beardsley *et al.*, 2011). Por lo tanto, en el presente trabajo, el valor nutricional de los desechos de los camarones tanto como del alimento no consumido, como únicas fuentes de alimento posibles para los ostiones en el sistema de cocultivo, podría ser un factor limitante para el crecimiento de los ostiones. De hecho, el análisis de las vías KEGG resalta una disminución de la abundancia de bacterias implicadas en el metabolismo de cofactores y vitaminas y en el metabolismo de clorofila relacionado con la ausencia de consumo de microalga en el sistema de cocultivo. Además, disminuyó la abundancia de bacterias involucradas en la biosíntesis de vitaminas B5 y B1. Estas vitaminas son precursores de acetyl-CoA, esencial en el metabolismo de los lípidos (biosíntesis de ácidos grasos, glicolípidos y fosfolípidos), entre otros, que también se vio afectado en los resultados obtenidos. La productividad de los ostiones observada en este trabajo se puede relacionar con estas observaciones, ya que la supervivencia y el peso mostraron disminuyeron en el sistema de cocultivo después de 30 días.

A pesar de esto, la mortalidad de *C. gigas* está comúnmente asociada a las características físico-químicas del agua de su cultivo. En este trabajo la temperatura promedio del agua fue de $29 \pm 0.5^\circ\text{C}$. La alta mortalidad de *C. gigas* (83.8 a 89.3%) en un policultivo con *P. vannamei* y *C. fluctifraga* obtenida por Martínez-Cordova y Martínez-Porchas (2006), se asoció a las temperaturas superiores a 30°C registradas en algunos períodos del experimento de 9 meses. Por otro lado, según Fernández *et al.* (2014), los episodios de mortalidad repetitiva son causados con mayor frecuencia por patologías bacterianas. En efecto, a altas temperaturas, se promueve un mayor número de bacterias en el agua, que desempeñan un papel en el incremento de la susceptibilidad de los ostiones a la contaminación bacteriana (Aagesen y Häse, 2014). En particular, las bacterias del género *Vibrio* pueden causar mortalidades en ostiones juveniles con concentraciones a partir de 10^4 ufc.osti ón^{-1} (Lacoste *et al.*, 2001). En este trabajo, la carga de bacterias totales ($> 2 \times 10^5$ ufc.mL $^{-1}$) y de *Vibrio* ($> 2 \times 10^4$ ufc.mL $^{-1}$) en el agua del cocultivo, podría contribuir a la mortalidad de ostión. Sin embargo, la glándula digestiva del ostión presentó una disminución de la abundancia relativa de *Vibrio*, lo que descarta esta hipótesis. Finalmente, según Malham *et al.* (2009), las concentraciones letales de nitrito y nitrato para el ostión son respectivamente de 5.14 ppm y 278 ppm, por lo tanto estas altas concentraciones podrían ser una causa de mortalidad en el sistema de cocultivo, ya que en este trabajo se encontraron acerca de 30 ppm y 350 ppm, respectivamente.

En consecuencia, para el desarrollo del sistema IMTA, es importante suplementar la alimentación del ostión con otra fuente alimenticia y controlar los niveles de nitrito y nitrato con la macroalga *Ulva* sp. con capacidad de biorremediación.

8.2.2 Productividad de las macroalgas cultivadas con agua residual de camarón

Ulva lactuca demostró un mayor crecimiento comparado con *Ulva clathrata* después de 7 días cultivados en el agua residual de camarón. La capacidad de asimilación de los nutrientes varía entre las especies de macroalgas e influye en su crecimiento (Ale *et al.*, 2011). Los resultados mostraron al amonio como primera y principal fuente de nitrógeno para el crecimiento de ambas macroalgas, como se ha demostrado en otros estudios (Liu *et al.*, 2004; Ale *et al.*, 2011).

Al contrario, el uso del nitrito y nitrato requiere una bioconversión en amonio la cual requiere la inversión de mucha energía en las células del alga (Ale *et al.*, 2011). Finalmente, los resultados demostraron que *U. lactuca* aprovecha más eficientemente los nutrientes para la síntesis de aminoácidos y proteínas, lo que resulta en un mejor crecimiento de células y tejidos comparado con *U. clathrata*. Por lo tanto, para cumplir el objetivo de producir una fuente secundaria de alimentos para camarón y ostión y como parte del sistema IMTA, se seleccionó a la macroalga *U. lactuca*.

8.2.3 Productividad de *P. vannamei*, *C. gigas* y *U. lactuca* en un sistema IMTA

Como previamente se ha observado en el sistema camarón-ostión, el sistema IMTA permitió incrementar la productividad de *P. vannamei*, lo cual resultó en un mayor peso final, mejor biomasa de cosecha y una mejor tasa de conversión específica de los organismos, comparado con el sistema de monocultivo de camarón. De hecho, la diferencia de ganancia en peso del camarón fue mayor en el sistema IMTA (+34%) que en el sistema camarón-ostión (+10%), comparándolos con sus sistemas de monocultivo respectivos. Previamente, se sugirió que la mejora de la calidad del agua en el sistema multitrófico permitió a los camarones un mejor aprovechamiento de los nutrientes y así favorecer su crecimiento (Jones y Preston, 1999; Martínez-Cordova y Martínez-Porchas, 2006; Ramos *et al.*, 2009). Entonces, con la biorremediación de los compuestos sólidos y disueltos en el agua en el sistema IMTA promovidas por la capacidad de filtración del ostión *C. gigas* y de la macroalga *U. lactuca*, cultivar el camarón blanco *P. vannamei* con estas dos especies en un sistema IMTA, permitió favorecer el crecimiento del camarón y así mejorar la producción en el mismo tiempo de cultivo si se compara con sistemas de monocultivo.

Este trabajo demostró que la mortalidad de los ostiones en el sistema IMTA no está relacionada con la temperatura del agua (29°C), ya que la supervivencia de los organismos en el sistema de monocultivo (98.3 ±3.3%), tanto como en el sistema IMTA (91.7 ±6.4), fue superior a la supervivencia observada en el cocultivo camarón-ostión del bioensayo 1. Además, los desechos sedimentables generados por el camarón, no impidieron el crecimiento y la supervivencia de los

ostiones en el sistema IMTA, contrario a lo observado en el experimento de cocultivo ostión-camarón, ya que tuvieron una tasa de crecimiento equivalente al sistema de monocultivo; esto debido al aporte de microalga *C. calcitrans*, como otra fuente de alimento de alta calidad nutricional para el ostión. Finalmente, el control de las concentraciones de nitritos y nitratos por la presencia de *U. lactuca* junto con la alimentación suplementaria a saciedad del ostión con *C. calcitrans*, permitieron mantener a los ostiones en un estado de condición saludable para sobrevivir y crecer en el sistema. El sistema IMTA permite diversificar los productos finales de la acuicultura con la producción adicional de *C. gigas*, un organismo de alto valor comercial; pero implica la necesidad de producir y aportar al sistema una microalga como *C. calcitrans* para satisfacer las necesidades alimentarias del ostión para su crecimiento y su supervivencia en el sistema integrado.

La biomasa final de la macroalga cultivada en el sistema IMTA con camarón y ostión fue mayor (+29%) comparado con el sistema de monocultivo de macroalga. Este resultado se podría explicar porque el amonio, fuente preferible de nutrientes para el crecimiento de *U. lactuca* (Liu *et al.*, 2004; Ale *et al.*, 2011), llegó a subir hasta 15 ppm en el sistema de monocultivo de camarón, mientras se mantuvo en el sistema IMTA a una concentración que no superó los 3 ppm y solo estaba controlado a 0.5 ppm en el sistema de monocultivo de macroalga. Se demostró previamente que el camarón tanto como el ostión produjeron continuamente amonio disuelto en el agua, lo que incrementó la concentración de este compuesto en el cocultivo comparado con los sistemas de monocultivo; pero en el sistema IMTA con macroalga, la capacidad de biorremediación de *U. lactuca* permitió reducir los niveles de amonio, y por consecuencia directa los niveles de nitrito y nitrato, lo que generó una mayor producción de biomasa de macroalga, otro producto con potencial comercial.

Finalmente, se ha demostrado previamente que la biomasa de macroalgas producidas por los efluentes de la acuicultura contiene 2 a 4 veces más proteína que las macroalgas silvestres (Shpigel y Neori, 2007). En este trabajo, el sistema IMTA permitió incrementar cerca del doble su contenido en proteína de *U. lactuca* (11% a 19%). En consecuencia, este aporte nutricional

abre posibilidades en varios sectores agroalimentarios (Dominguez y Loret, 2019), incluyendo para su utilización como fuente de proteína alternativa en el alimento de los camarones (Ashkenazi *et al.*, 2018).

8.3 Interés de los detritos de *U. lactuca* como ingrediente funcional en la alimentación del camarón y del ostión

8.3.1 Detritos de macroalga *U. lactuca* e interés para su uso en la alimentación del camarón y del ostión

El contenido de proteína cruda en la materia prima de algas marinas estuvo dentro del rango reportado anteriormente (Marsham *et al.*, 2007). Uno de los principales intereses en la producción de detritos a partir de algas marinas consiste en mejorar el valor nutricional (fuentes ricas en proteínas y lípidos), con la mayor recuperación de la materia primaria para su uso en alimentos formulados (Uchida y Murata, 2002; Harel *et al.*, 2007). Por ello, se ha propuesto la fabricación de detritos a través de procesos bioquímicos sencillos de predigestión de la macroalga. En este trabajo, el proceso propuesto distingue el detrito para ostión, el cual corresponde a la parte líquida filtrada recuperada antes de la fermentación; y el detrito para camarón que es el producto obtenido al final de la fermentación.

En la parte filtrada de los detritos de *U. lactuca*, el contenido de proteína se incrementó 21% respecto a la materia prima y el contenido de lípidos aumentó casi 9 veces. La fermentación de *U. lactuca* en Felix and Brindo (2014a) resultó en un incremento en el contenido de proteína de 45% y en el contenido de lípidos de 2 veces. Según Hou *et al.* (2015), la hidrólisis durante la producción de detritos permite liberar azúcares, cenizas y otros componentes en la fracción líquida y la mayor parte de la recuperación de proteínas se obtiene en la fracción sólida. Por lo tanto, el proceso de filtración a 20 μm aplicado en el presente estudio pudo haber separado el contenido de proteína en la fracción sólida, lo que puede ser más útil en alimentos acuícolas para otros organismos. En este sentido, Peña Rodríguez *et al.* (2020) presentaron que los detritos de *U. lactuca* filtrados a 20 μm , también resultaron en un mayor incremento en el contenido de proteína (+ 33%) y menor en el contenido de lípidos (incremento de 2 veces), lo

que podría estar asociado al paso de fermentación bacteriana, que no se aplicó para la fracción destinada a los ostiones. Por otro lado, los tratamientos ácido y enzimático aplicados para esta fracción de los detritos destinada para el ostión tuvieron un rol importante en el tamaño de las partículas. En estudios anteriores, en los cuales se utilizaron diferentes especies de algas y procesos, todos los tamaños de los detritos estaban por debajo de 20 μm (Uchida y Murata, 2002; Pérez Camacho *et al.*, 2004, 2007; Tanyaros y Chuseingjaw, 2014; Peña Rodríguez *et al.*, 2020). Sin embargo, Tanyaros y Chuseingjaw (2014) obtuvieron solo un 20% de las partículas un diámetro inferior a 10 μm mediante el uso de un proceso mecánico de mezcla y agitación; mientras que en este estudio, las digestiones ácidas y enzimáticas permitieron disminuir el tamaño de partícula hasta alcanzar más del 87% con un intervalo de tamaño entre 1 y 10 μm . Este último intervalo es similar al diámetro celular de la microalga *C. calcitrans* (3-9 μm) (Olenina *et al.*, 2006), microalga consumida por *C. gigas*. Pérez Camacho *et al.* (2004) demostraron que la aplicación de un tratamiento ácido antes de la digestión enzimática para producir detritos de *Laminaria saccharina* ayudó en aumentar un 24.8% las proporciones en partículas de diámetro inferior a 10 μm . El tratamiento ácido hidrata las estructuras orgánicas de las partículas secas de macroalga, transforma las sales insolubles en solubles e hidroliza polisacáridos complejos, lo cual prepara las partículas para su posterior tratamiento enzimático (Pérez Camacho *et al.*, 2004). Finalmente, en este estudio, no se observó crecimiento bacteriano durante los 7 días de almacenamiento de los detritos para los ostiones. Esta ausencia de bacterias fue probablemente permitida gracias al tratamiento con ácido, que evitó la fermentación durante la producción de detritos y condujo a un detrito favorable para la productividad de los ostiones. De hecho, para el uso en cultivo de ostiones, es preferible la ausencia de actividad bacteriana para la preparación de detritos (Uchida y Murata, 2002; Pérez Camacho *et al.*, 2004) ya que se ha observado que las partículas de algas están asociadas con muchas células bacterianas (Uchida *et al.*, 1997) que podrían afectar los otros organismos del sistema IMTA. Además, evitar el tratamiento de fermentación contribuiría a la disminución de los costos de producción del alimento para los ostiones en las etapas de laboratorio.

Para producir los detritos de camarón, el proceso enzimático y fermentativo de la harina de *Ulva lactuca*, permitió un aumento considerable en el contenido de proteínas y lípidos, y disminuyó la fibra cruda y las cenizas como en la fermentación de las macroalgas *Ulva lactuca* (Felix y Brindo, 2014a), *Kappaphycus alvarezii* (Felix y Brindo, 2014b) y *Laminaria digitata* (Hou *et al.*, 2015). Estos resultados respaldan el hecho que la enzima celulasa, ya sea exógena o bacteriana, degrada los polisacáridos de las paredes celulares de las algas (reducción de fibra) para aumentar la glucosa libre, la cual podría ser utilizada por la biomasa bacteriana como fuente de carbono para producir proteína microbiana (Uchida, 1996; Uchida y Numaguchi, 1998; Felix y Pradeepa, 2012).

El aumento en el porcentaje de lípidos aún no se entiende del todo (Uchida y Numaguchi, 1998; Oboh *et al.*, 2002), sin embargo, podría atribuirse a la capacidad potencial de *S. cerevisiae* y *L. plantarum* de producir ácidos grasos insaturados a partir de diferentes fuentes de carbono (Soto, 2013). Ginneken *et al.* (2011) documentaron la composición en ácidos grasos de varias especies de macroalgas, donde *U. lactuca* presentó la concentración más alta en ácido α -linolénico PUFA n-3 (C18:3). Este ácido graso poliinsaturado esencial, presente en la membrana celular, se vuelve accesible después de la degradación causada por las celulasas. A partir de ese ácido graso, *L. plantarum* puede producir ácidos grasos conjugados, que han atraído mucha atención como un nuevo tipo de lípido funcional biológicamente beneficioso como material potencial para productos farmacéuticos y suplementos dietéticos (Ogawa *et al.*, 2005). De hecho, *S. cerevisiae* fue estudiado por su capacidad para producir ácidos grasos a partir de acetato y hexosas (Macleod y Smedley-Maclean, 1938), y así participar en el incremento de la cantidad en lípidos en el detrito de *U. lactuca*.

El aprovechamiento de la biomasa de *U. lactuca* para producir detritos, ya sea que provenga de productividad natural o por acuicultura, consituye una fuente de alimento práctica y confiable para ser utilizada como alternativa en alimentos acuícolas (Carboni *et al.*, 2016).

8.3.2 Productividad de los camarones y ostiones alimentados con detritos

8.3.2.1 Productividad de los camarones alimentados con detritos

El nivel de inclusión de las harinas de macroalgas en el alimento del camarón está limitado. Se informó anteriormente que el uso de *U. lactuca* para reemplazar más del 10% de la harina de pescado en el alimento, resulta en una reducción significativa del crecimiento del camarón (Felix y Brindo, 2014a; Rodríguez-González *et al.*, 2014). Sin embargo, en el presente trabajo, la inclusión de 10% y 20% de detritos de *U. lactuca* en el alimento de los camarones como sustituto de la harina de pescado no afectó la supervivencia, el peso final, el aumento de peso, la tasa de crecimiento específica, la ingesta de alimento y la tasa de conversión alimenticia de *P. vannamei* después de 30 días de alimentación. Estos resultados sugieren que la proteína de *U. lactuca* es bien utilizada por los camarones a altos niveles de inclusión cuando pasan por un proceso de extracción o predigestión. Los resultados obtenidos coinciden con un estudio previo donde los extractos proteicos de *U. lactuca* resultaron en una mejora del crecimiento del camarón cuando se incluyeron hasta un 15% en los alimentos (Omont *et al.*, 2019) y con Felix y Brindo (2014a, 2014b), que demostraron que la fermentación de las algas permitió mejorar el crecimiento del camarón gigante de río *Macrobrachium rosenbergii*, con una inclusión del 30% como reemplazo de hasta el 20% de la harina de pescado.

Los promotores de crecimiento de las macroalgas no fueron claramente identificados, pero están principalmente atribuidos al contenido en proteínas, minerales, ácidos grasos poliinsaturados y el perfil de amino ácidos (Cruz-Suárez *et al.*, 2008; Tabarsa *et al.*, 2012). Las clorófitas contienen ácidos grasos n-3 (Pereira *et al.*, 2012), que incorporados en los tejidos promueven el crecimiento del camarón, mientras usan los ácidos grasos n-6 como fuentes de energía (González-Félix *et al.*, 2003). Por lo tanto, parece factible utilizar el detrito de *U. lactuca* como ingrediente proteico en proporciones hasta 20% para sustituir la harina de pescado sin modificar los parámetros de crecimiento del camarón.

8.3.2.2 Productividad de los ostiones alimentados con detritos

El desarrollo de alimentos artificiales de alta calidad para sustituir a las microalgas en el cultivo industrial de ostiones es crucial para satisfacer la demanda de alimento y continuar el proceso de mejora de las tasas de supervivencia y crecimiento (Wang *et al.*, 2016). De hecho, los bivalvos sometidos a un estrés nutricional severo destinan toda la energía disponible a la supervivencia (Rato *et al.*, 2018). Rato *et al.* (2018) demostraron que la ausencia de alimentos en *C. gigas* resulta en una alta tasa de mortalidad del 72% después de 11 semanas; mientras que cuando se alimenta con 100% de *Ulva rigida* en polvo, se conservó la supervivencia, sin embargo, la condición fisiológica se vio afectada. En Peña Rodríguez *et al.* (2020), la sustitución del 100% de microalgas por detritos de *U. lactuca* resultó un alto porcentaje de supervivencia en ostiones *C. gigas* luego de 17 días de experimento. En contraste, hasta un 50% de reemplazo de microalgas con detritos de *Porphyra haitanensis* condujo a una disminución significativa en la supervivencia de *Crassostrea belcheri* (Tanyaros y Chuseingjaw, 2014). En el presente estudio, los ostiones alimentados con una sustitución parcial o total de microalgas con detritos de *U. lactuca*, presentaron un 100% de supervivencia después de 35 días de experimento, sin diferencias significativas en comparación con el tratamiento de control. Si se toman en cuenta los parámetros de crecimiento, la sustitución de hasta el 50% de las microalgas con detritos de *U. lactuca* resultó en una longitud de concha, pesos vivo y seco, y una tasa de crecimiento específica similares a los ostiones con un régimen de alimentación al 100% de microalgas. Las mismas observaciones sobre el crecimiento se han realizado con juveniles de *Callionymus belcheri* alimentados con detritos de *Porphyra haitanensis* como sustituto al 50% de las microalgas (Tanyaros y Chuseingjaw, 2014). En almejas, raciones diarias de detritos de *L. saccharina* al 2%, 4% y 6%, indujeron pesos vivos finales más bajos en comparación con las almejas alimentadas con microalgas (Pérez Camacho *et al.*, 2004). Pérez Camacho *et al.* (2007) demostraron que existe un efecto aditivo cuando el detrito se suplementa con un 10% de fitoplancton vivo, obteniendo tasas de crecimiento similares a las logradas con el 100% de fitoplancton vivo. Considerando la actividad industrial, ninguno de estos estudios consideró el índice de condición, parámetro que estima la salud aparente y la calidad comercial de los ostiones (Orban *et al.*, 2004)

Acarli *et al.* (2011) definieron que los ostiones en buen estado fisiológico y con una calidad comercial aceptable tienen un índice de condición entre 65 y 90. Después de 42 días de inanición, el índice de condición en los ostiones *C. gigas* disminuyó significativamente de 75 a 58, mientras que el índice de condición en ostiones alimentados normalmente osciló entre 75 y 82 (Zhang y Li, 2006). Rato *et al.* (2018) pudieron sustituir el 25% de las microalgas vivas con harina no procesada de *U. rigida*, y observaron una calidad nutricional y condición fisiológica similar a la de los ostiones *C. gigas* alimentados con un 100% de microalgas vivas. En este estudio, se logró sustituir el 50% de microalgas por detritos de *U. lactuca*, resultando en un índice de condición de los ostiones de hasta 75, lo cual es apropiado en criaderos de ostiones. Por otro lado, el uso de múltiples cepas de microalgas vivas para alimentar, ha demostrado promover un mejor desarrollo de los ostiones en comparación con las dietas monoalgales (Ronquillo *et al.*, 2012), por lo que el presente trabajo muestra el potencial de los detritos de *U. lactuca* como componente práctico en la dieta de las ostiones.

El almacenamiento y la utilización de la energía en los bivalvos están estrechamente relacionados con la calidad de la dieta (Anjos *et al.*, 2017) y es bien sabido que los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en los bivalvos dependen del origen de los alimentos (Kang *et al.*, 1999; Savoye *et al.*, 2003). En este estudio, el valor $\delta^{13}\text{C}$ del manto de los ostiones osciló entre -18,2 y -16,2 ‰, como ya se ha reportado en estudios anteriores (Marín Leal *et al.*, 2008; Yokoyama, Ishihi y Yamamoto, 2008; Kang *et al.*, 2009), los valores isotópicos son independientes de la fuente de alimento. El rango de valores $\delta^{13}\text{C}$ observado puede atribuirse a los valores isotópicos del carbono aportado a partir del detrito de *U. lactuca* ($-19,1 \pm 0,1$ ‰) y de la microalga *C. calcitrans* ($-20,5 \pm 0,2$ ‰). En las mismas condiciones ambientales, las macroalgas y las microalgas bentónicas revelaron valores de $\delta^{13}\text{C}$ similares (Kang *et al.*, 1999; Yokoyama y Ishihi, 2003). La firma isotópica de carbono de los organismos fotosintéticos, como las macroalgas y las microalgas, está influenciada por las vías metabólicas asociadas al tipo de fotosíntesis y la absorción de carbono (Raven *et al.*, 2002; Fry, 2006; Goodwin, Gillikin y Roopnarine, 2013). Además, la descomposición de *Ulva* sp. no influyó en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ (Fenton y Ritz, 1988). Estudios anteriores indican que el carbono dietético se utiliza principalmente para el

metabolismo y la supervivencia en *C. gigas* (Powell *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2016). Por lo tanto, los resultados sugirieron que una firma isotópica de carbono similar de los detritos de *U. lactuca* y la microalga *C. calcitrans* ayudó a mantener la supervivencia de los ostiones mientras se alimentaban con diferentes proporciones de ambas fuentes de alimento.

El nitrógeno de la dieta es importante para el crecimiento de los tejidos (Powell *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2016), como se pudo observar en el presente estudio a través de las variaciones significativas en los valores de $\delta^{15}\text{N}$ (2.6 a 8.8 ‰) en el manto de los ostiones alimentados con diferentes regímenes experimentales. El valor de 2.6 ‰ para $\delta^{15}\text{N}$ corresponde al manto de los ostiones alimentados con 100% de *C. calcitrans*, cercano al valor observado por Liu *et al.* (2016) después de alimentar a los ostiones con microalgas (2.97 ‰). El valor de 8.8 ‰ correspondió al manto de los ostiones alimentados con 100% de detritos de *U. lactuca*. Dichos valores coinciden con el rango de valores $\delta^{15}\text{N}$ observados en ostiones cultivados en un ambiente natural, es decir 6.6 a 13.6 ‰ (Marín Leal *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2009). Sin embargo, los valores isotópicos ($\delta^{15}\text{N}$) de la biomasa de microalgas están fuertemente influenciados por los medios de cultivo y tienden a ser bajos o incluso negativos (es decir, agotados en ^{15}N) (Le Vay y Gamboa-Delgado, 2011).

Los valores isotópicos en el tejido animal cambian debido al crecimiento y/o al recambio metabólico, y si la dieta es constante, dichos valores tienden a alcanzar un equilibrio que refleja el perfil isotópico de los alimentos (Hesslein *et al.*, 1993). Por lo tanto, en el presente estudio, las firmas isotópicas de nitrógeno en el tejido de los ostiones reflejaron los valores de $\delta^{15}\text{N}$ del detrito de *U. lactuca* SCD y de la microalga *C. calcitrans*. Los valores significativamente diferentes (respectivamente, 9.31 ± 0.24 y 3.8 ± 0.19 ‰) de los alimentos, promovieron cambios isotópicos con tendencias exponenciales y permitieron utilizar el modelo isotópico para estimar los aportes nutricionales. El mismo rango de diferencia entre macroalgas y microalgas se ha observado en estudios previos (Kang *et al.*, 1999; Yokoyama y Ishihi, 2003). Las tasas de renovación de nitrógeno (m) en los ostiones fueron más altas en los animales alimentados únicamente con microalgas; que produjo tiempos medios de recambio de nitrógeno más cortos

en el tejido del manto ($t_{50} = 4.1$ días) que los observados en ostiones alimentados solo con detritos (8.2 días). Según MacAvoy *et al.* (2005), el rápido recambio tisular, causado por el crecimiento (k) y el metabolismo de reemplazo de tejidos en animales, provoca tiempos medios más cortos en el tejido. Dado que el crecimiento no fue significativamente diferente para los ostiones alimentados con D25 y D50 en comparación con el control D0, las tasas de renovación de nitrógeno significativamente más bajas en estos tratamientos indicaron un metabolismo de reemplazo en los tejidos más lento y, por lo tanto, un tiempo medio significativamente más grande. Además, el crecimiento bajo observado en los ostiones alimentados con los regímenes que incluyeron 75% y 100% de detritos, sugiere que los animales bajo el efecto de estas dietas, alcanzaron el equilibrio isotópico a través del recambio metabólico tisular y no a través de la acumulación de biomasa. Estas observaciones contrastan con estudios previos realizados en camarones *P. vannamei*, donde un tiempo medio más largo se asoció con tasas metabólicas más altas causadas por tasas de crecimiento más altas (Gamboa-Delgado *et al.*, 2003, 2011). Martínez del Rio y Wolf (2005) consideraron que los alimentos con baja calidad proteica, particularmente deficientes en aminoácidos esenciales, conduce a una mayor ingesta y un mayor catabolismo de aminoácidos para responder a los requerimientos proteicos; en consecuencia, se observarían factores de discriminación más elevados. En este estudio, se observó un factor de discriminación de nitrógeno negativo ($\Delta^{15}\text{N}$) entre los ostiones y el detrito, lo que indica un agotamiento relativo del isótopo más pesado (^{15}N), que ocurre cuando los nutrientes (y sus isótopos) se metabolizan e incorporan selectivamente (Gamboa-Delgado *et al.*, 2011). En el ostión *C. gigas*, la eficiencia de selección del nitrógeno aumenta como respuesta al agotamiento de la calidad o cantidad de los alimentos, mientras que la eficiencia de selección del carbono permanece sin cambios (Bayne, 2009). Después de usar los modelos de mezclado isotópico para estimar las proporciones relativas de nitrógeno de la microalga y del detrito de *U. lactuca* incorporados en el tejido del manto de los ostiones, se determinó que en el régimen de alimentación D25, los ostiones utilizaron preferentemente el nitrógeno que provino de la microalga (en comparación con los detritos) para promover el crecimiento. Esta observación podría estar relacionada con la presencia de una mayor concentración y disponibilidad de microalga en este régimen de alimentación. De la misma forma, las contribuciones esperadas

(nutrientes en regímenes) que fueron diferentes a las observadas (determinadas en tejido) pueden deberse a una digestión/asimilación diferente de los componentes nutricionales disponibles en ambas fuentes de alimento, como se indica en el apartado 0. A medida que aumentaron los niveles de detrito en los tratamientos D50 y D75, se estimó una contribución similar de nitrógeno dietético para el crecimiento de los ostiones por ambas fuentes de alimento. Se observó el mismo patrón en términos de incorporación de materia seca. *C. calcitrans* tenía un contenido de nitrógeno ligeramente menor y, por lo tanto, la asimilación de materia seca debía ser mayor que la estimada para el detrito (que contenía más N), para alcanzar el aporte de nitrógeno determinado. Los resultados mostraron que el crecimiento y la supervivencia en ostiones alimentados con 50% de detritos de *U. lactuca* SCD como sustitución de la microalga *C. calcitrans* parecen estar asociados con un ajuste óptimo de la asimilación de ambas fuentes de alimento.

8.3.2.3 Productividad de *P. vannamei* y *C. gigas* alimentados con detritos y *U. lactuca* en un sistema IMTA

De acuerdo con los resultados de crecimiento del camarón, la sustitución de la harina de pescado con 20% de detritos de *U. lactuca* no afectan los parámetros de crecimiento del camarón tanto en los sistemas tradicionales de monocultivo, como en un sistema IMTA con ostión y macroalga. Esta sustitución permitiría un ahorro significativo relativo a los costos de alimentación en las granjas camaronícolas (**Tabla 28**). Por el contrario, no se obtuvieron los resultados esperados para los ostiones del sistema IMTA-D alimentados con 50% de detritos si los comparamos con el ensayo de alimentación de los ostiones con detritos. Si se considera que en el sistema IMTA-D, tanto el ostión como el camarón fueron alimentados con detritos, el aporte de estos pudo haber modificado el porcentaje de contribución del detrito en la dieta del ostión (>50%), y entonces afectar sus parámetros zootécnicos (crecimiento, supervivencia e índice de condición). Además, existe un efecto negativo de *Ulva* sp. sobre la supervivencia y el crecimiento del ostión, cuando se encuentra a saciedad por el nitrato y los nutrientes de Von Stosch (NaNO₃, Na₂HPO₄, FeSO₄, MnCl₂, Na₂EDTA, Tiamina, Biotina, Vitamina B12) (Green-Gavrielidis *et al.*, 2018). Este fenómeno fue asociado a la producción de partículas alelopáticas

por la macroalga que ayudan en favorecer su crecimiento pero que pueden ser tóxicas para otras especies como las microalgas y los moluscos (Green-Gavrielidis *et al.*, 2018). En este experimento, la macroalga del sistema IMTA-D presentó una mayor ganancia en peso comparado con el sistema IMTA, lo que parece comprobar esta hipótesis. Entonces, para asegurar el crecimiento y la supervivencia del ostión, se recomienda el uso limitado (<50%) de detritos como fuente alimenticia para el ostión en los sistemas IMTA.

8.3.3 Actividad enzimática digestiva de los ostiones y camarones alimentados con detritos

8.3.3.1 Actividad enzimática digestiva de los camarones alimentados con detritos

La síntesis, la secreción y la regulación de las enzimas digestivas de los camarones Peneidos definen sus capacidades digestivas y dependen esencialmente de los ingredientes en el alimento (Carrillo-Farnés *et al.*, 2007). En este trabajo, las actividades específicas de la tripsina de los camarones en los tratamientos con los detritos de *U. lactuca* fueron significativamente mayores comparado con el tratamiento control. La tripsina es la principal proteasa en *P. vannamei*, corta exclusivamente en el lado carboxílico de los residuos cargados positivamente de los aminoácidos, específicamente los residuos de lisina y arginina (Sainz *et al.*, 2004). Se ha demostrado que su alta actividad es una clave sensible en el proceso de digestión de las proteínas, fuertemente modulada por la calidad y cantidad de las proteínas en el alimento (Sainz Hernández y Cordova Murueta, 2009), estrechamente relacionada con la cantidad de lisina y arginina (Lan y Pan, 1993). También influyen en el crecimiento y el metabolismo del camarón debido a su rol en el suministro de aminoácidos esenciales (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2018). Además, con respecto a los resultados de las predicciones funcionales KEGG, los camarones alimentados con los detritos de *U. lactuca* presentaron un incremento de la abundancia relativa de bacterias implicadas en el metabolismo de aminoácidos (enzimas relacionadas con los aminoácidos y metabolismo de arginina y prolina). Estos resultados sugieren que la calidad de la proteína de los detritos influyó en la actividad de la tripsina. *Ulva lactuca*, como muchas algas, contiene altos niveles de arginina, pero se encuentra limitada en su contenido en lisina en comparación con los ingredientes ricos en

proteínas como la harina de pescado (Pangestuti y Kim, 2015). Sin embargo, en oposición, el trigo se caracteriza por un bajo contenido de aminoácidos esenciales en comparación con *U. lactuca* (Yildirim *et al.*, 2009) y la introducción de fuentes de alto contenido proteico, como las algas marinas, aumentan la calidad de la proteína dietética de los alimentos a base de cereales (Ścieszka y Klewicka, 2019). Por otro lado, la quimotripsina hidroliza los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y juega un papel importante cuando el crecimiento es limitado o deprimido (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2006). La ausencia de diferencia en las actividades de la quimotripsina en este estudio, sugiere que la inclusión como fuente de proteína de los detritos de *Ulva lactuca* hasta un 20% en el alimento del camarón, no fueron un factor limitante para el crecimiento del camarón.

La lipasa es una enzima clave en la absorción de triacilglicerol de cadena larga (Bitou *et al.*, 1999). La inclusión de los detritos de *U. lactuca* resultó en una actividad de lipasa significativamente mayor en comparación con el control, como se ha observado anteriormente con extractos de la misma alga incluidos hasta 15% en los alimentos de *P. vannamei* (Omont *et al.*, 2019), y también incremento la abundancia relativa de bacterias implicadas en el metabolismo lipídico de acuerdo con los resultados de predicción funcional en este estudio. Schleder *et al.* (2018) también han mostrado un aumento en la actividad de la lipasa en hepatopáncreas de camarón alimentado hasta un 4% con biomasa seca de *Undaria pinnatifida*, y el resultado fue asociado a una mejor absorción de lípidos. Se ha demostrado previamente que el suplemento de los alimentos con *Ulva sp.* estimula la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico de *P. vannamei* (Elizondo-Reyna *et al.*, 2016), mejora el crecimiento y modifica el contenido de lípidos del camarón (Elizondo-González *et al.*, 2018), probablemente debido a su contenido en ácidos grasos w-3 y w-6 (Carrillo-Farnés *et al.*, 2007; van Ginneken *et al.*, 2011; Ganesan *et al.*, 2019).

La amilasa es una carbohidrolasa que juega un papel importante en la digestión del camarón (Roy *et al.*, 2018), ya que hidroliza carbohidratos complejos utilizados como fuentes de energía y promotores del crecimiento del camarón (Cuzon *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2012).

Especialmente, en este trabajo, la relación amilasa/tripsina (A/T) aumentó con la inclusión de detritos de *U. lactuca*. En un estudio previo se observaron resultados similares con un suplemento de 5% de un extracto de *U. lactuca* en el alimento para camarón (Omont *et al.*, 2019). De acuerdo con Hidalgo *et al.* (1999), una relación A/T alta representa una mejor capacidad para digerir los carbohidratos como fuente de energía, y facilita el uso de las proteínas para el crecimiento. Sin embargo, en este estudio, y según lo observado por Brito *et al.* (2001), las mayores actividades de amilasa no se relacionaron con un mayor crecimiento efectivo en ningún tratamiento. Estos autores asociaron la diferencia de actividad enzimática, principalmente al origen diferente de los carbohidratos que fueron incluidos en los alimentos. De hecho, las algas, y particularmente *Ulva sp.*, son fuentes más ricas en fibras solubles en comparación con el trigo (Peña-Rodríguez *et al.*, 2011; Yaich *et al.*, 2011; Shewry y Hey, 2015). En este estudio, los detritos sustituyeron parte del trigo en la formulación, con un aumento potencial en las fibras digeribles en los alimentos y una mejora en la actividad específica de la amilasa.

También, fue demostrado por Shyne Any *et al.* (2014) que la presencia de las bacterias benéficas en el alimento para camarones ha mejorado la digestión y la absorción de nutrientes, lo que contribuyó a mejorar su crecimiento. De esta manera las bacterias introducidas en la producción del detrito, podrían haber estimulado la producción de enzimas endógenas en el hepatopáncreas, como la lipasa y la amilasa, mejorando la utilización de nutrientes presentes en el alimento.

8.3.3.2 Actividad enzimática digestiva de los ostiones alimentados con detritos

La digestión y asimilación del alimento dependen de la actividad enzimática en la glándula digestiva, y el proceso está estrechamente relacionado con la composición del alimento (Peña Rodríguez *et al.*, 2020). La actividad de la proteasa en los túbulos de las glándulas digestivas de *C. gigas* es baja, con una mayor actividad al final de la digestión (Bouchaud-Camou *et al.*, 1983). La quimotripsina y, en menor proporción, la tripsina mostraron mayor actividad en la glándula digestiva de los ostiones alimentados con los detritos de *U. lactuca*, en comparación con los

animales alimentados con microalgas (Peña Rodríguez *et al.*, 2020). En este estudio, la proteasa presentó mayor actividad específica en los ostiones alimentados con 100% de detritos de *U. lactuca* en comparación con los otros tratamientos. Esto último podría estar relacionado con el mayor contenido de proteínas en los detritos de *U. lactuca* en comparación con las microalgas. Además, en los bivalvos, la actividad de la aminopeptidasa aumenta las tasas de renovación de proteínas, es decir la degradación, sustitución y/o renovación de las proteínas en los tejidos del organismo (Donald *et al.*, 2001). En este estudio, la actividad de la (Leu)-aminopeptidasa-N fue mayor en la glándula digestiva de los ostiones alimentados con 100% de detritos y reflejó una menor tasa de renovación de nitrógeno (proteína) y un menor crecimiento en comparación con otros tratamientos. Estudios anteriores han indicado que una mayor actividad de proteasa y peptidasa estaba relacionada con una proteína de mejor calidad en la dieta y un mayor crecimiento de los ostiones (Yang *et al.*, 2017; Liao *et al.*, 2020); sin embargo, en el presente estudio, la proteína podría haber sido utilizada como fuente de energía de mantenimiento para preservar las funciones vitales, como concluyen Rato *et al.* (2018) en un estudio con ostiones alimentados al 100% con *U. rigida* seca. En *C. gigas*, con bajas reservas de glucógeno, y durante los períodos de escasez de alimentos, las necesidades energéticas pueden completarse con la degradación de proteínas y lípidos (Whyte *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 2010). De hecho, en este estudio, la disminución de la actividad de la amilasa, que contrasta con el aumento de la actividad de la lipasa a niveles más altos de inclusión de detritos de *U. lactuca* en el régimen alimentario, contribuye a confirmar esta hipótesis. La mayor actividad de la amilasa es el resultado del crecimiento celular debido a una mejor disponibilidad de alimentos (Huvet *et al.*, 2003). También se ha informado de una menor actividad de la amilasa durante la sustitución de la dieta por *Ulva* sp. en ostiones (Rato *et al.*, 2018; Peña Rodríguez *et al.*, 2020), posiblemente debido a la presencia de inhibidores de alfa-amilasa en las macroalgas (de Oliveira *et al.*, 2009). La hidrólisis enzimática durante la producción de detritos libera grandes cantidades de monosacáridos (Hou *et al.*, 2015), que también pueden explicar la disminución significativa de la actividad amilasa en el tratamiento D100. Una alta disponibilidad de azúcares puede afectar el metabolismo de los carbohidratos y reflejarse en un menor crecimiento como se sugiere en ostras perleras (Yang *et al.*, 2018). Por otro lado, se ha observado la modificación del

metabolismo de los lípidos a través de una mayor actividad de la lipasa en *C. gigas* alimentado con *U. rigida* seca (Rato *et al.*, 2018), y en otros invertebrados acuáticos alimentados con *Ulva* sp. (Elizondo-Reyna *et al.*, 2016; Omont *et al.*, 2019). Tales cambios se han atribuido a la calidad de los lípidos de las dietas (Peña Rodríguez *et al.*, 2020). En realidad, *U. lactuca* contiene en proporción la mitad de ácidos grasos altamente insaturados comparado con *C. calcitrans* (Ortiz *et al.*, 2006; Méndez-Martínez *et al.*, 2018), lo que puede sugerir incrementar la actividad de la lipasa como una forma de adaptarse a los cambios nutricionales en lípidos, como se observó en *Daphnia pulex* (Koussoroplis, Schwarzenberger y Wacker, 2017). En este trabajo, la mayor capacidad digestiva de la lipasa combinada con las actividades enzimáticas digestivas permitió que los ostiones alimentados con hasta un 50% de detritos de *U. lactuca* alcanzaran un crecimiento similar al de los ostiones alimentados con un 100% de microalgas, lo que sugiere un buen funcionamiento del órgano digestivo y un buen estado de salud.

8.3.4 Control microbiológico en los camarones y ostiones alimentados con detritos

8.3.4.1 Comunidades bacterianas digestivas de *P. vannamei* alimentados con detritos

Los cambios en las actividades de las enzimas digestivas se atribuyen principalmente al alimento, pero también se relacionan positivamente con los cambios en las comunidades bacterianas en el intestino del camarón, que posteriormente afectan su tasa de crecimiento (Dai *et al.*, 2017, 2018; Xiong *et al.*, 2017). En estudios recientes, se han observado cambios en la composición de la microbiota del camarón en respuesta a la suplementación alimenticia con algas (Schleder *et al.*, 2018, 2019; Niu *et al.*, 2019). Niu *et al.* (2019) revelaron el aumento en *Bacteroidetes* y *Verrucomicrobia* para los camarones alimentados con 2% de varias macroalgas en comparación con el grupo de control. Elizondo-González *et al.* (2020) describieron una mayor abundancia de *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* en el intestino de camarones alimentados con *Ulva lactuca* fresca comparado con el control (pellet sin macroalga). En el presente estudio, la abundancia relativa de los *Bacteroidetes* y *Verrucomicrobia*, particularmente de los géneros *Haloferula* y *Rubritalea*, también aumentó con la inclusión de los detritos de *U. lactuca* en el alimento del camarón. *Bacteroidetes* es uno de los principales grupos bacterianos que se

encuentran en el intestino de los animales, dentro del cual hay una variedad de bacterias que secretan carbohidrolasas, enzimas extracelulares que fermentan polisacáridos y carbohidratos no digeribles para producir ácidos grasos de cadena corta (AGCC), mismos que el huésped puede absorber como fuente de energía (Flint *et al.*, 2012; Birg *et al.*, 2019; Dubé *et al.*, 2019). El filo *Verrucomicrobia*, en camarones sanos, puede jugar un papel crítico en la degradación de los polisacáridos y codifica diversas enzimas involucradas en el transporte y metabolismo de los carbohidratos (Flint *et al.*, 2012; Martinez-Garcia *et al.*, 2012; Dai *et al.*, 2018). Además, se ha identificado un consenso de diferentes bacterias celulolíticas en otros organismos, que incluyen especies de los órdenes *Actinomycetales*, *Sphingomonadales*, *Bacillales* y *Clostridia*, especialmente el género *Clostridium* (Wenzel *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2012), las cuales se han identificado en mayor abundancia en los camarones alimentados con el detrito en este estudio. Estos resultados coinciden con los resultados de las predicciones funcionales, donde las bacterias involucradas en el metabolismo de los carbohidratos son más abundantes para los camarones alimentados con los detritos de *U. lactuca*, con respecto a su control. Dado que los polisacáridos de las algas son una fuente importante de nutrientes para las bacterias heterotróficas (Koch *et al.*, 2019), el aumento en la abundancia de las bacterias involucradas en la degradación de los carbohidratos en el presente estudio podría estar relacionado con el aumento de la actividad de amilasa en los camarones alimentados con los detritos *U. lactuca*.

La consideración de la estructura de las comunidades bacterianas en camarones sanos, permitió asociar la homeostasis intestinal con una gran abundancia de *Bacteroidetes* (Niu *et al.*, 2019), *Verrucomicrobia* (Dai *et al.*, 2020) y *Actinobacteria* dominadas por *Actinomycetales* (Zhu *et al.*, 2016b), mientras tanto, un camarón enfermo se ha caracterizado por una alta abundancia en *Gammaproteobacteria*, particularmente miembros que pertenecen a las familias *Alteromonadaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Vibrionaceae* (Zhu *et al.*, 2016b; Schleder *et al.*, 2019; Dai *et al.*, 2020). En el presente trabajo, los camarones alimentados con los alimentos con los detritos de *U. lactuca*, aumentaron su abundancia en *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia* y *Actinobacteria* en su tracto digestivo, con respecto a los del alimento control; lo que sugiere una mejora de las comunidades de bacterias benéficas en los organismos. Los ácidos grasos de

cadena corta, potencialmente producidos por algunos *Bacteroidetes* como se mencionó anteriormente, crean un ambiente ácido en el intestino del camarón que suprime el crecimiento de microorganismos patógenos mientras promueve selectivamente el crecimiento de microorganismos benéficos (Hoseinifar *et al.*, 2017). Además, se ha reportado que algunas bacterias del filo *Actinobacteria* producen diversos metabolitos secundarios (β -lactámicos y policétidos) con actividad antibiótica, particularmente actividad contra los *Pseudomonas* (Demain y Adrio, 2012). Dentro de las vías de los metabolitos secundarios, la biosíntesis de carotenoides también mejora en los camarones alimentados con los detritos, atribuido en parte a la mayor abundancia de *Sphingomonadaceae* en comparación con el alimento control debido a que varias bacterias de la familia *Sphingomonadaceae* tienen una alta capacidad para la biosíntesis de carotenoides (Takaichi, 2009).

Por otro lado, el detrito de *U. lactuca* disminuye la abundancia en géneros bacterianos potencialmente patógenos como *Tenacibaculum*, que se ha reportado en cantidades excesivas en el intestino del camarón infectado con la enfermedad "camarones de algodón" (Zhou *et al.*, 2019); *Lutimonas*, abundantes en el esqueleto de langostas enfermas (Feinman *et al.*, 2017); de la familia Vibrionaceae, particularmente las bacterias de los géneros *Lucibacterium*, asociados con vibriosis luminosa y el síndrome Bolitas nigricans (Austin y Zhang, 2006); y *Allomonas*, asociados al síndrome de las heces blancas en los camarones (Kumara y Hettiarachchi, 2017). Se ha demostrado que los polisacáridos u otros extractos de *Ulva sp.* mejoran el sistema inmune no específico y la resistencia a enfermedades (Ge *et al.*, 2019), mejoran los mecanismos de defensa antioxidantes (Esquer-Miranda *et al.*, 2016) y demuestran una actividad antibacteriana contra *Vibrio* en *P. vannamei* (Saritha *et al.*, 2013). Por lo tanto, la inclusión de los detritos de *U. lactuca* en el alimento del camarón pudo exhibir el mismo efecto positivo sobre el sistema inmune del camarón a través de la modificación de las comunidades bacterianas del intestino, y una disminución en las poblaciones de bacterias potencialmente patógenas.

8.3.4.2 Efecto antiviral de los detritos contra el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV)

El virus de la mancha blanca (WSSV por sus siglas en inglés) ha sido reportado como un virus frecuente, letal, contagioso y generalizado en la industria camaronícola (Sánchez-Paz, 2010). A pesar de que las vacunas a base de ácido nucleico, las proteínas recombinantes y otros enfoques sofisticados han demostrado ser prometedores para limitar su impacto, los productos derivados de algas marinas, se han mostrado eficientes y rentables para proteger al camarón de enfermedades infecciosas (Selvin y Lipton, 2003; Cruz-Suárez *et al.*, 2008; Sánchez-Paz, 2010; Immanuel *et al.*, 2012).

En este estudio, los detritos de *Ulva lactuca* incluidos a 20% en el alimento del camarón *P. vannamei*, permiten una mayor resistencia al virus y una supervivencia de 30% hasta 7 días post infección con WSSV. Resultados similares han demostrado el efecto antiviral de los metabolitos secundarios de las algas verdes contra el virus de la mancha blanca. Selvin *et al.* (2004) observaron que la pulverización de metabolitos secundarios de *Ulva fasciata* en el alimento aumentaron significativamente los factores de defensa del camarón. La inclusión de extractos polisacáridos de *Acrosiphonia orientalis* en el alimento del camarón *P. monodon* contra el WSSV permitió mejorar la tasa de supervivencia hasta 88% (Manilal *et al.*, 2009). *P. indicus* alimentado con una dieta que incorporó a *Ulva flexuosa* tuvo mejor resistencia al virus (Velmurugan *et al.*, 2014). Un extracto de Ulvan (polisacárido sulfatado soluble) a partir de *Ulva* sp., incluido en el alimento del camarón, permitió prolongar la supervivencia y aumentar el recuento total de hemocitos en camarones infectados con WSSV, lo que sugiere que el extracto promovió la activación de la inmunidad celular en los camarones (Declarador *et al.*, 2014). Por lo tanto, se puede concluir que *Ulva* sp. se puede utilizar como ingrediente proactivo en la alimentación del camarón para el manejo del WSSV.

Durante la replicación viral, los productos virales modulan la homeostasis metabólica de la célula huésped para impulsar actividades metabólicas a favor de la biosíntesis del virus y cumplir con sus requisitos energéticos (Chen *et al.*, 2011). Wang *et al.* (2007) identificaron en el

estómago de *P. monodon* la sobreexpresión de 21 proteínas implicadas en la producción energética, la síntesis de ácido nucleico y el señalamiento celular entre otros. En respuesta a la infección, los hemocitos secretan componentes humorales que son principalmente proteínas (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006). Al administrar extractos de *Ulva flexuosa* en la dieta de los camarones, Velmurugan *et al.* (2014) observaron una disminución del nivel de proteína total en la hemolinfa, lo que atribuyeron a la reducción de la carga viral en la hemolinfa. Estos resultados concuerdan con este trabajo, en el cual se observó, en el control positivo, un aumento en el contenido de proteínas en la hemolinfa a 48 horas post infección (hpi), mientras se mantuvieron equivalente al control negativo para los camarones alimentados con la dieta con *U. lactuca* fresca y con el alimento con detritos de *U. lactuca*. Otros estudios demostraron que el nivel de proteína total en la hemolinfa de los camarones es inferior en *P. monodon* alimentados con extractos de hierbas medicinales con propiedades antivirales e inmunoestimulantes (*Cyanodon dactylon*, *Aegle marmelos*, *Tinospora cordifolia*, *Picrorhiza kurooa*, *Eclipta alba*, *Acalypha indica*, *Withania somnifera* y *Zingiber officinalis*) comparado con el control, en razón de una menor replicación del virus (Citarasu *et al.*, 2006; Yogeeswaran *et al.*, 2012).

Con el estrés causado por la manipulación de los organismos, los niveles de lactato y glucosa aumentaron durante 1 hora post manipulación y regresan a niveles normales después de 4 horas (Yoganandhan *et al.*, 2003; Aparicio-Simón *et al.*, 2010, 2018). En el presente estudio, se observaron altos niveles de lactato inmediatamente después de la inyección con WSSV, pero disminuyeron significativamente a 24 hpi, por lo que podrían estar relacionados con el estrés de la inyección. Según Chen *et al.* (2011), el efecto Warburg, definido como una glicolisis aeróbica que transforma la glucosa en lactato durante el proceso infeccioso, se lleva a cabo durante las 12 primeras horas de la infección. Este proceso permite satisfacer las necesidades energéticas tanto del organismo como del virus y controlar el estrés oxidativo generado por la infección. En la segunda etapa de infección, a partir 24 hpi, la alteración de las membranas mitocondriales reduce el consumo de glucosa, incrementando la glucosa en la hemolinfa, lo que interrumpe la producción energética y aumenta el estrés oxidativo, causando muerte celular (Chen *et al.*, 2011). En este trabajo, entre 24 y 48 hpi, las concentraciones de glucosa en la hemolinfa fueron

significativamente más altos en el control positivo comparado con el control negativo y los tratamientos experimentales, por lo que se podrían encontrar en la segunda etapa de la infección como descrita por Chen *et al.* (2011). Además, Yoganandhan *et al.* (2003) reportaron que los niveles de glucosa aumentan en la hemolinfa de camarones infectados con WSSV para protegerse de la infección, y podría deberse al transporte de glucosa desde el hepatopáncreas y el músculo a la hemolinfa. Finalmente, Huang *et al.* (2015) revela la interacción directa entre varias proteínas de la envoltura viral implicadas en el proceso infeccioso (VP24, VP28, VP31, VP39, entre otras), y la proteína transportadora de glucosa Glut1 de la membrana celular del camarón, por lo que podría afectar el transporte de la glucosa hasta los órganos durante el proceso infeccioso.

Previamente, se ha demostrado que la administración oral de polisacáridos sulfatados de *Sargassum polycystum* (Chotigeat *et al.*, 2004), de *Gracilaria fisheri* (Rudtanatip *et al.*, 2014), de *Cladosiphon okamuranus* (Takahashi *et al.*, 1998), de *Sargassum wightii* (Sivagnanavelmurugan *et al.*, 2012) contribuyeron a disminuir el impacto de la infección por WSSV en el camarón. El mecanismo de acción propuesto en varios estudios es que los polisacáridos sulfatados de las macroalgas se unen a las glicoproteínas de la envoltura viral y por lo tanto, el virus no podría interactuar con la célula hospedera (Witvrouw y De Clercq, 1997; Chotigeat *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2006). Rudtanatip *et al.* (2014) demostraron que los polisacáridos sulfatados de *Gracilaria fisheri* se unen a las proteínas de envoltura de WSSV, incluyendo VP24, VP26, VP28, VP31 y VP39. Sotanon *et al.* (2018) demostraron que la proteína VP37 del WSSV, adjunta a las proteínas VP26 y VP28, se unen a moléculas similares a la heparina, un polisacárido altamente sulfatado, en la superficie de los hemocitos de los camarones durante la infección viral, y que esta unión se puede inhibir gracias a la presencia de los polisacáridos sulfatados de la macroalga *G. fisheri*, debido a su composición molecular similar a la heparina. En el caso del presente trabajo, es probable que los polisacáridos sulfatados de la macroalga *U. lactuca* puedan actuar de la misma y así mitigar la infección.

La sustitución de la harina de pescado con otras fuentes de proteína contribuye a reducir el nivel de colesterol en el camarón (Cheng y Hardy, 2004). Casas-Valdez *et al.* (2006) demostraron que la inclusión de *Sargassum sp.* en el alimento del camarón se asocia con la disminución del nivel de colesterol en el tejido de los animales. Sathivel *et al.* (2008) sugieren que los polisacáridos de *Ulva lactuca* pueden tener la capacidad de prevenir el aumento en los niveles de ácidos grasos libres, triglicéridos y colesterol total tanto en la hemolinfa como en el tejido del camarón. En este estudio, no se observó diferencia significativa en las concentraciones en triglicéridos entre los tratamientos, pero al contrario hubo una disminución de la concentración de colesterol en la hemolinfa de los camarones alimentados con *U. lactuca* a 0 y 48 hpi. Esta diferencia puede estar en parte asociada con la menor cantidad de harina de pescado en los alimentos con detrito, la cual, contiene un alto nivel en colesterol, mientras que las macroalgas no contienen. También, se ha informado que las algas marinas previenen el estrés oxidativo en el metabolismo del colesterol hepático (Sathivel *et al.*, 2008), mejoran la excreción y disminuyen la absorción y acumulación en el organismo de lípidos (Morita y Nakano, 2002; D. Zhu *et al.*, 2016). El colesterol es esencial en la replicación viral por su rol fundamental en la fluidez membranal, permitiendo a las caveolas formar las vesículas durante el proceso de endocitosis del virus (Guo *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013). Huang *et al.* (2013) sugirieron que la disminución del colesterol en la membrana celular puede inhibir la endocitosis del virus de la mancha blanca. Wang *et al.* (2014b) descubrieron que la eliminación completa del colesterol restringió por completo la infección viral de WSSV. A través de este experimento se demostró que *Ulva lactuca* incluida en el alimento disminuye los niveles de colesterol en el camarón blanco *Penaeus vannamei* y así puede limitar la entrada del virus en las células del camarón en las etapas tempranas de la infección.

8.4 Dinámica microbiana en sistemas IMTA

8.4.1 Comunidades bacterianas en el agua de un sistema IMTA camarón-ostión

La carga bacteriana resultó más alta en el agua del sistema de cocultivo comparado con el sistema de monocultivo en ese estudio. De igual manera, Pang *et al.* (2006) reportaron una

concentración total de bacterias más alta en el agua de cocultivo de abulón *Haliotis discus hannai* con macroalga *G. textorii*, comparado con el monocultivo de abulón; y sugieren un posible efecto del aumento de superficies biológicas en las cuales se pueden fijar las bacterias para formar biopelículas, y la modificación de las comunidades bacterianas proveniente de la actividad metabólica de ambos animales. Ambos organismos en el cultivo pueden facilitar la propagación de diversas especies bacterianas y aumentar potencialmente el nivel de heterogeneidad de la comunidad bacteriana en el sistema de cocultivo (Pang *et al.*, 2006). Sin embargo, Jones *et al.* (2001) reportaron una disminución de la carga bacteriana en un sistema multitrófico con camarón *Penaeus japonicus*, ostión *Saccostrea commercialis*, y macroalga *Gracilaria edulis*.

La presencia del ostión en el sistema de cocultivo cambió las proporciones en las colonias de *Vibrio* detectadas en medio TCBS para alcanzar a un equilibrio en proporciones casi iguales de las colonias sacarosa-negativo (verde) y sacarosa-verde (amarillo). Pang *et al.* (2006) observaron el mismo cambio de dominancia a favor de las colonias verdes de *Vibrio* en el agua de un sistema de cocultivo de abulón *Haliotis discus hannai* con macroalga *Gracilaria textorii*. El incremento en las colonias amarillas de *Vibrio* ($> 1 \times 10^4$ ufc.mL⁻¹) ha sido reportada como un indicador de baja calidad de agua para el cultivo de camarones y el consiguiente problema de enfermedades (Cruz *et al.*, 2008; Le François *et al.*, 2010). La capacidad del ostión a filtrar bacterias (Loosanoff, 1949; Kautsky y Sverker, 1987), puede estar relacionada con la disminución en el número de UFC amarillas en el agua del cocultivo. Además, la presencia de bacterias adicionales en el agua puede tener un rol de probiótico. Kumar *et al.* (2016) han reportado varios estudios sobre el efecto probiótico de múltiples cepas bacterianas y *Vibrionales* (*Bacillus sp.*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Aeromonas*, *Vibrio sp.*) sobre otros *Vibrio* patógenos. El principio detrás de la aplicación de probióticos es introducir un ecosistema de bacterias benéficas que pueden ocupar los distintos nichos ecológicos y contribuir a eliminar los patógenos potenciales del sistema de cultivo. Algunas bacterias nitrificantes proporcionan un beneficio adicional al mejorar la calidad del agua, mediante la oxidación del amonio a nitrito y la oxidación de nitrito a nitrato lo cual disminuye los niveles de amonio en el agua (Laurence, 2010), lo cual acelera el

proceso de nitrificación. Esto podría explicar porque las concentraciones de nitrito y nitrato alcanzan la asíntota más rápido comparado con los sistemas de monocultivo de camarón. Por lo tanto, el aumento de las concentraciones de bacterias y en particular *Vibrio*, parecen tener un efecto favorable sobre el sistema de cocultivo.

8.4.2 Comunidades bacterianas digestivas de *P. vannamei* y *C. gigas* en un sistema IMTA camarón-ostión

Las condiciones ambientales y dietéticas son los factores biológicos más fuertes que afectan la microbiota del camarón (Zhang *et al.*, 2014; Cornejo-Granados *et al.*, 2018), como se refleja en el presente trabajo con variaciones significativas en las comunidades bacterianas digestivas de *P. vannamei* y *C. gigas* bajo cocultivo en el sistema IMTA en comparación con el sistema de monocultivo.

Los filos dominantes en el intestino del camarón y en la glándula digestiva de los ostiones fueron *Proteobacteria*, con una abundancia relativa de 59.2% y 66% respectivamente, seguidos de *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Firmicutes*. Varios estudios han demostrado los mismos filos dominantes en *Crassostrea corteziensis*, *Crassostrea gigas* y *Crassostrea sikamea* (Trabal Fernández *et al.*, 2014), *Saccostrea glomerata* (Green y Barnes, 2010), *Penaeus vannamei* (Zeng *et al.*, 2017; Cornejo-Granados *et al.*, 2018), *Penaeus monodon* (Cornejo-Granados *et al.*, 2018) y *Penaeus stylirostris* (Cardona *et al.*, 2016). Este subconjunto de filos microbiológicos puede tener un papel fundamental en la estructura y función de la microbiota digestiva en estos organismos (Zeng *et al.*, 2017).

Dentro de las *Proteobacteria*, *Alphaproteobacteria* es la clase más abundante y diversa (Spain *et al.*, 2009), con una gran variedad de estrategias metabólicas, que incluyen fotosíntesis, fijación de nitrógeno, oxidación de amoníaco y metilotrofia (Williams *et al.*, 2007). Dentro de las *Alphaproteobacteria*, el orden *Rhodobacterales* se observó en mayor abundancia en la glándula digestiva de los ostiones en el sistema de cocultivo en comparación con el sistema de monocultivo, y parece estar influenciado por su alimentación basada en los desechos de los

camarones, debido al hecho de que este orden predomina en el intestino de los camarones de acuerdo con los resultados del presente y anteriores estudios (Zhu *et al.*, 2016b; Chen *et al.*, 2017b). Se ha propuesto que los *Rhodobacterales* desempeñan un papel importante en el estado de salud de las ostiones (Clerissi *et al.*, 2018), por lo tanto, un aumento en este orden, tal como se obtiene en el presente trabajo en el tratamiento de cocultivo, podría ser benéfico para los ostiones. Especialmente la familia *Rhodobacteraceae* puede tener un rol clave en mantener la calidad del agua (Zheng *et al.*, 2017) y la salud de los sistemas de cultivo de camarón (Wang *et al.*, 2014a; Cardona *et al.*, 2016; Yao *et al.*, 2018). Esta familia se ha encontrado en mayor abundancia en el intestino de camarones sanos en comparación con camarones enfermos (Zhu *et al.*, 2016b; Chen *et al.*, 2017b). Además, la presencia de *Sphingomonadales* (*Alfaproteobacteria*) en la glándula digestiva de los ostiones puede mejorar el proceso de nitrificación (Boucher y Boucher-Rodoni, 1988) debido a su capacidad para fijar nitrógeno (Dhami *et al.*, 2018), lo que podría ayudar a mantener la concentración de amonio observada en el sistema de cocultivo. Por lo tanto, los resultados de este estudio sugieren que las comunidades de *Alfaproteobacteria* se han modificado en el intestino de los ostiones cocultivados debido a cambios en la dieta, los cuales pueden haber contribuido a mantener la calidad del agua y la salud de ambos organismos en el sistema IMTA. Dentro de las *Gammaproteobacteria*, la familia *Piscirickettsiaceae* (*Thiotrichales*) no se identificó en la glándula digestiva del ostión de cocultivo en comparación con el sistema de monocultivo, lo que podría estar relacionado con la presencia de camarones. Los *Thiotrichales* se han asociado con los biodepositos de las almejas (Murphy *et al.*, 2019), sin embargo, existe una falta de información sobre el papel de *Thiotrichales* en el ostión.

Además, los camarones y los ostiones del sistema de cocultivo mostraron una menor abundancia relativa de *Vibrionaceae* en comparación con los organismos en sus respectivos sistemas de monocultivo. Entre las enfermedades bacterianas, la vibriosis causada por *Vibrio* sp., representa una de las patologías más problemáticas. El exceso de *Vibrio* se ha relacionado con problemas patogénicos o sanitarios para algunos organismos acuáticos, incluido *P. vannamei* (Xiong *et al.*, 2015) y *C. gigas* (Le Roux *et al.*, 2016). *Vibrio* en el tracto digestivo es

sensible al medio ambiente circundante (Xing *et al.*, 2013) y el cocultivo en IMTA de *P. vannamei* y *C. gigas* puede promover las condiciones saludables que reducen su prevalencia. Respecto a los resultados de predicción funcional, la disminución en las comunidades de *Vibrio* en el camarón se podría asociar al incremento en la abundancia relativa de bacterias asociadas a la biosíntesis de antibióticos (vancomicina, policétidos y ansamicinas). Por otro lado, el incremento de la abundancia en bacterias implicadas en el metabolismo de esfingolípidos en el camarón de cocultivo, podría reflejar una mejor respuesta frente al estrés celular y una mejora en el sistema inmune del camarón (Zhao *et al.*, 2018). Por lo tanto, la disminución en las comunidades de *Vibrio* en las comunidades microbiológicas del intestino del camarón puede mantener un sistema de cultivo más saludable y tiende a mejorar la productividad del camarón. Además de mostrar una abundancia relativa más baja en *Vibrionaceae*, la glándula digestiva de los ostiones presentó una mayor diversidad alfa de bacterias. La microbiota intestinal normalmente compite con los microorganismos patógenos por los nutrientes y el espacio en el tracto intestinal (Pereira y Berry, 2017; Pickard *et al.*, 2017). En particular, la microbiota de ostiones de familias susceptibles a enfermedades, tienen una diversidad menor que las resistentes (Clerissi *et al.*, 2018), lo que puede sugerir que el sistema IMTA en este estudio podría tener un impacto positivo en la resistencia a enfermedades en el ostión. Finalmente, los resultados de predicción funcional, apoyan esta posibilidad ya que demostraron una disminución de la abundancia relativa en bacterias implicadas en la apoptosis y señales P53 relacionado con el ADN dañado; en la movilidad y quimiotaxis bacteriana y en el montaje flagelar considerados como factores de virulencia para patógenos como *Vibrio* sp. (Manson, 1992; Wang *et al.*, 2015) y un incremento en la abundancia relativa en bacterias implicadas en el metabolismo de metabolitos secundarios, especialmente antibióticos de tipo vancomicina y ansimicinas en el tracto digestivo de los camarones y en el metabolismo de carotenoides y terpenoides en los tractos digestivos de organismos del sistema de cocultivo.

Por otra parte, el filo *Bacteroidetes* es abundante en el medio marino; se ha reportado que forma parte de los principales grupos de bacterias y está implicado en el desarrollo normal del tracto gastrointestinal de los animales acuáticos (Thomas *et al.*, 2011), entre los cuales incluyen

a camarones (Cornejo-Granados *et al.*, 2018) y ostiones (Trabal Fernández *et al.*, 2014) en todas las etapas de desarrollo. Desempeñan un papel benéfico en la degradación de las partículas de materia orgánica (Thomas *et al.*, 2011). La función biológica principal y más estudiada de los *Bacteroidetes* como simbioses, es la degradación de los biopolímeros, principalmente polisacáridos que provienen de detritos orgánicos particulados (Thomas *et al.*, 2011). Con respecto a los resultados de predicción funcional, se ha observado una disminución de las bacterias involucradas en el metabolismo lipídico a favor de las involucradas en el metabolismo de los carbohidratos en la glándula digestiva del ostión, lo que se podría asociar al mayor contenido de lípidos en la microalga comparado con los desechos de camarones. De hecho, se ha reportado que las bacterias del filo *Bacteroidetes* son dominantes y compartidos en el intestino de los camarones y en el sedimento debido a las transferencias microbiológicas entre la ingesta y la excreción (Huang *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2019). Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la mayor abundancia relativa de *Bacteroidetes* en la glándula digestiva de los ostiones del cocultivo en comparación con el sistema de monocultivo, puede estar estrechamente relacionada con su fuente de alimentación (desechos de camarones o microalgas).

Se observó una mayor abundancia de *Flavobacteriaceae* (*Bacteroidetes*) en la glándula digestiva de los ostiones del sistema de cocultivo en el presente trabajo. A pesar del poco énfasis que se ha dado a los aspectos benéficos que pueden otorgar las *Flavobacteria* en los organismos, las bacterias de esta familia se caracterizan por sus propiedades de pigmentación, que se deben a la producción de carotenoides que juegan un papel importante en la protección de los organismos contra los efectos nocivos de los radicales libres (Sowmya y Sachindra, 2016). Los resultados de predicción funcional coinciden con esta sugerencia, ya que se ha observado un incremento en las bacterias implicadas en las vías interrelacionadas de biosíntesis de terpenoides, carotenoides y preniltransferasas. En este sentido, Clerissi *et al.* (2018) consideran que estas bacterias constituyen un posible factor importante en el estado físico de los ostiones, lo que sugiere que el sistema IMTA con camarones tiene un efecto beneficioso en el estado de

salud de los ostiones, y puede potencialmente relacionarse con la reducción de la señal p53 y apoptosis celular.

Finalmente, los resultados sugieren que los cambios significativos en la glándula digestiva de los ostiones podrían atribuirse a la estrecha relación entre la funcionalidad de las bacterias y la modificación de la dieta, que parecen aportar aspectos benéficos para el manejo del agua, la promoción de la salud de los organismos y la productividad de los camarones.

8.5 Flujo de nutrientes en sistemas IMTA e importancia económica

El sistema de monocultivo de camarón desarrollado en este trabajo generó un desperdicio de 62.8% de nitrógeno (N) y 87.2% de fósforo (P) en las aguas residuales del cultivo. Estos resultados coinciden con los reportados previamente. En cultivos semi-intensivos, Páez-Osuna *et al.* (1997) obtuvo una retención en los tejidos de los camarones del 35.5% de N y 6.1% de P. Según Bouwman *et al.* (2011), en crustaceos marinos cultivados en sistemas intensivos en 2006, únicamente 25% del nitrógeno y 10% del fósforo suministrados en el alimento están aprovechados en el producto de cosecha. Los residuales se dividen entre materia disuelta en el agua (55% de N y 18% de P) y sólidos (20% de N y 72% de P). En el caso de los ostiones de monocultivo en este estudio, se observa un aprovechamiento de 33.5% del N y 29.1% del P, este último repartido entre el tejido y la concha del organismo, lo cual genera una descarga del 66.5% de N y 70.9% de P en las aguas residuales de cultivo. En un estudio realizado en los bivalvos cultivados en 2006, se demostró que 33% del N (22% del P) en la materia suspendida filtrada se recupera en el organismo mientras que el 27% se libera como N disuelto (31% del P) y el 40% como N particulado (47% del P) (Bouwman *et al.*, 2011). Finalmente, de un cultivo cuya fuente de nutrientes para la macroalga proviene de un fertilizante inorgánico (29:5:0), la macroalga aprovecha de 62.4% del N y 83.6% del P para su propio crecimiento.

En comparación, los sistemas multitróficos aprovecharon los nutrientes al máximo y liberaron en las aguas residuales 18.0% de N y 40.4% de P en el sistema IMTA, y 9.7% de N y 22.0% de P en el sistema IMTA con detritos como fuente alimenticia parcial para el camarón y el ostión. La

comparación de los dos sistemas IMTA, permite observar que los detritos en las dietas pueden disminuir la cantidad de desechos sólidos producidos por el camarón y el ostión pero genera más desperdicio de materia inorgánica en el agua, la cual es aprovechada con mayor eficiencia por la macroalga para su propio crecimiento.

El desarrollo de sistemas multitrofos se propone como una alternativa en la industria acuícola que permite reducir el impacto ambiental de la camaronicultura en las aguas costeras de México mientras incrementa la productividad. Lo anterior gracias a la bioseguridad de los cultivos y el aprovechamiento máximo de los nutrientes, para responder a la alta demanda en proteína animal de alta calidad para alimentar a la población. En agosto del 2021, el valor del camarón en el mercado internacional fue reportado a \$16 USD.kg⁻¹, del ostión a \$1.25 USD.pieza⁻¹ y de la macroalga a \$15 USD.kg fresco⁻¹. Si se considera una empresa con sistemas de monocultivo intensivo de camarón con una densidad promedio de 200 individuos.m⁻² en un espacio de cultivo total de 100 ha y una producción de 4 toneladas por ha por ciclo (3 ciclos al año), se puede estimar la ganancia económica que representa el sistema IMTA (**Tabla 28**).

Tabla 28. Ganancia económica (mil \$USD) teórica en un sistema de monocultivo intensivo de camarón y en un sistema IMTA.

	Sistema de monocultivo	Sistema IMTA	Sistema IMTA-D
Costos de alimentación (60% de los costos totales)	-9,790	-9,790	-7,830
Otros costos de producción de camarón (Quagraine, 2015)	-6,600	-6,600	-6,600
Venta de camarón	+19,200	+25,700	+25,700
Costos de producción de microalga (Oostlander <i>et al.</i> , 2020)	-	-8,800	-8,800
Costos de semilla de ostión (Chen <i>et al.</i> , 2017a)	-	-350	-350
Venta de ostiones (Chen <i>et al.</i> , 2017a)	-	+3,800	+3,800
Venta de macroalga fresca (Van Der Linden, 2014)	-	+6,700	+9,000
Ganancia total	+2,810	+10,660	+14,920

De acuerdo con el presente estudio, los sistemas IMTA de *P. vannamei* con *C. gigas* y *U. lactuca*, gracias a la mejora y la diversificación de la productividad, y aun si se consideran los costos adicionales relacionados con la producción de ostiones, permitirían una ganancia de más de 3 veces de la que se obtendría en un sistema tradicional de monocultivo de camarón.

9. CONCLUSIONES

En esta investigación se demostró que los sistemas de integración multitrófica con camarón blanco *Penaeus vannamei*, ostión japonés *Crassostrea gigas* y macroalga *Ulva lactuca* permiten:

- Disminuir el 75% de la concentración de partículas suspendidas totales gracias a la capacidad de filtración del ostión.
- Disminuir la materia inorgánica en las aguas residuales de los cultivos intensivos con una biorremediación de hasta 88% del amonio, 63% del nitrito, 66% del nitrato y 50% del fosfato gracias a la capacidad de filtración de la macroalga.
- Aprovechar un 82% del nitrógeno (N) y 60% de fósforo (P) provistos por la alimentación del camarón y del ostión a favor de un mayor crecimiento del camarón (+34%) y de la macroalga (+29%), comparado con el sistema de monocultivo de camarón que solo aprovecha del 37% del N y 13% del P.
- Disminuir la abundancia relativa de familias de bacterias potencialmente patógenas en la microbiota digestiva de los organismos mejorando su estado de salud y susceptibilidad frente a brotes de enfermedades como vibriosis.
- Producir una macroalga que presenta después de una predigestión un alto potencial nutricional para sustituir hasta un 20% la harina de pescado en el alimento del camarón sin modificar sus parámetros de crecimiento en sistemas de mono- y cocultivo, mientras que para el ostión puede sustituir hasta 50% de las microalgas en sistemas de monocultivo. Se demostró mediante técnicas isotópicas que los detritos de macroalga aportan proporciones significativas de nutrientes para la biosíntesis de nuevo tejido.

- Aprovechar hasta 90% del N y 88% del P provisto por la alimentación constituido por este nuevo alimento integrado al sistema IMTA, especialmente a favor del crecimiento de la macroalga (+88%), comparado con el sistema de monocultivo de macroalga.
- Permitir al camarón tener una mayor resistencia contra el virus de la mancha blanca gracias al nuevo alimento con 20% de detritos de macroalga como sustituto de la harina de pescado.
- Diversificar y mejorar la producción con productos de alto valor comercial en el mercado; respecto a sistemas tradicionales de monocultivo.

La Asamblea General de la ONU adoptó la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible, un plan de acción a favor de las personas, el planeta y la prosperidad. La Agenda implica un compromiso común y universal de responder con 17 objetivos. Este trabajo de tesis engloba dos de estos objetivos que son: (1) #14 VIDA SUBMARINA: Prevenir y reducir significativamente la contaminación marina de todo tipo, en particular la producida por actividades realizadas en tierra, incluidos los detritos marinos y la polución por nutrientes y (2) #2 HAMBRE CERO: Asegurar la sostenibilidad de los sistemas de producción de alimentos y aplicar prácticas resilientes que aumenten la productividad y la producción, contribuyan al mantenimiento de los ecosistemas.

En este contexto, los sistemas IMTA con camarón blanco *Penaeus vannamei*, ostión japonés *Crassostrea gigas* y macroalga *Ulva lactuca* en este trabajo de tesis demostraron fehacientemente datos que se predecían: permitieron mitigar el impacto ambiental de la camaronicultura en las zonas costeras gracias una mayor productividad mediante una mejor utilización de nutrientes y control microbiológico respecto a sistemas tradicionales de monocultivo. Además, el uso de la biomasa de macroalga como detritos para sustituir la harina de pescado es un paso adelante en la alimentación del camarón y pretende reducir los costos de producción tanto como minimizar el impacto ecológico de las pesquerías al reducir la demanda de harina de pescado en la alimentación en la camaronicultura. Sin lugar a duda, la utilización de macroalgas en la

acuicultura, tanto como ingrediente alimenticio como agente biorremediador del agua de uso acuícola, es viable en términos económicos, ecológicos y sociales.

La tendencia mundial a romper paradigmas en la acuicultura representa una oportunidad para retomar el rumbo tanto de la investigación acuícola como de la industria que la sostiene. En el futuro, se debe incursionar en mejorar las técnicas de aprovechamiento de las macroalgas para lograr porcentajes de sustitución de harina de pescado del 100% sin comprometer el desarrollo de los organismos de cultivo. Aunado a esto, los beneficios que conllevan los cultivos multitróficos comparados con los monocultivos, deberán superar a los prejuicios de la acuicultura tradicional, si es que queremos catapultar a la acuicultura como una actividad capaz de garantizar la seguridad alimentaria mundial.

10. LITERATURA CITADA

- Aagesen, AM. y Häse, CC. (2014). Seasonal effects of heat shock on bacterial populations, including artificial *Vibrio parahaemolyticus* exposure, in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Food Microbiology*, 38: 93-103. doi: 10.1016/j.fm.2013.08.008
- Abreu, MH., Varela, DA., Henríquez, L., Villarroel, A., Yarish, C., Sousa-Pinto, I. y Buschmann, AH. (2009). Traditional vs. Integrated Multi-Trophic Aquaculture of *Gracilaria chilensis* C. J. Bird, J. McLachlan & E. C. Oliveira: Productivity and physiological performance. *Aquaculture*, 293(3-4): 211-220. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.03.043
- Acarli, S., Lok, A., Yildiz, H. y Scientific, T. (2011). Comparative Growth, Survival and Condition Index of Flat Oyster, *Ostrea edulis* (Linnaeus 1758) in Mersin Bay, Aegean Sea, Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17(2): 203-210. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/228491214>
- Aguirre-Guzmán, G., Labreuche, Y., Ansquer, D., Espiau, B., Levy, P., Ascencio, F. y Saulnier, D. (2003). Exotoxinas proteicas de cepas de *Vibrio penaeicida* y *Vibrio nigripulchritudo*, patogénicas para camarón. *Ciencias Marinas*, 29(1): 77-88. doi: 10.7773/cm.v29i1.132
- Alcaraz, G., Chiappa-Carrara, X., And, VE. y Vanegas, C. (1999). Acute Toxicity of Ammonia and Nitrite to White Shrimp *Penaeus setiferus* Postlarvae. *Journal of the World Aquaculture Society*, 30(1): 90-97. doi: 10.1111/j.1749-7345.1999.tb00321.x
- Ale, MT., Mikkelsen, JD. y Meyer, AS. (2011). Differential growth response of *Ulva lactuca* to ammonium and nitrate assimilation. *Journal of Applied Phycology*, 23(3): 345-351. doi: 10.1007/s10811-010-9546-2
- Allan, G. (2004). Fish for Feed vs Fish for Food. En: Fish, Aquaculture and Food Security: Sustaining Fish as Food Supply. Crawford Fund for International Agricultural Research, Canberra, Australia, pp 20-26
- Amaya, EA., Davis, DA. y Rouse, DB. (2007). Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions. *Aquaculture*, 262: 393-401. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.11.015
- Amezcuca, F. y Soto, MF. (2014). Current State of Aquaculture in México. *Fisheries*, 39(11): 554-555. doi: 10.1080/03632415.2014.984561
- Anderson, JL., Valderrama, D. y Jory, DE. (2016). Production could reach 4.44 million metric tons by 2018. In: Glob. shrimp Surv. GOAL 2016. Disponible en: <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/global-shrimp-survey-goal-2016/>. [consulta: 11 junio 2018]
- Anjos, C., Baptista, T., Joaquim, S., Mendes, S., Matias, AM., Moura, P., Simões, T. y Matias, D. (2017). Broodstock conditioning of the Portuguese oyster (*Crassostrea angulata*, Lamarck, 1819): influence of different diets. *Aquaculture Research*, 48(7): 3859-3878. doi: 10.1111/are.13213
- AOAC. (1997). Official Methods of Analysis of AOAC International. , 16th (3) ed. Arlington,VA, USA
- Aparicio-Simón, B., Piñón, M., Racotta, R. y Racotta, IS. (2010). Neuroendocrine and metabolic responses of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to acute handling stress. *Aquaculture*, 298(3-4): 308-314. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.10.016

- Aparicio-Simón, B., Piñón, M., Racotta, R. y Racotta, IS. (2018). Neuroendocrine and metabolic responses of Pacific whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* exposed to hypoxia stress. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 46(2): 364-376. doi: 10.3856/vol46-issue2-fulltext-12
- Araújo, BC., Flores-Galvez, K., Honji, RM., Barbosa, VM., Viana, MT., Tinajero, A. y Mata-Sotres, JA. (2020). Arachidonic acid effects on the overall performance, fatty acid profile, hepatopancreas morphology and lipid-relevant genes in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*, 523: 735207. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735207
- Arrieche, D., Maeda-Martínez, AN., Farías-Sánchez, JA. y Saucedo, PE. (2010). Biological performance of the penshell *Atrina maura* and mussel *Mytella strigata* under different water flow regimes. *Ciencias Marinas*, 36(3): 237-248. doi: 10.7773/cm.v36i3.1704
- Ashkenazi, DY., Israel, A. y Abelson, A. (2018). A novel two-stage seaweed integrated multi-trophic aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 0: 1-17. doi: 10.1111/raq.12238
- Astriana, BH. (2012). Evaluation of the Potential of Integrated Multi-triphic Aquaculture (IMTA) using Oyster (*Crassostrea* sp.) and Seaweed (*Gracilaria* sp.) for Shrimp (*Penaeus monodon*) Farms to Reduce Negative Impacts on Environment and to Improve Coastal Economy in Nusa Teng. Oregon State University
- Austin, B. y Zhang, XH. (2006). *Vibrio harveyi*: A significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2): 119-124. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.01989.x
- Barillé, L., Héral, M. y Barillé-Boyer, A-L. (1997). Modélisation de l'écophysiologie de l'huître *Crassostrea gigas* dans un environnement estuarien. *Aquatic Living Resources*, 10(1): 31-48. doi: 10.1051/alr:1997004
- Barrington, K., Ridler, N., Chopin, T., Robinson, S. y Robinson, B. (2010). Social aspects of the sustainability of integrated multi-trophic aquaculture. *Aquaculture International*, 18(2): 201-211. doi: 10.1007/s10499-008-9236-0
- Bayne, BL. (2009). Carbon and nitrogen relationships in the feeding and growth of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 374(1): 19-30. doi: 10.1016/j.jembe.2009.04.003
- Bayne, BL. y Svensson, S. (2006). Seasonal variability in feeding behaviour, metabolic rates and carbon and nitrogen balances in the Sydney oyster, *Saccostrea glomerata* (Gould). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 332(1): 12-26. doi: 10.1016/j.jembe.2005.10.019
- Beardsley, C., Moss, S., Malfatti, F. y Azam, F. (2011). Quantitative role of shrimp fecal bacteria inorganic matter fluxes in a recirculating shrimp aquaculture system. *Microbiology ecology*, 77: 134-145. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01094.x
- Beaudoin, CP., Prepas, EE., Tonn, WM., Wassenaar, LI. y Kotak, BG. (2001). A stable carbon and nitrogen isotope study of lake food webs in Canada's Boreal Plain. *Freshwater Biology*, 46(4): 465-477. doi: 10.1046/j.1365-2427.2001.00688.x
- Birg, A., Ritz, NL. y Lin, HC. (2019). The unknown effect of antibiotic-induced dysbiosis on the gut microbiota. En: Faintuch J, Faintuch S (eds) *Microbiome and Metabolome in Diagnosis, Therapy, and other Strategic Applications* Elsevier Inc., pp 195-200
- Bitou, N., Ninomiya, M., Tsujita, T. y Okuda, H. (1999). Screening of lipase inhibitors from marine algae. *Lipids*, 34(5): 441-445. doi: 10.1007/s11745-999-0383-7
- Bondad-Reantaso, MG., Subasinghe, RP., Arthur, JR., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., Tan, Z. y Shariff, M. (2005). Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary*

- Parasitology*, 132(3-4): 249-272. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.07.005
- Bouchaud-Camou, E., Lebesnerais, C., Lubet, P. y Lihmann, I. (1983). Dynamique et enzymologie de la digestion chez l'huitre *Crassostrea gigas*. En: IFREMER (ed) Bases biologiques de l'aquaculture Montpellier, pp 75-96
- Boucher, G. y Boucher-Rodoni, R. (1988). In situ measurement of respiratory metabolism and nitrogen fluxes at the interface of oyster beds. *Marine Ecology Progress Series*, 44: 229-238. doi: 10.3354/meps044229
- Bouwman, AF., Pawłowski, M., Liu, C., Beusen, AHW., Shumway, SE., Glibert, PM. y Overbeek, CC. (2011). Global Hindcasts and Future Projections of Coastal Nitrogen and Phosphorus Loads Due to Shellfish and Seaweed Aquaculture. *Reviews in Fisheries Science*, 19(4): 331-357. doi: 10.1080/10641262.2011.603849
- Bradford, MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Briggs, MRP. (2006). Cultured Aquatic Species Information Programme. In: FAO Fish. Aquac. Dep. Disponible en: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/en. [consulta: 9 junio 2018]
- Brito, LO., Arana, LAV., Soares, RB., Severi, W., Miranda, RH., da Silva, SMBC., Coimbra, MRM. y Gálvez, AO. (2014a). Water quality, phytoplankton composition and growth of *Litopenaeus vannamei* (Boone) in an integrated biofloc system with *Gracilaria birdiae* (Greville) and *Gracilaria domingensis* (Kützinger). *Aquaculture International*, 22(5): 1649-1664. doi: 10.1007/s10499-014-9771-9
- Brito, LO., Chagas, AM., da Silva, EP., Soares, RB., Severi, W. y Gálvez, AO. (2014b). Water quality, Vibrio density and growth of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) in an integrated biofloc system with red seaweed *Gracilaria birdiae* (Greville). *Aquaculture Research*, : 1-11. doi: 10.1111/are.12552
- Brito, R., Rosas, C., Chimal, ME. y Gaxiola, G. (2001). Effect of different diets on growth and digestive enzyme activity in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) early post-larvae. *Aquaculture Research*, 32(4): 257-266. doi: 10.1046/j.1365-2109.2001.00548.x
- Burford, MA., Costanzo, SD., Dennison, WC., Jackson, CJ., Jones, AB., McKinnon, AD., Preston, NP. y Trott, LA. (2003). A synthesis of dominant ecological processes in intensive shrimp ponds and adjacent coastal environments in NE Australia. *Marine Pollution Bulletin*, 46(11): 1456-1469. doi: 10.1016/S0025-326X(03)00282-0
- Burford, MA. y Lorenzen, K. (2004). Modeling nitrogen dynamics in intensive shrimp ponds: The role of sediment remineralization. *Aquaculture*, 229(1-4): 129-145. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00358-2
- Cabello, FC. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8(7): 1137-1144. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x
- CABI. (2018). *Litopenaeus vannamei* (whiteleg shrimp). In: Invasive Species Compend. Disponible en: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/71097>. [consulta: 9 junio 2018]
- Cao, L., Wang, W., Yang, Y., Yang, C., Yuan, Z., Xiong, S. y Diana, J. (2007). Environmental impact of aquaculture and countermeasures to aquaculture pollution in China. *Environmental Science and Pollution Research*, 14(7): 452-462. doi: 10.1065/espr2007.05.426

- Carboni, S., Clegg, SH. y Hughes, AD. (2016). The use of biorefinery by-products and natural detritus as feed sources for oysters (*Crassostrea gigas*) juveniles. *Aquaculture*, 464: 392-398. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.07.021
- Cardona, E., Gueguen, Y., Magré, K., Lorgeoux, B., Piquemal, D., Pierrat, F., Noguier, F. y Saulnier, D. (2016). Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. *BMC Microbiology*, 16(1): 1-9. doi: 10.1186/s12866-016-0770-z
- Carrillo-Farnés, O., Forrellat-Barrios, A., Guerrero-Galván, S. y Vega-Villasante, F. (2007). A review of digestive enzyme activity in penaeid shrimps. *Crustaceana*, 80(3): 257-275. doi: 10.1163/156854007780162424
- Casas-Valdez, M., Portillo-Clark, G., Aguila-Ramírez, N., Rodríguez-Astudillo, S., Sánchez-Rodríguez, I. y Carrillo-Domínguez, S. (2006). Efecto del alga marina *Sargassum* spp. sobre las variables productivas y la concentración de colesterol en el camarón café, *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes, 1900). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 41(1): 97-105
- Castelar, B., Pontes, MD., Costa, WDM., Moura, LCF., Dias, GE., Landuci, FS. y Reis, RP. (2015). Biofiltering efficiency and productive performance of macroalgae with potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA). *Boletim do Instituto de Pesca*, 41: 763-770
- Castelar, B., Reis, RP. y dos Santos Calheiros, AC. (2014). *Ulva lactuca* and *U. flexuosa* (Chlorophyta, Ulvophyceae) cultivation in Brazilian tropical waters: Recruitment, growth, and ulvan yield. *Journal of Applied Phycology*, 26(5): 1989-1999. doi: 10.1007/s10811-014-0329-z
- Castro, PF., Freitas, ACV., Santana, WM., Costa, HMS., Carvalho, LB. y Bezerra, RS. (2012). Comparative study of amylases from the midgut gland of three species of penaeid shrimp. *Journal of Crustacean Biology*, 32(4): 607-613. doi: 10.1163/193724012X634206
- Castro, R., Zarra, I. y Lamas, J. (2004). Water-soluble seaweed extracts modulate the respiratory burst activity of turbot phagocytes. *Aquaculture*, 229(1-4): 67-78. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00401-0
- Chávez-Villalba, J. (2014). Cultivo de ostión *Crassostrea gigas*: Análisis de 40 años de actividades en México. *Hidrobiológica*, 24(3): 175-190. Disponible en: <https://hidrobiologica.izt.uam.mx/index.php/revHidro/article/view/577>
- Chen, I-T., Aoki, T., Huang, Y-T., Hirono, I., Chen, T-C., Huang, J-Y., Chang, G-D., Lo, C-F. y Wang, H-C. (2011). White Spot Syndrome Virus Induces Metabolic Changes Resembling the Warburg Effect in Shrimp Hemocytes in the Early Stage of Infection. *Journal of Virology*, 85(24): 12919-12928. doi: 10.1128/jvi.05385-11
- Chen, JQ., Haws, MC., Fong, QSW. y Leung, P. (2017a). Economic feasibility of producing oysters using a small-scale Hawaiian fishpond model. *Aquaculture Reports*, 5: 41-51. doi: 10.1016/j.aqrep.2016.12.001
- Chen, W-Y., Ng, TH., Wu, J-H., Chen, J-W. y Wang, H-C. (2017b). Microbiome Dynamics in a Shrimp Grow-out Pond with Possible Outbreak of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease. *Scientific Reports*, 7(1): 9395. doi: 10.1038/s41598-017-09923-6
- Cheng, ZJ. y Hardy, RW. (2004). Protein and lipid sources affect cholesterol concentrations of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Journal of Animal Science*, 82(4): 1136-1145. doi: 10.2527/2004.8241136x
- Chopin, T., Buschmann, AH., Halling, C., Troell, M., Kautsky, N., Neori, A., Kraemer, GP., Zertuche-González, JA., Yarish, C. y Neefus, C. (2001). Integrating seaweeds into marine

- aquaculture systems: A key toward sustainability. *Journal of Phycology*, 37(6): 975-986. doi: 10.1046/j.1529-8817.2001.01137.x
- Chopin, T., Cooper, J.A., Reid, G.K., Cross, S. y Moore, C. (2012). Open-water integrated multi-trophic aquaculture: Environmental biomitigation and economic diversification of fed aquaculture by extractive aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 4(4): 209-220. doi: 10.1111/j.1753-5131.2012.01074.x
- Chopin, T., Troell, M., Reid, G.K., Knowler, D., Robinson, S., Neori, A., Buschmann, A.H., Pang, S.J. y Fang, J. (2010). Integrated Multi-Trophic Aquaculture. *Global Aquaculture Advocate*, (September/October): 38-39. doi: 10.1787/9789264088726-15-en
- Chotigeat, W., Tongsupa, S., Supamataya, K. y Phongdara, A. (2004). Effect of Fucoïdan on Disease Resistance of Black Tiger Shrimp. *Aquaculture*, 233(1-4): 23-30. doi: 10.1016/j.aquaculture.2003.09.025
- Citarasu, T., Sivaram, V., Immanuel, G., Rout, N. y Murugan, V. (2006). Influence of selected Indian immunostimulant herbs against white spot syndrome virus (WSSV) infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* with reference to haematological, biochemical and immunological changes. *Fish and Shellfish Immunology*, 21(4): 372-384. doi: 10.1016/j.fsi.2006.01.002
- Clerissi, C., de Lorgeril, J., Petton, B., Lucasson, A., Escoubas, J-M., Gueguen, Y., Mitta, G. y Toulza, E. (2018). Diversity and stability of microbiota are key factors associated to healthy and diseased *Crassostrea gigas* oysters. *bioRxiv*, 378125. doi: 10.1101/378125
- CONAPESCA. (2013). Anuario Estadístico de Acuicultura y pesca 2013. ISBN: 9788578110796. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
- CONAPESCA. (2017). Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2017
- Cornejo-Granados, F., Gallardo-Becerra, L., Leonardo-Reza, M., Ochoa-Romo, J.P. y Ochoa-Leyva, A. (2018). A meta-analysis reveals the environmental and host factors shaping the structure and function of the shrimp microbiota. *PeerJ*, 6: e5382. doi: 10.7717/peerj.5382
- Cruz-Suárez, L.E., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Guajardo-Barbosa, C. y Ricque-Marie, D. (2009). Comparison of *Ulva clathrata* and the kelps *Macrocystis pyrifera* and *Ascophyllum nodosum* as ingredients in shrimp feeds. *Aquaculture Nutrition*, 15(4): 421-430. doi: 10.1111/j.1365-2095.2008.00607.x
- Cruz-Suárez, L.E., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G. y Ricque-Marie, D. (2008). A Review of the Effects of Macroalgae in Shrimp Feeds and in Co-Culture. En: Cruz Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG, Villarreal-Cavazos DA, Lazo JP, Vians MT (eds) Avances en Nutrición Acuicola IX. IX Simposio Internacional de Nutrición Acuicola Nuevo León, México, pp 304-333
- Cruz, P.S., Andalecio, M.N., Bolivar, R.B. y Fitzsimmons, K. (2008). Tilapia-Shrimp Polyculture in Negros Island, Philippines: A Review. *Journal of the World Aquaculture Society*, 39(6): 713-725. doi: 10.1111/j.1749-7345.2008.00207.x
- Cuzon, G., Lawrence, A., Gaxiola, G., Rosas, C. y Guillaume, J. (2004). Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture*, 235(1-4): 513-551. doi: 10.1016/j.aquaculture.2003.12.022
- Da Silva, K.R., Wasielesky, W. y Abreu, P.C. (2013). Nitrogen and Phosphorus Dynamics in the Biofloc Production of the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 44(1): 30-41. doi: 10.1111/jwas.12009

- Dai, W., Sheng, Z., Chen, J. y Xiong, J. (2020). Shrimp disease progression increases the gut bacterial network complexity and abundances of keystone taxa. *Aquaculture*, 517: 734802. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734802
- Dai, W., Yu, W., Zhang, J., Zhu, J., Tao, Z. y Xiong, J. (2017). The gut eukaryotic microbiota influences the growth performance among cohabitating shrimp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(16): 6447-6457. doi: 10.1007/s00253-017-8388-0
- Dai, WF., Zhang, JJ., Qiu, QF., Chen, J., Yang, W., Ni, S. y Xiong, JB. (2018). Starvation stress affects the interplay among shrimp gut microbiota, digestion and immune activities. *Fish and Shellfish Immunology*, 80: 191-199. doi: 10.1016/j.fsi.2018.05.040
- de Oliveira, MN., Ponte Freitas, AL., Urano Carvalho, AF., Tavares Sampaio, TM., Farias, DF., Alves Teixeira, DI., Gouveia, ST., Pereira, JG. y de Castro Catanho de Sena, MM. (2009). Nutritive and non-nutritive attributes of washed-up seaweeds from the coast of Ceará , Brazil. *Food Chemistry*, 115: 254-259. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.12.004
- Declarador, RS., Serrano, AE. y Corre, VL. (2014). Ulvan extract acts as immunostimulant against white spot syndrome virus (WSSV) in juvenile black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *AACL Bioflux*, 7(3): 153-161
- Demain, AL. y Adrio, JL. (2012). Essential role of genetics in the advancement of biotechnology. En: *Microbial Carotenoids From Fungi. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Vol 898p 294
- Deslous-Paoli, J-M., Lannou, A., Geairon, P., Bougrier, S., Raillard, O. y Heral, M. (1992). Effects of the feeding behaviour of *Crassostrea gigas* (Bivalve Molluscs) on biosedimentation of natural particulate matter. *Hydrobiologia*, 231: 85-91. doi: 10.1007/BF00006500
- DeWalt, BR., Ramírez Zavala, JR., Noriega, L. y González, RE. (2002). Shrimp Aquaculture , The People and The Environment in Coastal Mexico
- Dhami, NK., Mukherjee, A. y Watkin, ELJ. (2018). Microbial Diversity and Mineralogical-Mechanical Properties of Calcitic Cave Speleothems in Natural and in Vitro Biomineralization Conditions. *Frontiers in Microbiology*, 9(40). doi: 10.3389/fmicb.2018.00040
- Dodd, Q. (2014). Dual-crop of shrimp and sea lettuce sustainable. *Aquac. North Am.* 2
- Dominguez, H. y Loret, EP. (2019). *Ulva lactuca*, A Source of Troubles and Potential Riches. *Marine Drugs*, 17(6): 1-20. doi: 10.3390/md17060357
- Donald, KM., Hawkins, AJS. y Smerdon, GR. (2001). Transcript analysis of the genes encoding aminopeptidase N and alanine aminotransferase , two enzymes involved in protein turnover, in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 128: 459-467
- Duarte, CM., Holmer, M., Olsen, Y., Soto, D., Marbà, N., Guiu, J., Blanck, K. y Karakassis, I. (2009). Will the Oceans Help Feed Humanity ? *Bioscience mag*, 59(11): 967-976
- Dubé, CE., Ky, C-L. y Planes, S. (2019). Microbiome of the Black-Lipped Pearl Oyster *Pinctada margaritifera*, a Multi-Tissue Description With Functional Profiling. *Frontiers in Microbiology*, 10(July). doi: 10.3389/fmicb.2019.01548
- Elizondo-González, R., Quiroz-Guzmán, E., Escobedo-Fregoso, C., Magallón-Servín, P. y Peña-Rodríguez, A. (2018). Use of seaweed *Ulva lactuca* for water bioremediation and as feed additive for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *PeerJ*, 6: e4459. doi: 10.7717/peerj.4459
- Elizondo-González, R., Quiroz-Guzmán, E., Howe, A., Yang, F., Flater, J., Gemin, M., Palacios, E. y Peña-Rodríguez, A. (2020). Changes on the intestinal bacterial community of white shrimp

- Penaeus vannamei* fed with green seaweeds. *Journal of Applied Phycology*. doi: 10.1007/s10811-020-02072-w
- Elizondo-Reyna, E., Medina-González, R., Nieto-López, MG., Ortiz-López, R., Elizondo-González, R., Powell, MS., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, LE. (2016). Consumption of *Ulva clathrata* as a dietary supplement stimulates immune and lipid metabolism genes in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Applied Phycology*, 28(6): 3667-3677. doi: 10.1007/s10811-016-0889-1
- Erlanger, BF., Kokowsky, N. y Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95(2): 271-278. doi: 10.1016/0003-9861(61)90145-X
- Escobedo-Bonilla, C., Audoorn, L., Wille, M., Alday-Sanz, V., Sorgeloos, P., Pensaert, M. y Nauwynck, H. (2006). Standardized white spot syndrome virus (WSSV) inoculation procedures for intramuscular or oral routes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 68: 181-188. doi: 10.3354/dao068181
- Esquer-Miranda, E., Nieves-Soto, M., Rivas-Vega, ME., Miranda-Baeza, A. y Piña-Valdez, P. (2016). Effects of methanolic macroalgae extracts from *Caulerpa sertularioides* and *Ulva lactuca* on *Litopenaeus vannamei* survival in the presence of *Vibrio* bacteria. *Fish and Shellfish Immunology*, 51: 346-350. doi: 10.1016/j.fsi.2016.02.028
- Fan, L., Wang, Z., Chen, M., Qu, Y., Li, J., Zhou, A., Xie, S., Zeng, F. y Zou, J. (2019). Microbiota comparison of Pacific white shrimp intestine and sediment at freshwater and marine cultured environment. *Science of the Total Environment*, 657: 1194-1204. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.12.069
- FAO. (2016). The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. ISBN: 978-92-5-106675-1. doi: 10.5860/CHOICE.50-5350
- FAO. (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018. Meeting the sustainable development goals. , Rome ed. ISBN: 9789251305621. doi: issn 10
- FAO. (2019). FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2017. Rome. ISBN: 9789250099873. doi: 10.1109/BMEI.2010.5639447
- FAO. (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. FAO. ISBN: 978-92-5-132692-3. doi: 10.4060/ca9229en
- FAO. (1978). Aquaculture development in Mexico. Report of a review mission
- FAO. (2013). Social and economic dimensions of carrageenan seaweed farming Social and economic dimensions of carrageenan seaweed farming. ISBN: 9789251077467. doi: 10.1080/13657305.2015.1024348
- FAO. (2015). Ressources aquacoles. In: FAO Fish. Aquac. Dep. Disponible en: <http://www.fao.org/fishery/resources/aquaculture/fr>
- Fast, AW. y Lester, LJ. (2013). Marine shrimp culture: principles and practices. Elsevier ed. ISBN: 0444886060
- Favot, G. (2017). Production and identification of *Ulva* sp. in multitrophic aquaculture in earth ponds. Universidade do Algarve
- Feinman, SG., Martínez, AU., Bowen, JL. y Tlusty, MF. (2017). Fine-scale transition to lower bacterial diversity and altered community composition precedes shell disease in laboratory-reared juvenile American lobster. *Diseases of Aquatic Organisms*, 124(1): 41-54. doi: 10.3354/dao03111

- Felix, N. y Brindo, RA. (2014a). Evaluation of raw and fermented seaweed , *Ulva lactuca* as feed ingredient in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 1(3): 199-204
- Felix, N. y Brindo, RA. (2014b). Substituting fish meal with fermented seaweed, *Kappaphycus alvarezii* in diets of juvenile freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies IJFAS*, 1(15): 261-265 Disponible en: <http://www.fisheriesjournal.com/archives/2014/vol1issue5/PartD/320.pdf>
- Felix, S. y Pradeepa, P. (2012). Lactic Acid Fermentation of Seaweed (*Ulva Reticulata*) for Preparing Marine Single Cell Detritus (MSCD). *Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 8(2): 76-81
- Fenton, GE. y Ritz, DA. (1988). Changes in carbon and hydrogen stable isotope ratios of macroalgae and seagrass during decomposition. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 26(4): 429-436. doi: 10.1016/0272-7714(88)90023-6
- Ferreira, JG., Saurel, C. y Ferreira, JM. (2012). Cultivation of gilthead bream in monoculture and integrated multi-trophic aquaculture. Analysis of production and environmental effects by means of the FARM model. *Aquaculture*, 358-359: 23-34
- FIRA. (2009). Situación Actual y Perspectivas del Camarón en México. , Subdirecci ed.
- Flegel, TW., Lightner, D V., Lo, CF. y Owens, L. (2008). Shrimp Disease Control : Past , Present and Future. *Diseases in Asian Aquaculture*, VI: 355-378
- Fleurence, J., Morançais, M., Dumay, J., Decottignies, P., Turpin, V., Munier, M., Garcia-Bueno, N. y Jaouen, P. (2012). What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture ? *Trends in Food Science & Technology*, 27: 57-61. doi: 10.1016/j.tifs.2012.03.004
- Flint, HJ., Scott, KP., Duncan, SH., Louis, P. y Forano, E. (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes*, 3(4). doi: 10.4161/gmic.19897
- Fox, J. y Treece, GD. (2001). Nutricion y manejo del alimento. *Métodos para mejorar la camaricultura en Centroamérica*, : 65-90
- Freile-pelegrin, Y. y Morales, JL. (2004). Antibacterial activity in marine algae from the coast of Yucatan , Mexico. *New York*, 47(February 2001): 140-146
- Fry, B. (2006). Stable Isotope Ecology. Springer ed. New York. ISBN: 9788578110796. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
- Gamboa-Delgado, J. y Le Vay, L. (2009). Natural stable isotopes as indicators of the relative contribution of soy protein and fish meal to tissue growth in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed compound diets. *Aquaculture*, 291(1-2): 115-123. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.03.012
- Gamboa-Delgado, J., Molina-Poveda, C. y Cahu, C. (2003). Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. *Aquaculture Research*, 34(15): 1403-1411. doi: 10.1111/j.1365-2109.2003.00959.x
- Gamboa-Delgado, J., Peña-Rodríguez, A., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, LE. (2011). Assessment of Nutrient Allocation and Metabolic Turnover Rate in Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* Co-Fed Live Macroalgae *Ulva clathrata* and Inert Feed: Dual Stable Isotope Analysis. *Journal of Shellfish Research*, 30(3): 969-978. doi: 10.2983/035.030.0340
- Ganesan, AR., Tiwari, U. y Rajauria, G. (2019). Seaweed nutraceuticals and their therapeutic role in disease prevention. *Food Science and Human Wellness*, 8(3): 252-263. doi:

10.1016/j.fshw.2019.08.001

- García-Robledo, E., Corzo, A. y Papaspyrou, S. (2014). A fast and direct spectrophotometric method for the sequential determination of nitrate and nitrite at low concentrations in small volumes. *Marine Chemistry*, 162: 30-36. doi: 10.1016/j.marchem.2014.03.002
- Ge, H., Ni, Q., Chen, Z., Li, J. y Zhao, F. (2019). Effects of short period feeding polysaccharides from marine macroalga, *Ulva prolifera* on growth and resistance of *Litopenaeus vannamei* against *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Journal of Applied Phycology*, 31(3): 2085-2092. doi: 10.1007/s10811-018-1663-3
- Gómez Ríos, DA. (2015). Technical and economic feasibility of a plant process for production of chitosan from shrimp shells in Colombia. University of Antioquia
- González-Félix, ML., Lawrence, AL., Gatlin, DM. y Perez-Velazquez, M. (2003). Nutritional evaluation of fatty acids for the open thelycum shrimp, *Litopenaeus vannamei*: I. Effect of dietary linoleic and linolenic acids at different concentrations and ratios on juvenile shrimp growth, survival and fatty acid composition. *Aquaculture Nutrition*, 9(2): 105-113. doi: 10.1046/j.1365-2095.2003.00231.x
- González, J. (1987). Las algas de Mexico. *Ciencias Marinas* 1-10
- Goodwin, DH., Gillikin, DP. y Roopnarine, PD. (2013). Preliminary evaluation of potential stable isotope and trace element productivity proxies in the oyster *Crassostrea gigas*. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 373: 88-97. doi: 10.1016/j.palaeo.2012.03.034
- Green-Gavrielidis, L., MacKechnie, F., Thornber, C. y Gomez-Chiarri, M. (2018). Bloom-forming macroalgae (*Ulva* spp.) inhibit the growth of co-occurring macroalgae and decrease eastern oyster larval survival. *Marine Ecology Progress Series*, 595: 27-37. doi: 10.3354/meps12556
- Green, TJ. y Barnes, AC. (2010). Bacterial diversity of the digestive gland of Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* infected with the paramyxean parasite, *Marteilia sydneyi*. *Journal of Applied Microbiology*, 109: 613-622. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04687.x
- Guillard, RR. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: Culture of marine invertebrate animals, Springer ed. Boston, MA, pp 29-60
- Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P. y Métailler, R. (1999). Nutrition et alimentation des poissons et crustacés. , INRA-IFREM ed.
- Guiry, MDR. (2016). The Seaweed Site : information on marine macroalgae. 5129836
- Guo, C., Liu, D., Wu, Y., Yang, X., Yang, L., Mi, S., Huang, Y., Luo, Y., Jia, K., Liu, Z. y Chen, W. (2011). Entry of Tiger Frog Virus (an Iridovirus) into HepG2 Cells via a pH-Dependent , Atypical , Caveola-Mediated Endocytosis Pathway. *Journal of Virology*, 85(13): 6416-6426. doi: 10.1128/JVI.01500-10
- Hardy, RW. (2006). Worldwide Fish Meal Production Outlook and the Use of Alternative Protein Meals for Aquaculture. En: Cruz Suárez LE, Ricque Marie D, Salazar MT, Nieto López MG, Villarreal Cavazos DA, Puello Cruz AC, García Ortega A (eds) Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Nuevo León, México, pp 410-419
- Harel, M., Clayton, D. y Bullis, RA. (2007). Feed formulation for terrestrial and aquatic animals. US20070082008A1
- Hatje, V., de Souza, MM., Ribeiro, LF., Eça, GF. y Barros, F. (2016). Detection of environmental impacts of shrimp farming through multiple lines of evidence. *Environmental Pollution*, 219: 672-684. doi: 10.1016/j.envpol.2016.06.056

- Helm, MM. (2005). Cultured Aquatic Species Information Programme. *Crassostrea gigas*. In: FAO Fish. Aquac. Dep. Disponible en: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/en. [consulta: 10 junio 2018]
- Hesslein, RH., Hallard, KA. y Ramlal, P. (1993). Replacement of Sulfur, Carbon, and Nitrogen in Tissue of Growing Broad Whitefish (*Coregonus nasus*) in Response to a Change in Diet Traced by ^{34}S , ^{13}C , and ^{15}N . *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50: 2071-2076
- Hidalgo, MC., Urea, E. y Sanz, A. (1999). Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*, 267-283. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00413-X
- Hopkins, JS., Hamilton, RD., Sandier, PA., Browdy, CL. y Stokes, AD. (1993). Effect of Water Exchange Rate on Production, Water Quality, Effluent Characteristics and Nitrogen Budgets of Intensive Shrimp Ponds. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24(3): 304-320. doi: 10.1111/j.1749-7345.1993.tb00162.x
- Hoseinifar, SH., Sun, YZ. y Caipang, CM. (2017). Short-chain fatty acids as feed supplements for sustainable aquaculture: an updated view. *Aquaculture Research*, 48(4): 1380-1391. doi: 10.1111/are.13239
- Hou, X., Hansen, JH. y Bjerre, AB. (2015). Integrated bioethanol and protein production from brown seaweed *Laminaria digitata*. *Bioresource Technology*, 197: 310-317. doi: 10.1016/j.biortech.2015.08.091
- Huang, F., Pan, L., Song, M., Tian, C. y Gao, S. (2018). Microbiota assemblages of water, sediment, and intestine and their associations with environmental factors and shrimp physiological health. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(19): 8585-8598. doi: 10.1007/s00253-018-9229-5
- Huang, HT., Chan, HL., Shih, TY. y Chen, LL. (2015). A study of the role of glucose transporter 1 (Glut1) in white spot syndrome virus (WSSV) infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 46(2): 305-314. doi: 10.1016/j.fsi.2015.06.034
- Huang, X., Zhou, H. y Zhang, H. (2006). The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 20: 750-757. doi: 10.1016/j.fsi.2005.09.008
- Huang, Z., Kang, S., Leu, J. y Chen, L. (2013). Fish & Shell fish Immunology Endocytic pathway is indicated for white spot syndrome virus (WSSV) entry in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, (June): 1-9. doi: 10.1016/j.fsi.2013.05.028
- Huvet, A., Daniel, J-Y., Quéré, C., Dubois, S., Prudence, M., Van Wormhoudt, A., Sellos, D., Samain, J-F. y Moal, J. (2003). Tissue expression of two α -amylase genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Effects of two different food rations. *Aquaculture*, 228: 321-333. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00323-5
- Immanuel, G. y Palavesam, A. (2001). Effects of feeding lipid enriched *Artemia nauplii* on survival, growth, fatty acids and stress resistance of postlarvae *Penaeus indicus*. *Asian Fisheries*, 14: 377-388. Disponible en: http://www.asianfisheriessociety.org/modules/library/singlefile.php?com_mode=nest&com_order=1&lid=92&cid=15
- Immanuel, G., Sivagnanavelmurugan, M., Balasubramanian, V. y Palavesam, A. (2012). Sodium alginate from *Sargassum wightii* retards mortalities in *Penaeus monodon* postlarvae challenged with white spot syndrome virus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 99(3): 187-196.

doi: 10.3354/dao02466

- Jiravanichpaisal, P., Sricharoen, S., Söderhäll, I. y Söderhäll, K. (2006). White spot syndrome virus (WSSV) interaction with crayfish haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 20(5): 718-727. doi: 10.1016/j.fsi.2005.09.002
- Jones, AB., Dennison, WC. y Preston, NP. (2001). Integrated treatment of shrimp effluent by sedimentation, oyster filtration and macroalgal absorption: A laboratory scale study. *Aquaculture*, 193(1-2): 155-178. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00486-5
- Jones, AB. y Preston, NP. (1999). Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley), filtration of shrimp farm effluent: the effects on water quality. *Aquaculture Research*, 30: 51-57. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00299.x>
- Jones, AB., Preston, NP. y Dennison, WC. (2002). The efficiency and condition of oysters and macroalgae used as biological filters of shrimp pond effluent. *Aquaculture Research*, 33(1): 1-19. doi: 10.1046/j.1355-557X.2001.00637.x
- Juárez, LM. (2007). Shrimp Aquaculture in Mexico. Growing industry built on White shrimp. *Global Aquaculture Advocate*, (July/August): 65-67
- Julliand, S. (2007). Mise en place des systèmes expérimentaux de recherche sur les crevettes dans la nouvelle station de recherche Evialis au Vietnam. AgroParisTech
- Juneta-Nor, AS., Noordin, NM., Azra, MN., Ma, H., Husin, NM. y Ikhwanuddin, M. (2020). Amino acid compounds released by the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* during ecdysis: a factor attracting cannibalistic behaviour. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 21(10): 823-834. doi: 10.1631/jzus.B2000126
- Kang, CK., Choy, EJ., Hur, YB. y Myeong, JI. (2009). Isotopic evidence of particle size-dependent food partitioning in cocultured sea squirt *Halocynthia roretzi* and Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Biology*, 6(1-3): 289-302. doi: 10.3354/ab00126
- Kang, CK., Sauriau, P., Richard, P. y Blanchard, GF. (1999). Food sources of the infaunal suspension-feeding bivalve *Cerastoderma edule* in a muddy sandflat of Marennes-Olqon Bay, as determined by analyses of carbon and nitrogen stable isotopes. *Marine Ecology Progress Series*, 187: 147-158
- Kautsky, N. y Sverker, E. (1987). Role of Biodeposition by *Mytilus edulis* in the Circulation of Matter and Nutrients in a Baltic Coastal Ecosystem. *Marine Ecology Progress Series*, 38(3): 201-2012
- Kellogg, ML., Smyth, AR., Luckenbach, MW., Carmichael, RH., Brown, BL., Cornwell, JC., Piehler, MF., Owens, MS., Dalrymple, DJ. y Higgins, CB. (2014). Use of oysters to mitigate eutrophication in coastal waters. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 151: 156-168. doi: 10.1016/j.ecss.2014.09.025
- Kitikiew, S., Chen, JC., Putra, DF., Lin, YC., Yeh, ST. y Liou, CH. (2013). Fucoïdan effectively provokes the innate immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against experimental *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 34(1): 280-290. doi: 10.1016/j.fsi.2012.11.016
- Koch, H., Freese, HM., Hahnke, RL., Simon, M. y Wietz, M. (2019). Adaptations of *Alteromonas* sp. 76-1 to polysaccharide degradation: A CAzyme plasmid for ulvan degradation and two alginolytic systems. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAR): 1-12. doi: 10.3389/fmicb.2019.00504
- Koroleff, F. (1969). Direct determination of ammonia in natural waters as Indophenol Blue. *International Council for the Exploration of the Sea*, 9: 152-155

- Koussoroplis, AM., Schwarzenberger, A. y Wacker, A. (2017). Diet quality determines lipase gene expression & lipase/esterase activity in *Daphnia pulex*. *Biology Open*, 6(2): 210-216. doi: 10.1242/bio.022046
- Kozich, JJ., Westcott, SL., Baxter, NT., Highlander, SK. y Schloss, PD. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17): 5112-5120. doi: 10.1128/AEM.01043-13
- Krummenauer, D., Peixoto, S., Cavalli, RO., Poersch, LH. y Wasielesky, W. (2011). Superintensive culture of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in a biofloc technology system in Southern Brazil at different stocking densities. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42(5): 726-733. doi: 10.1111/j.1749-7345.2011.00507.x
- Kumar, V., Roy, S., Meena, DK. y Sarkar, UK. (2016). Application of Probiotics in Shrimp Aquaculture: Importance, Mechanisms of Action, and Methods of Administration. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 24(4): 342-368. doi: 10.1080/23308249.2016.1193841
- Kumara, KRPS. y Hettiarachchi, M. (2017). White faeces syndrome caused by *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio fluvialis* in shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius 1798)-multimodal strategy to control the syndrome in Sri Lankan grow-out ponds. *Asian Fisheries Science*, 30(4): 245-261
- Kungvankij, P. y Chua, TE. (1986). Shrimp culture: pond designm operation and management
- Kunitz, M. (1947). Crystalline Soybean Trypsin Inhibitor: li. General Properties. *The Journal of General Physiology*, 30(4): 291-310. doi: 10.1085/jgp.30.4.291
- La Macchia Pedra, AG., Ramlov, F., Maraschin, M. y Hayashi, L. (2017). Cultivation of the red seaweed *Kappaphycus alvarezii* with effluents from shrimp cultivation and brown seaweed extract: Effects on growth and secondary metabolism. *Aquaculture*, 479: 297-303. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.06.005
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gélébart, F., Cordevant, C., Lange, M. y Poulet, SA. (2001). A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Diseases of Aquatic Organisms*, 46(2): 139-145. doi: 10.3354/dao046139
- Lan, CC. y Pan, BS. (1993). In-vitro digestibility simulating the proteolysis of feed protein in the midgut gland of grass shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 109(1): 59-70. doi: 10.1016/0044-8486(93)90486-I
- Langille, MGI., Zaneveld, J., Caporaso, JG., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J., Clemente, JC., Burkepille, DE., Vega Thurber, R., Knight, R., Beiko, RG. y Huttenhower, C. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 8: 1-10
- Laurence, E. (2010). Probiotic Application in a Shrimp Hatchery. In: Mtunzini Prawns of South Africa
- Lawrence, DR. y Scott, GI. (1982). The determination and use of condition index of oysters. *Estuaries*, 5(1): 23-27. doi: 10.2307/1352213
- Le François, NR., Jobling, M. y Carter, C. (2010). Finfish aquaculture diversification. CABI, Wallingford. ISBN: 9781845934941. doi: 10.1079/9781845934941.0000
- Le Moullac, G. (1995). Adaptation des enzymes digestives à l'alimentation chez la crevette *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). Ecole Pratique des Hautes Etudes
- Le Roux, F., Wegner, KM. y Polz, MF. (2016). Oysters and Vibrios as a Model for Disease

- Dynamics in Wild Animals. *Trends in Microbiology*, 24(7): 568-580. doi: 10.1016/j.tim.2016.03.006
- Le Vay, L. y Gamboa-Delgado, J. (2011). Naturally-occurring stable isotopes as direct measures of larval feeding efficiency, nutrient incorporation and turnover. *Aquaculture*, 315: 95-103. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.03.033
- Li, E., Chen, L., Zeng, C., Yu, N., Xiong, Z., Chen, X. y Qin, JG. (2008). Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. *Aquaculture*, 274(1): 80-86. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.11.001
- Liao, Y., Cai, C., Yang, C., Zheng, Z., Wang, Q., Du, X. y Deng, Y. (2020). Effect of protein sources in formulated diets on the growth, immune response, and intestinal microflora of pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. *Aquaculture Reports*, 16(August 2019): 100253. doi: 10.1016/j.aqrep.2019.100253
- Liu, A., Mazumder, D., Dove, MC., Lai, TS., Crawford, J. y Sammut, J. (2016). Stable Isotope Analysis of the Contribution of Microalgal Diets to the Growth and Survival of Pacific Oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1979) Larvae. *Journal of Shellfish Research*, 35(1): 63-69. doi: 10.2983/035.035.0108
- Liu, D., Amy, P. y Sun, J. (2004). Preliminary study on the responses of three marine algae, *Ulva pertusa* (Chlorophyta), *Gelidium amansii* (Rhodophyta) and *Sargassum enerve* (Phaeophyta), to nitrogen source and its availability. *Journal of Ocean University of China*, 3(1): 75-79. doi: 10.1007/s11802-004-0013-z
- Liu, W., Li, Q., Gao, F. y Kong, L. (2010). Effect of starvation on biochemical composition and gametogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fisheries science*, 76: 737-745. doi: 10.1007/s12562-010-0274-y
- Liu, X., Xu, H., Wang, X., Wu, Z. y Bao, X. (2014). An ecological engineering pond aquaculture recirculating system for effluent purification and water quality control. *Clean - Soil, Air, Water*, 42(3): 221-228. doi: 10.1002/clen.201200567
- Loosanoff, VL. (1949). On the food selectivity of oysters. *Science*, 110(2848): 122
- MacAvoy, SE., Macko, SA. y Arneson, LS. (2005). Growth versus metabolic tissue replacement in mouse tissues determined by stable carbon and nitrogen isotope analysis. *Canadian Journal of Zoology*, 83(5): 631-641. doi: 10.1139/z05-038
- Macleod, LD. y Smedley-Maclean, I. (1938). The carbohydrate and fat metabolism of yeast: The synthesis of fat from acetic acid: the influence of metallic ions on carbohydrate and fat storage. *The Biochemical journal*, 32(9): 1571-82. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1264224&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Maftuch., Toban, MH. y Risjani, Y. (2012). Administration of marine algae (*Gracilaria verrucosa*) immunostimulant enhances some innate immune parameters in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricus) against *Vibrio harveyi* infection. *Journal of Applied Sciences Research*, 8(2): 1052-1058. Disponible en: <http://www.aensiweb.com/jasr/jasr/2012/1052-1058.pdf>
- Malham, SK., Cotter, E., O'Keeffe, S., Lynch, S., Culloty, SC., King, JW., Latchford, JW. y Beaumont, AR. (2009). Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: The influence of temperature and nutrients on health and survival. *Aquaculture*, 287(1-2): 128-138. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.10.006

- Manilal, A., Sujith, S., Selvin, J. y Kiran, G. (2009). In vivo Antiviral Activity of Polysaccharide from the Indian Green Alga, *Acrosiphonia orientalis* (J. Agardh): Potential Implication in Shrimp Disease Management. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 1(4): 278-282 Disponible en: [http://idosi.org/wjfds/wjfds1\(4\)09/5.pdf](http://idosi.org/wjfds/wjfds1(4)09/5.pdf)
- Manson, MD. (1992). Bacterial Motility and Chemotaxis. *Advances in Microbial Physiology*, 33: 277-346. doi: 10.1016/S0065-2911(08)60219-2
- Marín Leal, JC., Dubois, S., Orvain, F., Galois, R., Blin, JL., Ropert, M., Bataillé, MP., Ourry, A. y Lefebvre, S. (2008). Stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) and modelling as tools to estimate the trophic ecology of cultivated oysters in two contrasting environments. *Marine Biology*, 153(4): 673-688. doi: 10.1007/s00227-007-0841-7
- Maroux, S., Louvard, D. y Barath, J. (1973). The aminopeptidase from hog intestinal brush border. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 321(1): 282-295. doi: 10.1016/0005-2744(73)90083-1
- Marsham, S., Scott, GW. y Tobin, ML. (2007). Comparison of nutritive chemistry of a range of temperate seaweeds. *Food Chemistry*, 100: 1331-1336. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.11.029
- Martínez-Antonio, EM., Racotta, IS., Ruvalcaba-Márquez, JC. y Magallón-Barajas, F. (2019). Modulation of stress response and productive performance of *Litopenaeus vannamei* through diet. *PeerJ*, 7: e6850. doi: 10.7717/peerj.6850
- Martínez-Córdova, LR. y Martínez-Porchas, M. (2006). Polyculture of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, giant oyster, *Crassostrea gigas* and black clam, *Chione fluctifraga* in ponds in Sonora, Mexico. *Aquaculture*, 258(1-4): 321-326. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.03.026
- Martínez-Córdova, LR., Porchas, MM. y Cortés-Jacinto, E. (2009). Camaronicultura mexicana y mundial: ¿Actividad sustentable o industria contaminante? *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 25(3): 181-196. doi: 181-196
- Martínez-García, M., Brazel, DM., Swan, BK., Arnosti, C., Chain, PSG., Reitenga, KG., Xie, G., Poulton, NJ., Gomez, ML., Masland, DED., Thompson, B., Bellows, WK., Ziervogel, K., Lo, CC., Ahmed, S., Gleasner, CD., Detter, CJ. y Stepanauskas, R. (2012). Capturing single cell genomes of active polysaccharide degraders: An unexpected contribution of verrucomicrobia. *PLoS ONE*, 7(4): 1-11. doi: 10.1371/journal.pone.0035314
- Martínez del Río, C. y Wolf, BO. (2005). Mass-balance models for animal isotopic ecology. *Physiological and ecological adaptations to feeding in vertebrates*, : 141-174
- McHugh, J. (2002). Perspectivas para la producción de algas marinas en los países en desarrollo. *FAO Circular de Pesca*, 968
- Méndez-Martínez, Y., García-Guerrero, MU., Lora-Vilchis, MC., Martínez-Córdova, LR., Arcos-Ortega, FG., Alpuche, JJ. y Cortés-Jacinto, E. (2018). Nutritional effect of *Artemia nauplii* enriched with *Tetraselmis suecica* and *Chaetoceros calcitrans* microalgae on growth and survival on the river prawn *Macrobrachium americanum* larvae. *Aquaculture International*, 26(4): 1001-1015. doi: 10.1007/s10499-018-0264-0
- Mendoza-Cano, F. y Sánchez-Paz, A. (2013). Development and validation of a quantitative real-time polymerase chain assay for universal detection of the White Spot Syndrome Virus in marine crustaceans. *Virology Journal*, 10(1): 186. doi: 10.1186/1743-422X-10-186
- Miossec, L., Le Deuff, R-M. y Gouilletquer, P. (2009). Alien Species Alert: *Crassostrea gigas*

(Pacific oyster) ISBN: 9788774820697

- Morita, K. y Nakano, T. (2002). Seaweed Accelerates the Excretion of Dioxin Stored in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 910-917
- Murphy, AE., Kolkmeier, R., Song, B., Anderson, IC. y Bowen, J. (2019). Bioreactivity and Microbiome of Biodeposits from Filter-Feeding Bivalves. *Microbial Ecology*, 77(2): 343-357. doi: 10.1007/s00248-018-01312-4
- Murphy, J. y Riley, JP. (1962). Architecture, Materiality and Society: Connecting Sociology of Architecture with Science and Technology Studies. *Analytica Chimica Acta*, 27: 31-36. doi: 10.1057/9781137461131
- Naylor, RL. y Burke, M. (2005). Aquaculture and Ocean Resources: Raising Tigers of the Sea. *Annual Review of Environment and Resources*, 30: 185-218. doi: 10.1146/annurev.energy.30.081804.121034
- Naylor, RL., Goldburg, RJ., Primavera, JH., Kautsky, N., Beveridge, MCM., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H. y Troell, M. (2000). Effect of aquaculture on world fish supply. *Nature*, 405: 1017-1024
- Neori, A., Chopin, T., Troell, M., Buschmann, AH., Kraemer, GP., Halling, C., Shpigel, M. y Yarish, C. (2004). Integrated aquaculture: Rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture*, 231(1-4): 361-391. doi: 10.1016/j.aquaculture.2003.11.015
- Niu, J., Xie, JJ., Guo, TY., Fang, HH., Zhang, YM., Liao, SY., Xie, SW., Liu, YJ. y Tian, LX. (2019). Comparison and evaluation of four species of macro-algae as dietary ingredients in *Litopenaeus vannamei* under normal rearing and WSSV challenge conditions: Effect on growth, immune response, and intestinal Microbiota. *Frontiers in Physiology*, 10(JAN): 1-15. doi: 10.3389/fphys.2018.01880
- Nolasco-Soria, H., Moyano-López, F., Vega-Villasante, F., del Monte-Martínez, A., Espinosa-Chaurand, D., Gisbert, E. y Nolasco-Alzaga, HR. (2018). Lipase and Phospholipase Activity Methods for Marine. En: *Methods in Molecular Biology*, Georgina S ed. New York, pp 139-167
- Oboh, G., Akindahunsi, AA. y Oshodi, AA. (2002). Nutrient and anti-nutrient contents of *Aspergillus niger*-fermented cassava products (flour and gari). *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(5): 617-622. doi: 10.1016/S0889-1575(02)91065-3
- Ochoa-Álvarez, NA., Casillas-Hernández, R., Magallón-Barajas, FJ., Ramírez-Orozco, JM. y Carbajal-Millán, E. (2021). Protector effect of beta-glucans from shrimp pond-related yeasts in *Penaeus vannamei* rearing under white spot syndrome virus presence. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 49(1): 18-28. doi: 10.3856/vol49-issue1-fulltext-2514
- Ogawa, J., Kishino, S., Ando, A. y Sugimoto, S. (2005). Production of Conjugated Fatty Acids by Lactic Acid Bacteria. 100(4): 355-364. doi: 10.1263/jbb.100.355
- Ogello, EO., Munguti, JM., Sakakura, Y. y Hagiwara, A. (2014). Complete Replacement of Fish Meal in the Diet of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Grow-out with Alternative Protein Sources. A review. *International Journal of Advanced Research*, 2(8): 962-978. Disponible en: https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/37156740/IJAR_Ogello_et_al._2014.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1527743639&Signature=QzuU1Uwyv66xqop6h6Ky7fS8oP8%3D&response-content-disposition=inline%3Bfilename%3DComplete_Replacement_of
- Olenina, I., Hajdu, S., Edler, L., Wasmund, N., Busch, S., Göbel, J., Gromisz, S., Huseby, S.,

- Huttunen, M., Jaanus, A., Kokkonen, P., Ledaine, I. y Niemkiewicz, E. (2006). Biovolumes and size-classes of phytoplankton in the Baltic Sea. Baltic Marine Environment Protection Commission - Helsinki Commission. ISBN: 0357-2994. doi: HELCOM Balt.Sea Environ. Proc. No. 106, 144pp.
- Omont, A., Quiroz-Guzman, E., Tovar-Ramirez, D. y Peña-Rodríguez, A. (2019). Effect of diets supplemented with different seaweed extracts on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Applied Phycology*, 31(2): 1433-1442. doi: 10.1007/s10811-018-1628-6
- Oostlander, PC., van Houcke, J., Wijffels, RH. y Barbosa, MJ. (2020). Microalgae production cost in aquaculture hatcheries. *Aquaculture*, 525 (April): 735310. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735310
- Orban, E., Di Lena, G., Masci, M., Nevigato, T., Casini, I., Caproni, R., Gambelli, L. y Pellizzato, M. (2004). Growth, nutritional quality and safety of oysters (*Crassostrea gigas*) cultured in the lagoon of Venice (Italy). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(14): 1929-1938. doi: 10.1002/jsfa.1896
- Ortiz, J., Romero, N., Robert, P., Araya, J., Lopez-Hernández, J., Bozzo, C., Navarrete, E., Osorio, A. y Rios, A. (2006). Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. *Food Chemistry*, 99(1): 98-104. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.07.027
- Ostroumov, SA. (2005). Suspension-feeders as factors influencing water quality in aquatic ecosystems. En: Dame RF, Olenin S (eds) *The Comparative Roles of Suspension-Feeders in Ecosystems*, Springer ed. Dordrecht, The Netherlands, pp 147-164
- Otoshi, CA., Arce, SM. y Moss, SM. (2003). Growth and reproductive performance of broodstock shrimp reared in a biosecure recirculating aquaculture system versus a flow-through pond. *Aquacultural Engineering*, 29(3-4): 93-107. doi: 10.1016/S0144-8609(03)00048-7
- Ottinger, M., Clauss, K. y Kuenzer, C. (2016). Aquaculture: Relevance, distribution, impacts and spatial assessments - A review. *Ocean and Coastal Management*, 119: 244-266. doi: 10.1016/j.ocecoaman.2015.10.015
- Páez-Osuna, F. (2001). The environmental impact of shrimp aquaculture: Causes, effects, and mitigating alternatives. *Environmental Management*, 28(1): 131-140. doi: 10.1007/s002670010212
- Páez-Osuna, F., Guerrero-Galván, SR., Ruiz-Fernández, AC. y Espinoza-Angulo, R. (1997). Fluxes and mass balances of nutrients in a semi-intensive shrimp farm in north-western Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 34(5): 290-297. doi: 10.1016/S0025-326X(96)00133-6
- Pallaoro, MF., do Nascimento Vieira, F. y Hayashi, L. (2016). *Ulva lactuca* (*Chlorophyta Ulvales*) as co-feed for Pacific white shrimp. *Journal of Applied Phycology*, 28(6): 3659-3665. doi: 10.1007/s10811-016-0843-2
- Pang, SJ., Xiao, T. y Bao, Y. (2006). Dynamic changes of total bacteria and *Vibrio* in an integrated seaweed-abalone culture system. *Aquaculture*, 252: 289-297. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.06.050
- Pangestuti, R. y Kim, S. (2015). Seaweed proteins, peptides, and amino acids. En: Tiwari BK, Declan JT (eds) *Seaweed Sustainability*, Academic P ed. Elsevier Inc., pp 125-140
- Parks, DH., Tyson, GW., Hugenholtz, P. y Beiko, RG. (2014). STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*, 30(21): 3123-3124. doi:

10.1093/bioinformatics/btu494

- Paul, NA., Tseng, CK. y Borowitzka, M. (2012). Seaweed and Microalgae. En: John S. Lucas PCS (ed) *Aquaculture: Farming Aquatic Animals and Plants*, Second Edition Blackwell Publishing Lt., p 618
- Peña-Rodríguez, A., León, A., Moll, B., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, MG., Villarreal-Cavazos, D., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, LE. (2010). Uso de *Ulva clathrata* en la nutrición del camarón blanco: revisión. En: *Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del X Simposio Internacional de Nutrición Acuicola* San Nicolás de los Garza, N. L., México, pp 700-712
- Peña-Rodríguez, A., Magallón-Barajas, FJ., Cruz-Suárez, LE., Elizondo-González, R. y Moll, B. (2017). Effects of stocking density on the performance of brown shrimp *Farfantepenaeus californiensis* co-cultured with the green seaweed *Ulva clathrata*. *Aquaculture Research*, 48(6): 2803-2811. doi: 10.1111/are.13114
- Peña-Rodríguez, A., Mawhinney, TP., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, LE. (2011). Chemical composition of cultivated seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh. *Food Chemistry*, 129(2): 491-498. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.04.104
- Peña Rodríguez, A., Morales Alvarado, G., Elizondo González, R., Mendoza Carrión, G., Tovar Ramírez, D. y Escobedo-fregoso, C. (2020). Seaweed single cell detritus effects on the digestive enzymes activity and microbiota of the oyster *Crassostrea gigas*. *J Appl Phycol*. doi: 10.1007/s10811-020-02167-4
- Pereira, FC. y Berry, D. (2017). Microbial nutrient niches in the gut. *Environmental Microbiology*, 19(4): 1366-1378. doi: 10.1111/1462-2920.13659
- Pereira, H., Barreira, L., Figueiredo, F., Custódio, L., Vizetto-Duarte, C., Polo, C., Rešek, E., Aschwin, E. y Varela, J. (2012). Polyunsaturated fatty acids of marine macroalgae: Potential for nutritional and pharmaceutical applications. *Marine Drugs*, 10(9): 1920-1935. doi: 10.3390/md10091920
- Pérez Camacho, A., Salinas, JM., Delgado, M. y Fuertes, C. (2007). Use of single cell detritus (SCD) produced from *Laminaria saccharina* in the feeding of the clam *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 266(1-4): 211-218. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.12.033
- Pérez Camacho, A., Salinas, JM., Fuertes, C. y Delgado, M. (2004). Preparation of single cell detritus from *Laminaria saccharina* as a hatchery diet for bivalve mollusks. *Marine Biotechnology*, 6(6): 642-649. doi: 10.1007/s10126-004-2901-z
- Phillips, DL. y Gregg, JW. (2001). Uncertainty in source partitioning using stable isotopes. *Oecologia*, 127: 171-179. doi: 10.1007/s004420000578
- Pickard, JM., Zeng, MY., Caruso, R. y Núñez, G. (2017). Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunological Reviews*, 279(1): 70-89. doi: 10.1111/imr.12567
- Ponce-Palafox, JT., Ruiz-Luna, A., Castillo-Vargasmachuca, S., García-Ulloa, M. y Arredondo-Figueroa, JL. (2011). Technical, economics and environmental analysis of semi-intensive shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farming in Sonora, Sinaloa and Nayarit states, at the east coast of the Gulf of California, México. *Ocean and Coastal Management*, 54(7): 507-513. doi: 10.1016/j.ocecoaman.2011.03.008
- Porchas-Cornejo, MA., Martínez-Córdova, LR., Magallón-Barajas, FJ., Naranjo Páramo, J. y Portillo Clarck, G. (1999). Efecto de la macroalga *Caulerpa sertularioides* en el desarrollo del camarón *Penaeus californiensis* (Decapoda:Peneidae). *Revista de Biología Tropical*, 47(3):

437-442

- Powell, EN., Bochenek, EA., Klinck, JM. y Hofmann, EE. (2002). Influence of food quality and quantity on the growth and development of *Crassostrea gigas* larvae: A modeling approach. *Aquaculture*, 210(1-4): 89-117. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00891-2
- Primavera, JH. (2006). Overcoming the impacts of aquaculture on the coastal zone. *Ocean and Coastal Management*, 49: 531-545. doi: 10.1016/j.ocecoaman.2006.06.018
- Quagrairie, K. (2015). Profitability of Indoor Production of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*): A Case Study of the Indiana Industry. Purdue Ext. EC-797-W:1-7
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. y Glockner, FO. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*
- Radulovich, R., Neori, A., Valderrama, D., Reddy, CRK., Cronin, H. y Forster, J. (2015). Farming of seaweeds. En: *Seaweed Sustainability*. Elsevier, pp 27-59
- Ramos, R., Vinatea, L., Seiffert, W., Beltrame, E., Silva, JS. y Costa, RHR da. (2009). Treatment of shrimp effluent by sedimentation and oyster filtration using *Crassostrea gigas* and *C. rhizophorae*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(3): 775-783. doi: 10.1590/S1516-89132009000300030
- Raposo, D., Oliveira, SR., Afonso, F., Câmara, MR., Fernandes, FO. y Marinho-Soriano, E. (2013). Performance of shrimp *Litopenaeus vannamei* and seaweeds *Gracilaria birdiae* and *Ulva fasciata* in an integrated multi-trophic aquaculture system. En: *European Aquaculture society Trondheim, Norway*, p 3
- Rato, A., Joaquim, S., Tavares, TG., Martins, ZE., Guedes, AC., Pereira, LF., Machado, J., Matias, AM., Gonçalves, JFM., Vaz-Pires, P., Magnoni, LJ., Ozório, ROA. y Matias, D. (2018). Viability of dietary substitution of live microalgae with dry *Ulva rigida* in broodstock conditioning of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Biology Open*, 7(9): 1-10. doi: 10.1242/bio.035923
- Raven, JA., Johnston, AM., Kübler, JE., Korb, R., McInroy, SG., Handley, LL., Scrimgeour, CM., Walker, DI., Beardall, J., Vanderklift, M., Fredriksen, S. y Dunton, KH. (2002). Mechanistic interpretation of carbon isotope discrimination by marine macroalgae and seagrasses. *Functional Plant Biology*, 29: 355-378. doi: 10.1071/PP01201
- Ridler, N., Wowchuk, M., Robinson, B., Barrington, K., Chopin, T., Robinson, S., Page, F., Reid, G., Szemerda, M., Sewuster, J. y Boyne-Travis, S. (2007). Integrated multi-trophic aquaculture (IMTA): A potential strategic choice for farmers. *Aquaculture Economics and Management*, 11(1): 99-110. doi: 10.1080/13657300701202767
- Rodríguez-González, H., Orduña-Rojas, J., Villalobos-Medina, JP., García-Ulloa, M., Polanco-Torres, A., López-Álvarez, ES., Montoya-Mejía, M. y Hernández-Llamas, A. (2014). Partial inclusion of *Ulva lactuca* and *Gracilaria parvispora* meal in balanced diets for white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Applied Phycology*, 26(6): 2453-2459. doi: 10.1007/s10811-014-0272-z
- Rodríguez Vázquez, H. y Flores Nava, A. (2014). *Acuicultura de pequeña escala y recursos limitados en América Latina y el Caribe: Hacia un enfoque integral de políticas públicas*. ISBN: 9789253081691
- Ronquillo, JD., Fraser, J. y McConkey, AJ. (2012). Effect of mixed microalgal diets on growth and polyunsaturated fatty acid profile of European oyster (*Ostrea edulis*) juveniles. *Aquaculture*, 360-361: 64-68. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.07.018

- Roy, S., Kumar, V., Mitra, A., Manna, RK., Suresh, VR. y Homechaudhuri, S. (2018). Amylase and protease activity in shrimps and prawn of sundarbans, west bengal, india. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 47(1): 53-59
- Rudtanatip, T., Asuvapongpatana, S., Withyachumnarnkul, B. y Wongprasert, K. (2014). Sulfated galactans isolated from the red seaweed *Gracilaria fisheri* target the envelope proteins of white spot syndrome virus and protect against viral infection in shrimp haemocytes. *Journal of General Virology*, 95(PART 5): 1126-1134. doi: 10.1099/vir.0.062919-0
- Rungruangsak-Torrissen, K., Moss, R., Andresen, LH., Berg, A. y Waagbø, R. (2006). Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 32(1): 7-23. doi: 10.1007/s10695-005-0630-5
- Ruvalcaba-Márquez, JC., Álvarez-Ruíz, P., Zenteno-Savín, T., Martínez-Antonio, E., Goytortúa-Bores, E., Casillas-Hernández, R., Mejía-Ruíz, H. y Magallón-Barajas, FJ. (2021). Performance, immune response, and oxidative stress parameters of *Litopenaeus vannamei* fed diets containing varying carbohydrate/protein, lipid/protein, and energy/protein ratios. *Aquaculture Reports*, 21: 100771. doi: 10.1016/j.aqrep.2021.100771
- Sainz Hernández, JC. y Cordova Murueta, JH. (2009). Activity of trypsin from *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 290(3-4): 190-195. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.02.034
- Sainz, JC., García-Carreño, FL. y Hernández-Cortés, P. (2004). *Penaeus vannamei* isotrypsins: Purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 138(2): 155-162. doi: 10.1016/j.cbpc.2004.03.002
- Sánchez-Paz, A. (2010). White spot syndrome virus: An overview on an emergent concern. *Veterinary Research*, 41(6). doi: 10.1051/vetres/2010015
- Sánchez-Romero, A., Miranda-Baeza, A., Rivas-Vega, ME., López-Elías, JA., Martínez-Córdova, LR. y Tejada-Mansir, A. (2016). Development of a Model to Simulate Nitrogen Dynamics in an Integrated Shrimp-Macroalgae Culture System with Zero Water Exchange. *Journal of the World Aquaculture Society*, 47(1): 129-138. doi: 10.1111/jwas.12242
- Sarà, G., Reid, GK., Rinaldi, A., Palmeri, V., Troell, M. y Kooijman, SALM. (2011). Growth and reproductive simulation of candidate shellfish species at fish cages in the Southern Mediterranean: Dynamic Energy Budget (DEB) modelling for integrated multi-trophic aquaculture. *Aquaculture*, 324-325: 259-266. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.10.042
- Saritha, K., Mani, AE., Priyalaxmi, M. y Patterson, J. (2013). Antibacterial activity and biochemical constituents of seaweed *Ulva lactuca*. *Global Journal of Pharmacology*, 7(3): 276-282. doi: 10.5829/idosi.gjp.2013.7.3.75156
- Sathivel, A., Balaji Raghavendran, HR., Srinivasan, P. y Devaki, T. (2008). Anti-peroxidative and anti-hyperlipidemic nature of *Ulva lactuca* crude polysaccharide on D-Galactosamine induced hepatitis in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 3262-3267. doi: 10.1016/j.fct.2008.07.016
- Savoye, N., Aminot, A., Tréguer, P., Fontugne, M., Naulet, N. y Kérouel, R. (2003). Dynamics of particulate organic matter $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ during spring phytoplankton blooms in a macrotidal ecosystem (Bay of Seine, France). *Marine Ecology Progress Series*, 255: 27-41. doi: 10.3354/meps255027
- Schleder, DD., Blank, M., Peruch, LGB., Poli, MA., Gonçalves, P., Rosa, KV., Fracalossi, DM., Vieira, F do N., Andreatta, ER. y Hayashi, L. (2019). Impact of combinations of brown seaweeds on shrimp gut microbiota and response to thermal shock and white spot disease.

- Aquaculture*, 519(May 2019): 734779. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734779
- Schleder, DD., Peruch, LGB., Poli, MA., Ferreira, TH., Silva, CP., Andreatta, ER., Hayashi, L. y do Nascimento Vieira, F. (2018). Effect of brown seaweeds on Pacific white shrimp growth performance, gut morphology, digestive enzymes activity and resistance to white spot virus. *Aquaculture*, 495(2017): 359-365. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.06.020
- Ścieszka, S. y Klewicka, E. (2019). Algae in food: a general review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(21): 3538-3547. doi: 10.1080/10408398.2018.1496319
- Selvin, J., Huxley, AJ. y Lipton, AP. (2004). Immunomodulatory potential of marine secondary metabolites against bacterial diseases of shrimp. *Aquaculture*, 230(1-4): 241-248. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00427-7
- Selvin, J. y Lipton, AP. (2003). Shrimp disease management using bioactive marine secondary metabolites : an eco-friendly approach. *Naga, WorldFish Center Quarterly*, 26(1): 11-13
- Selvin, J., Manilal, A., Sujith, S., Seghal Kiran, G. y Premnath Lipton, A. (2011). Efficacy of marine green alga *Ulva fasciata* extract on the management of shrimp bacterial diseases. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 39(2): 197-204. doi: 10.3856/vol39-issue2-fulltext-1
- Serrano, AEJ., Santizo, RB. y Tumbokon, BLM. (2015). Potential use of the sea lettuce *Ulva lactuca* replacing soybean meal in the diet of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* juvenile. *AAAL Bioflux*, 8(3): 245-252
- Shanab, SMM., Hafez, RM. y Fouad, AS. (2018). A review on algae and plants as potential source of arachidonic acid. *Journal of Advanced Research*, 11: 3-13. doi: 10.1016/j.jare.2018.03.004
- Shen, W-Y., Fu, L-L., Li, W-F. y Zhu, Y-R. (2010). Effect of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* on the growth, performance, immune response and antioxidant activities of the shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Research*, 41(11): 1691-1698. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02554.x
- Shewry, PR. y Hey, SJ. (2015). The contribution of wheat to human diet and health. *Food and Energy Security*, 4(3): 178-202. doi: 10.1002/fes3.64
- Shimoda, T., Suryati, E. y Ahmad, T. (2006). Evaluation in a shrimp aquaculture system using mangroves, oysters, and seaweed as biofilters based on the concentrations of nutrients and Chlorophyll a. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 40(2): 189-193. doi: 10.6090/jarq.40.189
- Shpigel, M. y Neori, A. (2007). The Comparative Roles of Suspension-Feeders in Ecosystems. En: Bert TM (ed) *Ecological and Genetic Implications of Aquaculture Activities* pp 433-446
- Shyne Anand, PS., Kohli, MPS., Kumar, S., Sundaray, JK., Dam Roy, S., Venkateshwarlu, G., Sinha, A. y Pailan, GH. (2014). Effect of dietary supplementation of biofloc on growth performance and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 418-419: 108-115. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.09.051
- Sivagnanavelmurugan, M., Marudhupandi, T., Palavesam, A. y Immanuel, G. (2012). Antiviral Effect of Fucoïdan Extracted from the Brown Seaweed, *Sargassum wightii*, on Shrimp *Penaeus monodon* Postlarvae against White Spot Syndrome Virus. *Journal of the World Aquaculture Society*, 43(5): 697-706. doi: 10.1111/j.1749-7345.2012.00596.x
- Sohel, MSI. y Ullah, MH. (2012). Ecohydrology: A framework for overcoming the environmental impacts of shrimp aquaculture on the coastal zone of Bangladesh. *Ocean & Coastal Management*, 63: 67-78. doi: 10.1016/j.ocecoaman.2012.03.014
- Sotanon, N., Saleeart, A., Rattanaojpong, T., Thanh Dong, H., Senapin, S., Wongprasert, K.,

- Sarikavanij, S. y Khunrae, P. (2018). C-terminal domain of WSSV VP37 is responsible for shrimp haemocytes binding which can be inhibited by sulfated galactan. *Fish and Shellfish Immunology*, 77: 312-318. doi: 10.1016/j.fsi.2018.03.043
- Soto-Rodriguez, SA., Gomez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Betancourt-Lozano, M. y Morales-Covarrubias, MS. (2015). Field and Experimental Evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the Causative Agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease of Cultured Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5): 1689-1699. doi: 10.1128/AEM.03610-14
- Soto, C. (2013). Effect of isomalto-oligosaccharide and gentio-oligosaccharide on the growth and fatty acid profile of *Lactobacillus plantarum*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(4). doi: 10.2225/vol16-issue4-fulltext-9
- Sowmya, R. y Sachindra, NM. (2016). Biochemical and Molecular Characterization of Carotenogenic Flavobacterial Isolates from Marine Waters. *Polish Journal of Microbiology*, 65(1): 77-88. doi: 10.5604/17331331.1197278
- Spain, AM., Krumholz, LR. y Elshahed, MS. (2009). Abundance, composition, diversity and novelty of soil *Proteobacteria*. *The ISME Journal*, 3: 992-1000. doi: 10.1038/ismej.2009.43
- Subasinghe, RP., Curry, D., McGladdery, SE. y Bartley, D. (2003). Recent technological innovations in aquaculture. *Review of the state of world aquaculture, FAO Fisheries Circular*, 886(2): 59-74
- Suleria, HAR., Osborne, S., Masci, P. y Gobe, G. (2015). Marine-based nutraceuticals: An innovative trend in the food and supplement industries. *Marine Drugs*, 13(10): 6336-6351. doi: 10.3390/md13106336
- Tabarsa, M., Rezaei, M., Ramezanzpour, Z., Waaland, RJ. y Rabiei, R. (2012). Fatty acids, amino acids, mineral contents, and proximate composition of some brown seaweeds. *Journal of Phycology*, 48(2): 285-292. doi: 10.1111/j.1529-8817.2012.01122.x
- Tacon, AGJ. (2002). Thematic Review of Feeds and Feed Management Practices in Shrimp Aquaculture
- Tacon, AGJ. y Metian, M. (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, 285: 146-158. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.08.015
- Takahashi, Y., Uehara, K., Watanabe, R., Okumura, T., Yamashita, T., Omura, H., Yomo, T., Kawano, T., Kanemitsu, A., Narasaka, H., Suzuki, N. y Itami, T. (1998). Efficacy of Oral Administration of Fucoidan, a Sulfated Polysaccharide, in Controlling White Spot Syndrome in Kuruma Shrimp in Japan. En: *Advances in shrimp biotechnology*, Flegel TW ed. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, pp 171-173
- Takaichi, S. (2009). Distribution and Biosynthesis of Carotenoids. En: *The purple phototrophic bacteria*, Springer ed. Dordrecht, pp 97-117
- Tanyaros, S. y Chuseingjaw, S. (2014). A partial substitution of microalgae with single cell detritus produced from seaweed (*Porphyra haitanensis*) for the nursery culture of tropical oyster (*Crassostrea belcheri*). *Aquaculture Research*, 47(7): 2080-2088. doi: 10.1111/are.12662
- Tecator. (1987). Determination of Kjeldahl nitrogen content with Kjeltex System 1026. Application note AN 86/87 (1987.02.18). Helsingborg, Sweden
- Tecator. (1983). Fat extraction on feeds with the soxtex system HT. The influence of sample

- preparation and extraction media. Application note AN 67/83 (1983.06.13). Helsingborg, Sweden
- Tendencia, EA. (2007). Polyculture of green mussels, brown mussels and oysters with shrimp control luminous bacterial disease in a simulated culture system. *Aquaculture*, 272(1-4): 188-191. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.07.212
- The World Bank Group. (2016). Seaweed Aquaculture for Food Security, Income Generation and Environmental Health Seaweed Aquaculture for Food Security, Income Generation and Environmental Health in Tropical Developing Countries Disponible en: <http://documents.worldbank.org/curated/en/947831469090666344/pdf/107147-WP-REVISED-Seaweed-Aquaculture-Web.pdf>
- Thomas, F., Hehemann, J-H., Rebuffet, E., Czejek, M. y Michel, G. (2011). Environmental and gut Bacteroidetes: the food connection. *Frontiers in Microbiology*, 2(93): 1-16. doi: 10.3389/fmicb.2011.00093
- Tincy, V., Mishal, P., Akhtar, MS. y Pal, AK. (2014). Aquaculture Nutrition : Turning Challenges into Opportunities. *World Aquaculture*, 45(2): 67-69 Disponible en: http://www.researchgate.net/publication/262877477_Aquaculture_Nutrition_Turning_Challenges_into_Opportunities%5Cnwww.was.org
- Trabal Fernández, N., Mazón-Suástegui, JM., Vázquez-Juárez, R., Romero, J. y Ascencio-Valle, F. (2014). Changes in the composition and diversity of the bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea corteziensis*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*) during commercial production. *Microbiology ecology*, 88: 69-83. doi: 10.1111/1574-6941.12270
- Troell, M. (2009). Integrated marine and brackishwater aquaculture in tropical regions. *Integrated Mariculture - A Global Review - FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper NO 529*, (October 2013): 47-132. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00469-1
- Troell, M., Kautsky, N., Beveridge, M., Henriksson, P., Primavera, JH., Rönnbäck, P. y Folke, C. (2013). Aquaculture. *Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition*, 1: 189-201. doi: 10.1016/B978-0-12-384719-5.00307-5
- Uchida, M. (1996). Formation of Single Cell Detritus Densely Covered with Bacteria during Experimental Degradation of *Laminaria japonica* Thalli. *Fisheries science*, 62(5): 731-736
- Uchida, M. y Murata, M. (2002). Fermentative preparation of single cell detritus from seaweed, *Undaria pinnatifida*, suitable as a replacement hatchery diet for unicellular algae. *Aquaculture*, 207(3-4): 345-357. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00792-X
- Uchida, M., Nakata, K. y Maeda, M. (1997). Introduction of detrital food webs into an aquaculture system by supplying single cell algal detritus produced from *Laminaria japonica* as a hatchery diet for *Artemia nauplii*. *Aquaculture*, 154(2): 125-137. doi: 10.1016/S0044-8486(97)00047-1
- Uchida, M. y Numaguchi, K. (1998). Method for preparing algal detritus. US005801050A
- Van Der Linden, K. (2014). Dutch seaweed. An economic analysis of Dutch seaweed (proteins) in the food and feed industry
- van Ginneken, VJT., Helsper, JPF., de Visser, W., van Keulen, H. y Brandenburg, WA. (2011). Polyunsaturated fatty acids in various macroalgal species from north Atlantic and tropical seas. *Lipids in Health and Disease*, 10(1): 104. doi: 10.1186/1476-511X-10-104
- Vargas-Albores, F., Guzmán, MA. y Ochoa, JL. (1993). An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*).

Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology, 106(2): 299-303. doi: 10.1016/0300-9629(93)90516-7

- Vazquez, HE. (2009). Informe técnico: Producción artificial de semilla y cultivo de engorde de moluscos bivalvos. : 78. Disponible en: https://www.jica.go.jp/project/elsalvador/2271029E1/materials/pdf/2009/2009_1_2.pdf
- Vega-Villasante, F., Nolasco, H. y Civera, R. (1993). The digestive enzymes of the pacific brown shrimp *Penaeus californiensis* I. Properties of amylase activity in the digestive tract. *Comp Biochem Physiol*, 106B(3): 547-550
- Velmurugan, S., Jerin, N., Michael Babu, M., Bindhu, F., Albin Dhas, S. y Citarasu, T. (2014). Screening and characterization of antiviral compounds from *Enteromorpha flexuosa* against white spot syndrome virus (WSSV) and its in vivo influence on Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture International*, 23(1): 65-80. doi: 10.1007/s10499-014-9798-y
- Walne, PR. (1972). The influence of current speed, body size and water temperature on the filtration rate of five species of bivalves. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 52(2): 345-374. doi: 10.1017/S0025315400018737
- Wang, C., Lin, G., Yan, T., Zheng, Z., Chen, B. y Sun, F. (2014a). The cellular community in the intestine of the shrimp *Penaeus penicillatus* and its culture environments. *Fisheries Science*, 80: 1001-1007. doi: 10.1007/s12562-014-0765-3
- Wang, HC., Wang, HC., Leu, JH., Kou, GH., Wang, AHJ. y Lo, CF. (2007). Protein expression profiling of the shrimp cellular response to white spot syndrome virus infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 31(7): 672-686. doi: 10.1016/j.dci.2006.11.001
- Wang, J., Zhu, R., Gao, B., Wu, B., Li, K., Sun, X., Liu, H. y Wang, S. (2013). Biomaterials The enhanced immune response of hepatitis B virus DNA vaccine using SiO₂ LDH nanoparticles as an adjuvant. *Biomaterials*, : 1-13. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.09.060
- Wang, L., Huang, L., Su, Y., Qin, Y., Kong, W., Ma, Y., Xu, X., Lin, M., Zheng, J. y Yan, Q. (2015). Involvement of the flagellar assembly pathway in *Vibrio alginolyticus* adhesion under environmental stresses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5. doi: 10.3389/fcimb.2015.00059
- Wang, Q., Yang, C., Du, X., Liu, X., Sun, R. y Deng, Y. (2016). Growth performance and biochemical composition of juvenile pearl oyster *Pinctada martensii* fed on artificial diets. *Aquaculture International*, 24(4): 995-1005. doi: 10.1007/s10499-015-9966-8
- Wang, W., Sun, J., Liu, C. y Xue, Z. (2017). Application of immunostimulants in aquaculture: current knowledge and future perspectives. *Aquaculture Research*, 48(1): 1-23. doi: 10.1111/are.13161
- Wang, X-W., Xu, Y-H., Xu, J-D., Zhao, X-F. y Wang, J-X. (2014b). Collaboration between a Soluble C-Type Lectin and Calreticulin Facilitates White Spot Syndrome Virus Infection in Shrimp. *The Journal of Immunology*, 193(5): 2106-2117. doi: 10.4049/jimmunol.1400552
- Wang, YC., Chang, PS. y Chen, HY. (2008). Differential time-series expression of immune-related genes of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to dietary inclusion of β -1,3-glucan. *Fish and Shellfish Immunology*, 24(1): 113-121. doi: 10.1016/j.fsi.2007.09.008
- Watanabe, T. (2002). Strategies for further development of aquatic feeds. *Fisheries Science*, 68: 242-252
- Watts, JEM., Schreier, HJ., Lanska, L. y Hale, MS. (2017). The rising tide of antimicrobial

- resistance in aquaculture: Sources, sinks and solutions. *Marine Drugs*, 15(6): 1-16. doi: 10.3390/md15060158
- Wenzel, M., Schönig, I., Berchtold, M., Kämpfer, P. y König, H. (2002). Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 32-40
- Whyte, JNC., Englar, JR. y Carswell, BL. (1990). Biochemical composition and energy reserves in *Crassostrea gigas* exposed to different levels of nutrition. *Aquaculture*, 90(2): 157-172. doi: 10.1016/0044-8486(90)90338-N
- Williams, KP., Sobral, BW. y Dickerman, AW. (2007). A Robust Species Tree for the *Alphaproteobacteria*. *Journal of Bacteriology*, 189(13): 4578-4586. doi: 10.1128/JB.00269-07
- Witvrouw, M. y De Clercq, E. (1997). Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *General Pharmacology*, 29(4): 497-511. doi: 10.1016/S0306-3623(96)00563-0
- Wu, S., Wang, G., Angert, ER., Wang, W., Li, W. y Zou, H. (2012). Composition, Diversity, and Origin of the Bacterial Community in Grass Carp Intestine. *PLoS ONE*, 7(2). doi: 10.1371/journal.pone.0030440
- Wu, W., Wang, L. y Zhang, X. (2005). Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection. *Virology*, 332(2): 578-583. doi: 10.1016/j.virol.2004.12.011
- Wurmann, CG., Madrid, RM. y Brugger, AM. (2004). Shrimp farming in Latin America: Current status, opportunities, challenges and strategies for sustainable development. *Aquaculture Economics and Management*, 8(3-4): 117-141. doi: 10.1080/13657300409380358
- Wyban, J. (2019). SPF shrimp technology: past, present & future. *Hatcheryfeed*, 7(4): 19-23
- Xing, M., Hou, Z., Yuan, J., Liu, Y., Qu, Y. y Liu, B. (2013). Taxonomic and functional metagenomic profiling of gastrointestinal tract microbiome of the farmed adult turbot (*Scophthalmus maximus*). *FEMS Microbiology Ecology*, 86(3): 432-443. doi: 10.1111/1574-6941.12174
- Xiong, J., Dai, W., Zhu, J., Liu, K., Dong, C. y Qiu, Q. (2017). The Underlying Ecological Processes of Gut Microbiota Among Cohabiting Retarded, Overgrown and Normal Shrimp. *Microbial Ecology*, 73(4): 988-999. doi: 10.1007/s00248-016-0910-x
- Xiong, J., Wang, K., Wu, J., Qiuqian, L. y Yang, K. (2015). Changes in intestinal bacterial communities are closely associated with shrimp disease severity. *Applied Environmental Microbiological Biotechnology*. doi: 10.1007/s00253-015-6632-z
- Xunta de Galicia. (2012). Integrated Multi-trophic Aquaculture (IMTA): A sustainable, pioneering alternative for marine cultures in Galicia. Jorge Garc ed. ISBN: 13:978-84-695-3260-7
- Yaich, H., Garna, H., Besbes, S., Paquot, M., Blecker, C. y Attia, H. (2011). Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. *Food Chemistry*, 128(4): 895-901. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.03.114
- Yang, C., Hao, R., Deng, Y., Liao, Y., Wang, Q., Sun, R., Du, X., Yang, C., Hao, R., Deng, Y., Wang, Q., Jiao, Y. y Du, X. (2017). Effects of protein sources on growth, immunity and antioxidant capacity of juvenile pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. *Fish and Shellfish Immunology*, 67: 411-418. doi: 10.1016/j.fsi.2017.06.037
- Yang, Q., Zhou, X., Zhou, Q., Tan, B., Chi, S. y Dong, X. (2009). Apparent digestibility of selected feed ingredients for white shrimp *Litopenaeus vannamei*, Boone. *Aquaculture Research*, 41: 78-86. doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02307.x

- Yang, S., Du, J., Duan, YL., Xiao, Q., Li, NQ., Lin, Q., Zhao, LL., Du, ZJ., Zhou, J. y Du, J. (2018). Differences in the digestive enzyme activity, intestinal mucosa and microbial community in loach cultivated in two separate environments. *BMC microbiology*, 18(1): 113. doi: 10.1186/s12866-018-1237-1
- Yao, Z., Yang, K., Huang, L., Huang, X., Qiuqian, L., Wang, K. y Zhang, D. (2018). Disease outbreak accompanies the dispersive structure of shrimp gut bacterial community with a simple core microbiota. *AMB Express*, 8(1). doi: 10.1186/s13568-018-0644-x
- Yildirim, Ö., Ergün, S., Yaman, S. y Türker, A. (2009). Effects of Two Seaweeds (*Ulva lactuca* and *Enteromorpha linza*) as a Feed Additive in Diets on Growth Performance, Feed Utilization, and Body Composition of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Rasyonlarda Yem Katkı Maddesi Olarak İki Deniz Yosununun. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(3): 455-460
- Yoganandhan, K., Thirupathi, S. y Sahul Hameed, AS. (2003). Biochemical, physiological and hematological changes in white spot syndrome virus-infected shrimp, *Penaeus indicus*. *Aquaculture*, 221(1-4): 1-11. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00220-X
- Yogeeswaran, A., Velmurugan, S., Punitha, SMJ., Babu, MM., Selvaraj, T., Kumaran, T. y Citarasu, T. (2012). Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by inactivated vaccine with herbal immunostimulants. *Fish and Shellfish Immunology*, 32(6): 1058-1067. doi: 10.1016/j.fsi.2012.02.029
- Yokoyama, H. y Ishihi, Y. (2003). Feeding of the bivalve *Theora lubrica* on benthic microalgae: Isotopic evidence. *Marine Ecology Progress Series*, 255(Kikuchi 1981): 303-309. doi: 10.3354/meps255303
- Yokoyama, H., Ishihi, Y. y Yamamoto, S. (2008). Diet-tissue isotopic fractionation of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Ecology Progress Series*, 358: 173-179. doi: 10.3354/meps07306
- Zeng, S., Huang, Z., Hou, D., Liu, J., Weng, S. y He, J. (2017). Composition, diversity and function of intestinal microbiota in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at different culture stages. *PeerJ*, 5(e3986). doi: 10.7717/peerj.3986
- Zertuche-González, JA. (2013). Aprovechamiento de las Macroalgas Marinas en México ; estado actual y retos futuros. En: Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC, pp 1-8
- Zhang, M., Sun, Y., Chen, K., Yu, N., Zhou, Z., Chen, L., Du, Z. y Li, E. (2014). Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources. *Aquaculture*, 434: 449-455. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.09.008
- Zhang, Z. y Li, X. (2006). Evaluation of the effects of grading and starvation on the lysosomal membrane stability in pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg) by using neutral red retention assay. *Aquaculture*, 256: 537-541. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.02.002
- Zhao, W., Wang, M., Wang, L., Liu, M., Jiang, K., Xia, S., Qi, C. y Wang, B. (2018). Analysis of the expression of metabolism-related genes and histopathology of the hepatopancreas of white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed with aflatoxin B1. *Aquaculture*, 485: 191-196. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.11.044
- Zheng, Y., Yu, M., Liu, J., Qiao, Y., Wang, L., Li, Z., Zhang, X-H. y Yu, M. (2017). Bacterial Community Associated with Healthy and Diseased Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Larvae and Rearing Water across Different Growth Stages. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUL). doi: 10.3389/fmicb.2017.01362

- Zhou, L., Chen, C., Xie, J., Xu, C., Zhao, Q., Qin, J.G., Chen, L. y Li, E. (2019). Intestinal bacterial signatures of the “cotton shrimp-like” disease explain the change of growth performance and immune responses in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish and Shellfish Immunology*, 92(May): 629-636. doi: 10.1016/j.fsi.2019.06.054
- Zhu, D., Wen, X., Xuan, X., Li, S. y Li, Y. (2016a). The green alga *Ulva lactuca* as a potential ingredient in diets for juvenile white spotted snapper *Lutjanus stellatus* Akazaki. *Journal of Applied Phycology*, 28(1): 703-711. doi: 10.1007/s10811-015-0545-1
- Zhu, J., Dai, W., Qiu, Q., Dong, C., Zhang, J. y Xiong, J. (2016b). Contrasting Ecological Processes and Functional Compositions Between Intestinal Bacterial Community in Healthy and Diseased Shrimp. *Microbial Ecology*, 72: 975-985. doi: 10.1007/s00248-016-0831-8