

Research Article

Biorremediación de los efluentes de cultivo del camarón *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) utilizando tapetes microbianos en un sistema de recirculación

Carlos Lezama-Cervantes^{1,2}, José de Jesús Paniagua-Michel¹ & Jorge Zamora-Castro¹

¹Departamento de Biotecnología Marina, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Km 107 Carr., Tijuana-Ensenada, BC., México

²Dirección actual: Facultad de Ciencias Marinas, Universidad de Colima, Km 20 Carr., Manzanillo-B Navidad, Colima, México

RESUMEN. Se desarrolló un sistema de recirculación (SR) integrando el cultivo del camarón con tapetes microbianos buscando mitigar los impactos ambientales de los subproductos del cultivo del camarón y avanzar hacia la biorremediación del agua de cultivo. Los consorcios microbianos obtenidos de ambientes naturales (TaM) estuvieron constituidos por bacterias (55,6%), cianófitas (18,4%), diatomeas (9%), nemátodos (5,6%) y clorófitas (1,4%), entre los grupos taxonómicos principales. La remoción de nutrientes y sólidos se evaluó en un SR (2 ciclos/hora) conteniendo ($n = 3$) 60 y 120 ind m^{-2} de *Litopenaeus vannamei*. Los resultados demostraron que los TaM redujeron los niveles de nitrógeno amoniacal por encima del 71% diariamente; la demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5) se redujo más de 68% y los sólidos suspendidos (SST) hasta en 62% al compararse con los sistemas control ($p < 0,05$). Los TaM secuestran la materia orgánica y mineral y ejercen un efecto clarificador en la columna de agua. La descomposición de la materia orgánica se debe al acoplamiento estrecho entre fotoautótrofos y nitrificantes contenidos en los TaM. Esta condición aumenta los niveles de nitrógeno inorgánico en la columna de agua y acelera la nitrificación por arriba de 10 mg $N-NO_3^- L^{-1}$ (120 ind m^{-2}), con lo cual se produce un aumento de hasta 750% más nitratos que los sistemas control. La remoción del fósforo no fue significativa ($p > 0,05$). El agua bio-remediada tiene un efecto positivo en el cultivo de *Litopenaeus vannamei*, y promueve el crecimiento y sobrevivencia en presencia de TaM en el SR.

Palabras clave: tapetes microbianos, efluentes de camarón, sistemas de recirculación, *Litopenaeus vannamei*, México.

Bioremediation of effluents of the culture of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) using microbial mats in a recirculating system

ABSTRACT. We developed a recirculating system integrating shrimp culture with microbial mats aiming to mitigate the environmental impacts of by-products from shrimp culture and to advance toward the bioremediation of the shrimp culture water. The microbial consortia collected from natural environments (TaM) was constituted by bacteria (55.6%), Cyanophyte (18.4%), diatoms (9%), nematods (5.6%) and Chlorophyte algae (1.4%) among the major taxonomic groups. The removal of nutrients and solids by these mats was assessed in a recirculating system (2 cycles/hour) ($n = 3$) containing 60 and 120 ind m^{-2} of *Litopenaeus vannamei*. Results showed that the microbial mat reduces daily up to 71% of ammonia nitrogen, decreases around 68% of the biochemical oxygen demand (DBO_5) and up to 62% of suspended solids (SST) when comparing to the control systems ($p < 0.05$). By trapping organic and mineral matter, microbial mats have a clarifying effect on the water column. The mats effectively traps particulate matter and break it down with great efficiency due to the tight coupling between autotrophs and nitrifiers in the mat. This feature increases inorganic nitrogen levels in water column and accelerates nitrification up to 10 mg $N-NO_3^- L^{-1}$ (120 ind m^{-2}) producing 750% more nitrates than the control systems. Nevertheless, phosphorus removal was not significant ($p > 0.05$). The Bioremediated culture water had a positive effect on the culture of *Litopenaeus*

vannamei, and promotes higher survival and growth in presence of TaM in the recirculating shrimp culture system.

Keywords: microbial mats, shrimp effluents, recirculating system, *Litopenaeus vannamei*, México.

Corresponding author: José de Jesús Paniagua-Michel (jpaniagu@cicese.mx)

INTRODUCCIÓN

A pesar que la acuicultura es considerada como una actividad exitosa generadora de alimentos, el impacto de sus efluentes ricos en material disuelto y suspendido como nitrógeno, fósforo y carbono ha empezado a atraer la atención por el riesgo que tienen sobre la diversidad y el hábitat (Boyd & Gautier, 2000; Cohen *et al.*, 2005). El volumen en aumento de sus efluentes exige la aplicación de mejores prácticas de manejo para detener la alteración del ambiente. De igual forma, dentro del mismo sistema de producción, el alimento no consumido y las heces deterioran la calidad del agua, lo que afecta el consumo alimentario, crecimiento, sobrevivencia y rendimiento, particularmente en sistemas con recambio de agua reducido (Thompson *et al.*, 2002; Thakur & Lin, 2003; Cohen *et al.*, 2005). De los residuos generados, los sólidos suspendidos finos (< 30 μm) y los disueltos representan el mayor desafío para el ambiente debido al escaso o nulo tratamiento que reciben, demandan oxígeno y eutrofican las aguas receptoras (Páez-Osuna, 1997; Losordo *et al.*, 1998; Trott & Alongi, 2000). En México la camaricultura ha crecido considerablemente, particularmente en la región noroeste, donde las epizootias en los sistemas de producción y el efecto de sus efluentes son conocidos (Agraz-Hernández *et al.*, 1999).

Para tratar los efluentes del cultivo del camarón, Teichert-Codington *et al.* (1999) sugieren la sedimentación, Kinne *et al.* (2001) y Ramos *et al.* (2008) proponen la biofiltración mediante moluscos y Neori *et al.* (2000) sugieren humedales artificiales. Abeyasinghe *et al.* (1996) y Tseng & Wu (1998) recomiendan el uso de reactores nitrificantes y clarificadores. Sin embargo, estas propuestas tienen como desventaja los costos de inversión y operación o la sensibilidad de los ambientes adyacentes.

Una alternativa ambientalmente compatible es la biorremediación, la cual utiliza microorganismos capaces de degradar y reducir xenobióticos. En este contexto, Granados-Machuca (1999) y Paniagua-Michel & García (2003) evaluaron a nivel *ex situ* la capacidad de tapetes microbianos para depurar el nivel de carga orgánica (DBO_5) y de compuestos nitro-

genados (N-NH_4^+ , N-NO_2^- y N-NO_3^-) de un efluente de cultivo de camarón. Similarmente, Bender *et al.* (2004) encontraron evidencias de nitrificación con tapetes microbianos en cultivo de *Centropristis striata*, además de niveles de oxigenación adecuados en el cultivo.

En el medio natural, los tapetes microbianos están constituidos por comunidades autotróficas y heterotróficas (Paerl, 2000; Bender *et al.*, 2004) con una diversidad de diatomeas, cianobacterias, bacterias púrpuras, bacterias reductoras y no reductoras de sulfato, entre otros taxones y se distribuyen en todo el mundo, y son abundantes en costas de clima árido (D'Amelio *et al.*, 1989; Ferris & Ward, 1997).

Considerando como base la magnitud de los efluentes del cultivo de camarón y su efecto en los ambientes costeros, se propone desarrollar una metodología de biorremediación basada en el empleo de tapetes microbianos para disminuir los niveles de nitrógeno, fósforo y la demanda bioquímica de oxígeno en un sistema de recirculación diseñado para el cultivo de *Litopenaeus vannamei* (Pérez-Farfante & Kinsley, 1997). Asimismo, se considera la aplicación potencial de esta biotecnología para maximizar la producción en un sistema de cultivo comercial de camarón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de los consorcios microbianos

Entre mayo y octubre de 2003 se colectaron muestras de consorcios microbianos en los estanques de producción de camarón de la granja Vizsomar, ubicada en el km 170 de la carretera Ensenada-San Felipe, B.C., México (31°12'09,21"N, 114°53'47,07"W). Estas muestras fueron transportadas al laboratorio húmedo del Departamento de Biotecnología Marina del CICESE donde se procedió a su aclimatación y cultivo. A partir de estas muestras, se aplicó un proceso de resiembra y cultivo sobre poliéster de baja densidad (PBD) (1,1 m² de tapete, TaM) (Paniagua-Michel & García, 2003; Zamora-Castro *et al.*, 2008). Para la mezcla de las muestras, se determinó la cantidad de tapete como biomasa seca (Zhu & Lee, 1997; Kim *et al.*, 1999) necesaria para

remover 1,0 mg de N-NH_4^+ $\text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$, y a partir de esto las muestras se combinaron en partes equivalentes de la capacidad para remover el amonio.

Como medio de cultivo para el inóculo se utilizaron efluentes de cultivos intensivos de camarón (50-100 ind m^{-2} , alimentados con nutrimento al 30-35% de proteínas y a una razón del 6% de la biomasa en dos raciones). Estos residuos líquidos fueron homogenizados con agitación por 20 min y dejados en reposo por 10 min para eliminar los sólidos particulados. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y se filtró secuencialmente a 100, 35 y 10 μm a una presión de vacío < 25 mm Hg y finalmente se esterilizó a 121°C por 25-45 min (según el volumen). Una vez frío, el medio fue adicionado con nitrógeno y fósforo inorgánico para obtener una concentración final de 5 mg N-NH_4^+ L^{-1} , 1 mg N-NO_2 L^{-1} y 3 mg P-PO_4^{3-} L^{-1} . En este medio se colocó el PBD inoculado con la mezcla de microorganismos sobre un contenedor de plástico (40x60 cm) y se introdujo por 30 días dentro de un invernadero (6x14x3 m) con cubierta transparente y paredes con membrana de mosquitero, para mantener un ambiente controlado, regulado los factores físicos y químicos como la temperatura en $27 \pm 2^\circ\text{C}$, salinidad de $35 \pm 1,5$ y humedad relativa superior al 60%.

Construcción y funcionamiento del sistema de recirculación

Posteriormente, para probar el efecto del TaM sobre la calidad de los efluentes de un cultivo intensivo de camarón, se colocó el TaM (200 y 400 cm^2) al interior de un sistema de cultivo (sistema de recirculación, por triplicado; 3 n) construido *ex profeso* con un área de 0,5 m^2 (0,1 m^3) (Fig. 1a), dentro del cual se introdujeron 60 y 120 individuos m^{-2} (ind m^{-2}) de camarón blanco (*L. vannamei*) con un peso de $1,0 \pm 0,1$ g y alimentados con dietas comerciales (Purina y Zeigler) con un contenido de proteínas entre 25 y 40%. El alimento se proporcionó a una tasa entre 4 y 6% en base a la biomasa, ofreciendo dos raciones iguales (09:00 y 18:00) de acuerdo a Velasco *et al.* (1999).

En el sistema de recirculación se generó el movimiento del agua a 2 ciclos/h, a través de elevadores de aire ("air lifts") inyectando en el interior de un tubo de PVC de 1" aire a un flujo de 3,6 Lpm, lo cual permitió crear en un contenedor lateral un hidrociclón (Fig. 1b), para separar del sistema los residuos mayores a 100 μm (Timmons *et al.*, 2002). En el fondo del hidrociclón, se colocó una llave de PVC de 1/2" para drenar los sólidos dos veces al día (12:00 y 20:00 h), desalojando un máximo de 0,5 L d^{-1} (0,5% del total). Se programó que el desagüe y el agua

añadida para recuperar la pérdida por evaporación, fuera como máximo el 1% del sistema. Posteriormente, el agua pasó a través del TaM (Fig. 1c) actuando específicamente con los sólidos suspendidos (SST) y disueltos del sistema, ricos en compuestos carbonosos (DBO_5), fosfatados (P-PO_4^{3-} y P orgánico) y nitrogenados; nitrógeno amoniacal total (NAT; N-NH_4^+ + NH_3), nitritos (N-NO_2^-) y nitratos (N-NO_3^-), además de N orgánico.

Registro de parámetros

Diariamente, durante 27 días se tomaron registros de temperatura con un termómetro (libre de mercurio EasyRead VWR) con una escala de -10 a 40°C en horario diurno y vespertino (08:00 y 17:00 h), el pH con un potenciómetro de mesa (400+ Orion), la salinidad con un refractómetro portátil (VistaVision VWR) con escala de 0 a 100 unidades prácticas de salinidad (UPS). Para la determinación de otras variables, se colectó agua en una botella de DBO de acuerdo a APHA (1995) y se llevó al laboratorio seco donde se determinó el oxígeno disuelto con un monitor digital (5300 YSI). También se determinó la concentración de nitrógeno amoniacal (NAT) mediante la técnica del fenato descrita por Parsons *et al.* (1984); la estimación de nitritos (N-NO_2^-) se basó en la formación de grupos azo (N=N) según describe Parsons *et al.* (1984), los nitratos (N-NO_3^-) previa reducción en una columna de cadmio activo (Parsons *et al.*, 1984), se analizaron de forma similar a nitritos, la suma de estas especies nitrogenadas se reportó como nitrógeno inorgánico disuelto (NID). La determinación de fósforo reactivo (PO_4^{3-}) se efectuó por el método del molibdato-ascorbato (Parsons *et al.*, 1984). Para la determinación analítica de estas especies químicas se utilizó un espectrofotómetro de arreglo de diodos (Hewlett Packard 8453). Finalmente, para estimar la demanda bioquímica de oxígeno a cinco días (DBO_5) y la determinación de los sólidos suspendidos totales (SST), se aplicaron las relaciones descritas en APHA (1995).

Biometría y tratamiento estadístico

En los organismos se determinó semanalmente la tasa de crecimiento por la ecuación: $\text{TC} = (\text{w}_2 - \text{w}_1) / t$, donde TC = tasa de crecimiento (g d^{-1}); w_2 y w_1 = peso final e inicial respectivamente (g) y t = tiempo (días). La sobrevivencia calculada por $S = (\Sigma n_f / \Sigma n_i) 100$, donde S = sobrevivencia (%), Σn_f y Σn_i = es el número de organismos al final e inicio respectivamente, y el factor de conversión de alimento $\text{FCA} = \text{alimento proporcionado (g)} / \text{biomasa ganada (g)}$ en un mismo periodo de tiempo.

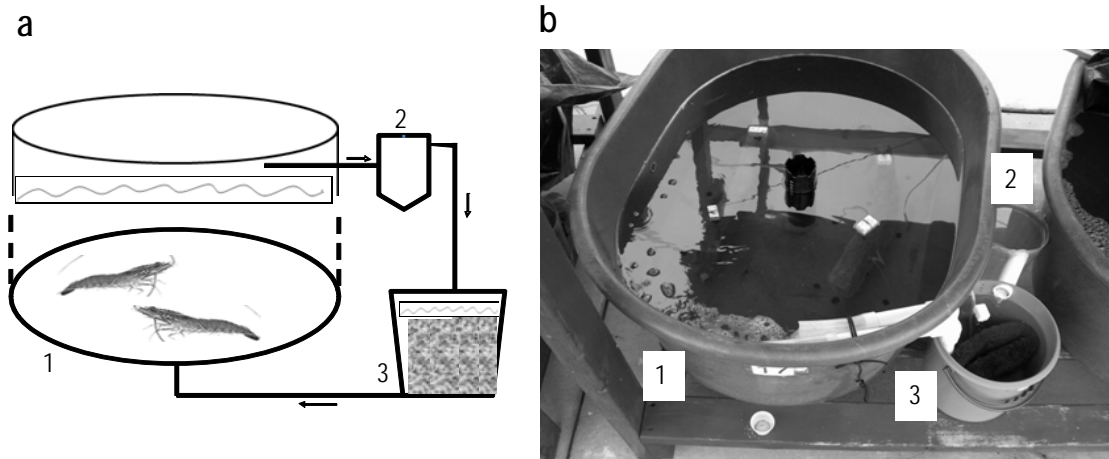


Figura 1. Sistema de recirculación para el cultivo de *L. vannamei*. a) diseño conceptual, b) imagen real. En ambas se observan los componentes del sistema: (1) estanque de cultivo, (2) hidrociclón y (3) depósito para el TaM. Las flechas indican la dirección del flujo del agua.

Figure 1. Recirculating system for *L. vannamei* culture. a), conceptual design, b) photograph. System components: (1) culture tank, (2) hydrocyclon and (3) TaM reservoir. Arrows indicated water flow.

A las variables de interés se les aplicó un escrutinio estadístico a partir del análisis de varianza de una y dos vías (Zar, 1984; Yamane, 1999), para datos uniformes y homoscedásticos o su valor transformado (Zar, 1984). Para el escrutinio *a posteriori* se utilizó la prueba de Student Newman-Keuls-SNK (Zar, 1984) con una confianza del 95% ($\alpha = 0,05$). Estos ensayos fueron realizados con el software ProStat 3.01 (Poly Software International, Inc.) y Statistical 5.5 (StatSoft, Inc.).

RESULTADOS

Tapetes microbianos

El tapete microbiano formado alcanzó una biomasa seca de $492,8 \pm 46 \text{ g m}^{-2}$. La comunidad microbiana inserta al TaM estuvo dominada por cianobacterias (*Phormidium* sp., *Oscillatoria* sp., *Lyngbya* sp., *Nostoc* sp., *Anabaena* sp. y *Chroococcus* sp.), diatomeas como (*Navicula* sp., *Amphora* sp. y *Pleurosygma* sp.), bacterias y en menor porcentaje el nemátodo *Plectus* sp., clorófitas (*Chloromonas* sp.), ciliados como *Euplote* sp. y *Balladyna* sp., euglenoides (*Phacus* sp.) y una especie de rotífero (Fig. 2).

Parámetros físicos y químicos en el agua

Los parámetros ambientales registrados en el agua del sistema experimental se observan en la Tabla 1. La temperatura promedio determinada a las 12 h del día fue $29^\circ\text{C} \pm 2$, la salinidad presentó un valor promedio de $34,88 \pm 0,48$. Estos factores mostraron una variabi-

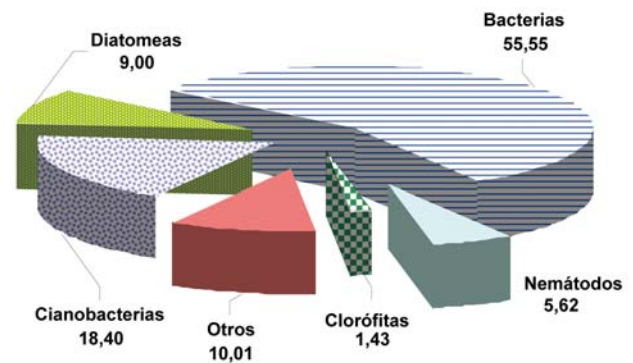


Figura 2. Estructura relativa (%) de la comunidad de los grupos taxonómicos mayores asociados a los tapetes microbianos construidos (TaM).

Figure 2. Relative structure (%) of the community of major taxonomic groups associated to the constructed microbial mats (TaM).

lidad similar entre sistemas tratados con TaM y controles ($p > 0,05$). Los cultivos con mayor densidad larval presentaron los niveles promedio menores de oxígeno disuelto (OD) (Tabla 1), en relación inversa a los niveles de menor densidad larval, ambos casos (60 y 120 ind m^{-2}) fueron superiores al compararse con las unidades de cultivo control. Las diferencias evaluadas representaron entre 29 y 36% ($40\text{-}55 \mu\text{M O}_2$), más OD en los sistemas con TaM que los controles (Tabla 1) y correspondieron al registro matutino (08 h AM).

En relación al pH, se registró persistentemente una diferencia entre los sistemas experimentales con TaM

Tabla 1. Valores promedio de los principales parámetros en el agua del cultivo intensivo de *L. vannamei* en el sistema de recirculación. El número entre paréntesis indica la desviación estándar. Los valores de las columnas de un mismo sistema de cultivo que comparten la misma letra no son significativos ($p > 0,05$).

Table 1. Mean values of relevant parameters in water of intensive culture *L. vannamei* in the recirculating system. The number in parentheses indicates standard deviation. Values in columns of the same culture system sharing same letter are not significant ($p > 0.05$).

| Sistema | Tratamiento | Temperatura (°C) | Salinidad (UPS) | pH | OD (mg L ⁻¹) | SST (mg L ⁻¹) | DBO (mg L ⁻¹) |
|-------------------------|-------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 60 ind m ⁻² | TaM | 30,1 (1,62) ^a | 34,59 (0,38) ^a | 7,63 (0,30) ^a | 6,63 (0,14) ^a | 20,36 (3,37) ^a | 1,36 (1,0) ^a |
| | Control | 30,3 (1,64) ^a | 34,7 (0,43) ^a | 8,42 (0,10) ^b | 4,87 (0,28) ^b | 57,19 (8,66) ^b | 4,94 (1,79) ^b |
| 120 ind m ⁻² | TaM | 30,2 (1,68) ^a | 34,9 (0,44) ^a | 7,40 (0,23) ^a | 5,69 (0,78) ^a | 45,62 (6,17) ^a | 1,97 (0,89) ^a |
| | Control | 30,2 (1,57) ^a | 35,2 (0,45) ^a | 8,36 (0,12) ^b | 4,41 (0,63) ^b | 123,09 (16,72) ^b | 8,05 (2,96) ^b |

y sus controles. En el agua de los tratamientos con TaM, el pH decreció con el tiempo en contraste a los controles en los sistemas con 60 y 120 ind m⁻² respectivamente (Tabla 1). Los valores promedio para los sistemas tratados con TaM variaron significativamente de los controles ($p < 0,05$).

El nivel de sólidos en las unidades experimentales se redujo drásticamente por efecto del hidrociclón (Fig. 1b), concentrando en él la mayor parte de sólidos (heces, alimento no consumido y ecdisis). El resto de los sólidos permaneció como suspendidos y/o disueltos. De estos sólidos suspendidos (SST), el agua de los sistemas con TaM registró los niveles más bajos, equivalentes a una tercera parte ($< 37\%$) de SST con respecto a los controles, tanto con 60 como 120 ind m⁻² ($p < 0,05$; Tabla 1). Esto ocurrió de manera simultánea al descenso en la DBO₅ del agua en los tratamientos con TaM, en contraposición a los controles. En el agua de los sistemas con TaM se registro una DBO₅ promedio de 1,36 y 1,97 mg O₂ L⁻¹, mientras que en los controles fue de 4,94 y 8,05 mg O₂ L⁻¹ para los tratamientos con 60 y 120 ind m⁻² respectivamente ($p < 0,05$; Tabla 1). Al final de la prueba (día 27), el agua del tratamiento control con 120 ind m⁻² registró una DBO₅ de 14,5 mg L⁻¹ mayor que el obtenido en el sistema con TaM.

En relación al fósforo reactivo (P-PO₄⁻³) se registró una tendencia al incremento conforme el cultivo envejece y a pesar que el agua de los sistemas con TaM presentó una concentración de fósforo ligeramente menor que los controles (Tabla 2), las diferencias encontradas no fueron significativas ($p > 0,05$).

La concentración del nitrógeno amoniacal (NAT) en los tratamientos con TaM registró valores de 0,84 y 1,09 mg N L⁻¹ en los sistemas con 60 y 120 ind m⁻² respectivamente (Tabla 2), magnitud que difiere

estadísticamente ($p < 0,05$) de sus respectivos controles (1,58 y 2,71 mg N L⁻¹). Sin embargo, el agua perteneciente a los tratamientos con tapete microbiano presentó valores de NAT sensiblemente más altos que los controles durante el inicio de la prueba (días 4 al 7). Este aumento en el NAT se registró como un incremento de la fracción inorgánica de nitrógeno en el sistema con TaM, tanto en 60 como 120 ind m⁻² (NID, Fig. 3), condición observada a lo largo del periodo experimental y que contrastó significativamente con los sistemas control.

La concentración promedio de nitritos registrada en el agua del sistema con TaM fue de 0,94 y 1,35 mg N L⁻¹ significativamente mayor que los controles 0,21 y 0,29 mg N L⁻¹, respectivamente para 60 y 120 ind m⁻² (Tabla 1, $p < 0,05$). Similarmente, la concentración de nitratos en el agua de los sistemas con TaM fue de 2,73 y 3,87 mg N L⁻¹, valores significativamente mayores a los controles de 0,32 y 0,45 mg N L⁻¹, respectivamente para 60 y 120 ind m⁻² ($p < 0,05$). En el agua tratada con TaM se produjo 750% más de nitratos que en los controles (Tabla 2) y fue evidente la tendencia progresiva hacia la acumulación (Fig. 3). El nivel de nitratos en los tratamientos con TaM representó el 77,9 y 84,4% del NID, condición que difirió de los controles (17,5 y 12,5%) para los sistemas con 60 y 120 ind m⁻² respectivamente (Fig. 3), en estos últimos el NAT constituyó la especie nitrogenada dominante.

Análisis biométrico del camarón

Del rendimiento en el camarón cultivado, fue notorio que en presencia de TaM los organismos presentaron mejores índices que aquellos del sistema control (Tabla 3). La tasa de crecimiento resultó significativamente mayor ($p < 0,05$) en los sistemas tratados con TaM que los controles, registrando los primeros un

Tabla 2. Concentración promedio de los parámetros químicos en los efluentes de cultivos intensivos de camarón en el sistema de recirculación. NAT: concentración de nitrógeno amoniacal. El número entre paréntesis indica la desviación estándar. Los valores de las columnas de un mismo sistema de cultivo que comparten la misma letra no son significativos ($p > 0,05$).

Table 2. Mean concentration of chemical parameters of intensive shrimp culture effluents in recirculating system. NAT: amoniacal nitrogen concentration. The number in parentheses indicates standard deviation. Values in columns of the same system of culture sharing same letter are not significant ($p > 0.05$).

| Sistema | Tratamiento | Fosfatos (mg P L ⁻¹) | NAT (mg N L ⁻¹) | Nitritos (mg N L ⁻¹) | Nitratos (mg N L ⁻¹) |
|-------------------------|-------------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 60 ind m ⁻² | TaM | 4,17 (2,16) ^a | 0,84 (0,53) ^a | 0,94 (0,45) ^b | 2,73 (1,40) ^b |
| | Control | 4,78 (2,07) ^a | 1,58 (0,87) ^b | 0,21 (0,17) ^a | 0,32 (0,21) ^a |
| 120 ind m ⁻² | TaM | 6,43 (2,99) ^a | 1,09 (0,67) ^a | 1,35 (0,98) ^b | 3,87 (1,76) ^b |
| | Control | 7,24 (3,05) ^a | 2,71 (1,66) ^b | 0,29 (0,19) ^a | 0,45 (0,35) ^a |

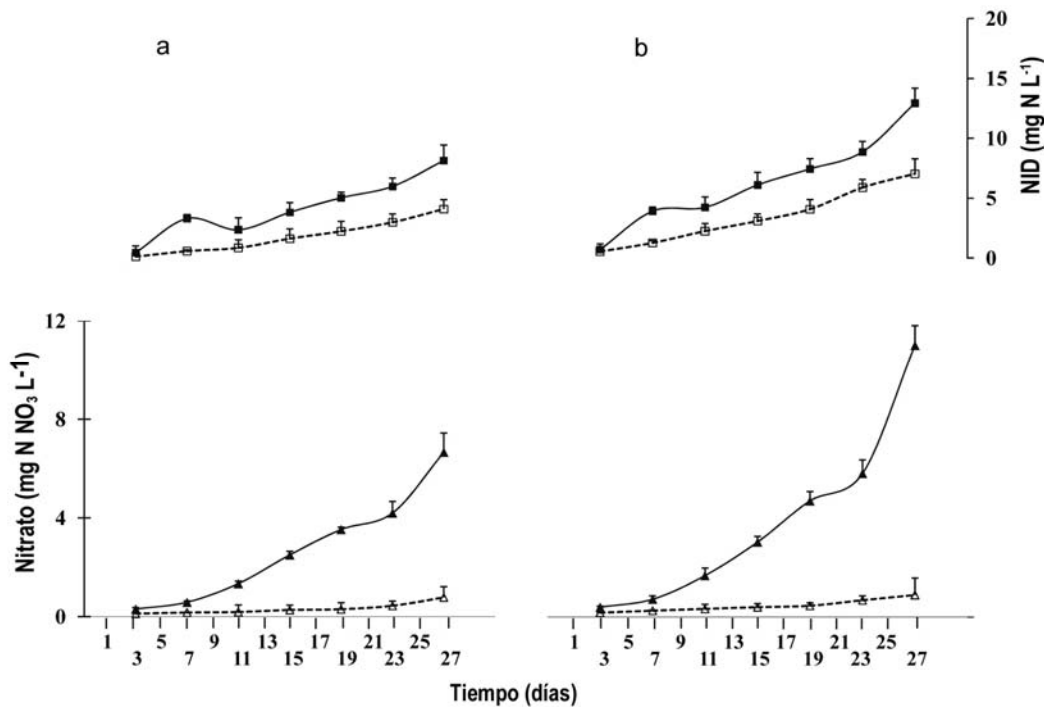


Figura 3. Fluctuación (3n; +DE) del nitrógeno inorgánico disuelto (NID: ■; TaM, □; control) y nitrato (N-NO₃⁻: ▲; TaM, Δ; control) en el agua del cultivo de camarón a una densidad de 60 ind m⁻² (a) y de 120 ind m⁻² (b).

Figure 3. Oscillation (3n; +SD) of dissolved inorganic nitrogen (DIN: ■; TaM, □; control) and nitrate (NO₃-N: ▲; TaM, Δ; control) in water from the intensive shrimp culture at 60 ind m⁻² (a) and 120 ind m⁻² (b).

aumento de 0,122 y 0,088 g d⁻¹ y los controles 0,085 y 0,063 g d⁻¹ para los sistemas con 60 y 120 ind m⁻² respectivamente (Tabla 3).

La sobrevivencia presentó diferencias estadísticas entre tratamientos (Tabla 3, $p < 0,05$), registrándose la mayor en los organismos pertenecientes a los sistemas tratados con TaM, con valores de 97,8 y 96,1%, mientras que en los controles fue de 81,1 y 70,6 para

los sistemas con 60 y 120 ind m⁻² respectivamente (Tabla 3).

Respecto al factor de conversión de alimento, los resultados obtenidos en los organismos cultivados en presencia de TaM registraron índices de 1,42 y 1,61, que fueron significativamente menores ($p < 0,05$), que los controles de 1,75 y 2,14 para los sistemas con 60 y 120 ind m⁻² respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Valores promedio ($n = 3$) de la tasa de crecimiento, sobrevivencia y factor de conversión de alimento en el camarón cultivado en el sistema de recirculación en presencia del TaM. ¹El número entre paréntesis indica la desviación estándar. ²Los valores de las columnas de un mismo sistema de cultivo que comparten la misma letra no son significativos ($p > 0,05$).

Table 3. Mean values ($n = 3$) of growth rate, survival and food conversion rate from shrimp culture in recirculating with TaM. ¹The number in parentheses indicates standard deviation. ²Values in columns of the same system of culture sharing same letter are not significant ($p > 0.05$).

| Sistema | Tratamiento | Tasa de crecimiento (g d ⁻¹) | Sobrevivencia ¹ (%) | FCA ² |
|-------------------------|-------------|---|-----------------------------------|--------------------------|
| 60 ind m ⁻² | TaM | 0,122 (0,015) ^a | 97,78 (1,93) ^a | 1,42 (0,08) ^a |
| | Control | 0,085 (0,010) ^b | 81,11 (1,93) ^b | 1,75 (0,18) ^b |
| 120 ind m ⁻² | TaM | 0,088 (0,014) ^a | 96,12 (0,96) ^a | 1,61 (0,23) ^a |
| | Control | 0,063 (0,011) ^b | 70,56 (2,55) ^b | 2,14 (0,29) ^b |

¹Datos transformados por la función arco seno ($x^{0,5}$) previo al escrutinio estadístico.

²Valores transformados por log (x) antes del análisis estadístico ($p < 0,05$).

¹The data were previously transformed by the arcsine function ($x^{0,5}$)

²The values were transformed by log (x) before statistical analysis ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

Estructura del TaM

El TaM formado a partir de las muestras colectadas con el procedimiento descrito, permitió obtener una biomasa máxima en peso seco sensiblemente inferior a reportes de consorcios de organismos en medio natural (Urmeneta *et al.*, 1998). La estructura del TaM tiene similitud a los reportes de Palmisano *et al.* (1989), López-Cortés *et al.* (2001), Buffan-Dubau *et al.* (2001) y Bachar *et al.* (2007), lo que permite suponer que las condiciones de cultivo del TaM fueron adecuadas para el desarrollo y madurez de los principales grupos taxonómicos insertos en el TaM, como ocurre en el medio natural.

Los organismos más abundantes insertos en el TaM (Fig. 2), corresponden a organismos cosmopolitas o comunes en la zona de colecta y de ambientes similares (Garate-Lizárraga *et al.*, 1990; López-Cortés, 1998; Paerl, 2000; López-Cortés *et al.*, 2001). Algunos géneros de estas microalgas se han utilizado biotecnológicamente en la remoción de derivados nitrogenados, fosfatados y carbonosos, como *Phormidium bohneri* (Dumas *et al.*, 1998), diatomeas, cianobacterias y ciliados (Thompson *et al.*, 2002), *Nitzschia* sp., *Navicula* sp., *Phormidium* sp. y clorófitas (Paniagua-Michel & García, 2003), *Oscillatoria* sp. (Bender *et al.*, 2004) y consorcios de cianófitas (Terry, 2005). Los resultados de este trabajo prueban que las microalgas colectadas en el medio natural toleran el

cultivo *in vitro* y mantienen la capacidad para mineralizar y/o remover compuestos nitrogenado generados por el cultivo del camarón. Mención aparte merece su potencial como alimento complementario para *L. vannamei*. La disposición de las especies en tapetes con estructura tridimensional, provee superficie y refugio adicional, lo cual contribuiría a eliminar el canibalismo, propio de *L. vannamei*.

Calidad física y química del agua

La temperatura y salinidad registrada en el agua de las unidades experimentales muestran una fluctuación tenue tanto en los sistemas con TaM como en los controles, con valores que oscilan dentro de niveles óptimos y/o recomendables para la producción del camarón (Whetstone *et al.*, 2003).

Con relación al oxígeno disuelto en el agua (OD), la concentración en los tratamientos con TaM fue superior que en los controles (Tabla 1), y no se determinaron niveles críticos de OD (Stern, 1984; Whetstone *et al.*, 2002). Los valores obtenidos en presencia de TaM durante el día comprueban la producción de oxígeno atribuida a la comunidad fotosintética en los consorcios (Bender *et al.*, 2004), a diferencia de los sistemas control (sin TaM). Esta capacidad de oxigenación sugiere que hasta cierto nivel de cultivo, la comunidad fotoautótrofa inserta en los tapetes microbianos es capaz de producir el oxígeno necesario para sustentar la biomasa cultivada y el requerido durante la nitrificación (Komaros &

Lyberatos, 1998; Bratvold & Browdy, 2001; Bender *et al.*, 2004). Esto también representa una alternativa importante en la reducción del impacto ambiental de los efluentes de camarón en virtud que el TaM, además de oxigenar el agua residual, colabora en la reducción de la DBO₅, variable que después de la cosecha alcanza niveles críticos (Costanzo *et al.*, 2004; Handy *et al.*, 2004).

Los niveles de SST y de DBO₅ obtenidos en presencia de TaM son reportados como deseables (Whetstone *et al.*, 2002) e inferiores al obtenido por Cohen *et al.* (2005). La reducción de los SST tiene una estrecha relación con la DBO, siendo los residuos particulados (SST) el mayor aporte para la DBO (Chen *et al.*, 1991). La disminución de estas variables sugiere la presencia de micro-heterótrofos en el TaM (hasta $1,8 \times 10^6$ cél cm⁻²) y organismos como *Plectus* sp. y *Euplote* sp. que degradan el material orgánico particulado (Liu & Han, 2004; Thompson *et al.*, 2002). Esta condición incide en el contenido de nitrógeno y fósforo orgánico disuelto que finalmente es mineralizado por las comunidades de quimioautótrofos, principalmente bacterias nitrificantes (Kirchman, 1990) hasta amonio, fosfatos y carbono, especies inorgánicas que llegan a ser consumidas por las microalgas libres o en bio-películas y consorcios microbianos (Thompson *et al.*, 2002; Paniagua-Michel & García, 2003).

La ausencia de un proceso de remoción de sólidos disueltos y DBO₅ en los sistemas control originó una demanda de oxígeno para oxidar el material orgánico (DBO₅) en el agua de los tratamientos con 60 y 120 ind m⁻² en este orden, lo que representó el 99,4 y 182,5% del oxígeno disponible respectivamente (Tabla 1), condición contrapuesta a los sistemas con TaM que requieren como DBO₅ entre el 21 y 34% del OD. Al final del periodo experimental la demanda de oxígeno en los sistemas control fue igualmente crítica. De manera similar, los SST en los sistemas con TaM representan menos de una tercera parte de SST estimados en agua de los controles. La reducción de SST y DBO entre tratamientos fue notoria visualmente, los controles presentaron espuma en alrededor del 45-70% de la superficie del agua todo el día, mientras que los tratamientos con TaM presentaban una espuma fugaz solo a la salida del elevador de agua ("air lift", Fig. 1b).

En el agua de los tratamientos con TaM, la demanda bioquímica de oxígeno junto con el nivel de sólidos suspendidos, representan las variables con diferencias más consistentes a lo largo de este experimento. Estas diferencias revelan el potencial del TaM para mejorar la calidad del agua de cultivo y de los efluentes, evitando así que las aguas receptoras y

las del cultivo mismo, abatan su capacidad de carga y el deterioro ulterior del ecosistema (Páez-Osuna *et al.*, 1997).

En relación al fósforo reactivo (PO₄⁻³), el nivel registrado en el agua de los sistemas con TaM (a cualquier densidad) resultó menor que sus controles, sin embargo la diferencia no fue significativa (Tabla 2, $p > 0,05$). Además, es evidente una tendencia al incremento conforme el cultivo envejece, lo cual coincide con Thakur & Lin (2003). Asimismo, se aprecia una relación directa entre la biomasa cultivada y la concentración de fósforo (Tabla 2), esto sugiere que el incremento es originado por los aportes de fósforo en la dieta, producto de un balanceo inadecuado como lo reportan McIntosh *et al.* (2001). Adicionalmente a este hecho, Thakur & Lin (2003) reportan que menos del 20% del fósforo proporcionado en el alimento es incorporado al camarón, lo cual revela el riesgo potencial que pueden representar los efluentes del cultivo de esta crustáceo con niveles ricos en fósforo.

La concentración promedio del NAT en el agua de los tratamientos con TaM muestra valores reportados como seguros (Whetstone *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2004) y significativamente menores a sus controles ($p < 0,05$; Tabla 2). A pesar de que durante el inicio de la prueba, el agua de los sistemas con TaM presenta una concentración de amonio mayor que los controles, lo que magnifica la fracción inorgánica de nitrógeno - NID, que permanece en aumento constante (Fig. 3). La progresión del NID pone de manifiesto la mineralización del material orgánico disuelto (MOD) que acontece en el agua de los sistemas con TaM, proceso común en aguas marinas eutróficas (Burford & Williams, 2001; Liu & Han, 2004). Esta condición, que contrasta con los sistemas control en este periodo y a largo de toda la fase experimental, sugiere que la mineralización del MOD transcurre de forma activa y permanente debido a la comunidad microbiana inserta en el TaM, que promueve la reducción de la DBO₅ y los SST, y reduce la cantidad de espuma y aumenta la transparencia (Paniagua-Michel & García, 2003).

La concentración de nitrito y nitrato observada en el agua de los sistemas con TaM fue mayor a sus controles ($p < 0,05$; Tabla 2). Sin embargo, el nivel promedio de estos iones en el tratamiento con TaM fue similar a los reportes de Tseng *et al.* (1998) y Bratvold & Browdy (2001), pero inferior en ion nitrito a Cohen *et al.* (2005). La concentración de nitrato registra un aumento conforme el cultivo progresa y madura, se observa una clara sucesión entre NAT, nitrito y nitrato. Seguido del incremento constante del TAN (Fig. 3, como NID), alrededor del día 5 aparecen los nitritos, los cuales persisten hasta los días 20-21.

Paralelamente, entre los días 7 y 9, surge el ión nitrato cuya producción en el agua tiende a acumularse hasta el final de la fase experimental (Fig. 3). Esta sucesión entre especies del NID, prueba el proceso de nitrificación que oxida el nitrógeno amoniacal hasta la formación de ión nitrato pasando por nitrito (Hirayama, 1974; Hagopian & Riley, 1998). Esta etapa es atribuida exclusivamente a microorganismos autótrofos, específicamente bacterias amonio oxidantes -BAO; tipo *Nitrosomonas* y bacterias nitrito oxidantes -BNO; tipo *Nitrobacter* (Hagopian & Riley, 1998; Timmons *et al.*, 2002).

La nitrificación persistente en el sistema con TaM sugiere que la biomasa nitrificante estuvo activa desde el inicio y a lo largo del experimento (Fig. 3), en contraposición a los controles en los cuales este proceso acontece de forma retardada, como ocurre normalmente en los sistemas acuáticos nuevos, en los cuales el desarrollo de nitrificantes requiere entre 7 y 8 semanas (Hirayama, 1974; Mevel & Chamroux, 1981; Timmons *et al.*, 2002; Cohen *et al.*, 2005).

La nitrificación a pesar de ser proceso exergónico (Hagopian *et al.*, 1998), tiene limitantes fisicoquímicas; cada gramo de NAT oxidado hasta nitrato demanda un gasto de 7,14 g de alcalinidad (como CaCO_3 , Timmons *et al.*, 2002), esto explica el descenso de aproximadamente una unidad de pH en el agua de los sistemas con TaM con 60 y 120 ind m^{-2} , proceso normal durante el progreso de la nitrificación (Ebeling *et al.*, 2006; Van Rijn *et al.*, 2006). Sin embargo, esta condición provocó que durante los días 17-19 la concentración de nitrito aumentara súbitamente a valores fuera de los límites seguros para el cultivo de camarón (Whestone *et al.*, 2002), además de observar que la formación de nitrato no progresaba (Fig. 3). La solución para una crisis de esta índole en sistemas de producción de camarón habría sido la adición sistemática de alcalinidad (Hirayama, 1974; Loyless & Malone, 1997). En este estudio con el fin de probar el TaM a su máxima capacidad, se optó por aumentar el recambio de agua en todos los sistemas (Mishra *et al.*, 2008), del 1 al 2,5% por día para agregar alcalinidad al sistema, esto permitió relajar paulatinamente la acumulación de nitritos prosiguiendo la acumulación del nitrato hasta el final del periodo experimental (Fig. 3, días 23-27).

La elevada producción de nitrato sugiere que el proceso de remoción del TAN fue mayormente vía nitrificación en lugar de la asimilación/metabolismo. Esta actividad atribuida a la comunidad inserta en el TaM, fue capaz no solo de transformar todo el TAN producido metabólicamente por el organismo cultivado, sino también el procedente de la mineralización del nitrógeno orgánico presente en el sistema

(alimento no consumido y heces). En este trabajo no se evaluó la reducción desasimilatoria de nitrato en amonio (RDNA), de acuerdo a los resultados y a las condiciones de cultivo (temperatura, acumulación de nitrato y niveles de oxígeno disuelto), no favorecen la desnitrificación por ninguna de las vías del RDNA la cual puede considerarse como inhibida.

Finalmente, la nitrificación en el interior del TaM no se vio afectada por la carga carbonosa (DBO_5) como acontece en las películas microbianas (biofilm), en las cuales los heterótrofos dominan por inhibición competitiva sobre los nitrificantes (Cheng *et al.*, 1995; Zhu & Chen, 2001). Esto refleja la complejidad estructural que logran los tapetes microbianos, *viz*, su capacidad metabólica para degradar compuestos orgánicos e inorgánicos por vías independientes (Phillips *et al.*, 1994; Bender *et al.*, 2004), de manera individual y/o simultáneamente.

Parámetros biométricos del camarón

La tasa de crecimiento mayor y sobrevivencia así como el factor de conversión menor de alimento fueron registrados en los tratamientos con tapetes microbianos ($p < 0,05$). La sobrevivencia registrada en los sistemas con TaM ($> 96,1\%$) es superior a la obtenida por Tseng *et al.* (1998), quienes reportan valores entre 75,9 y 60,3% para una densidad de cultivo de 80 y 160 ind m^{-2} respectivamente y de Thakur & Lin (2003) con 78% en cultivos de 50 ind m^{-2} y comparable con Otoshi *et al.* (2003).

Lo anterior indica que la presencia del TaM influye positivamente en el mejoramiento de la calidad del agua en beneficio del organismo cultivado (Neori *et al.*, 2004), en particular de parámetros como SST, DBO_5 y el NAT, que colaboran en la reducción del estrés físico y químico (Kir & Eroldogan, 2004; Cheng *et al.*, 2004). El crecimiento y sobrevivencia registrados en los tratamientos con TaM (Tabla 3), permite considerar que los consorcios microbianos pueden mejorar los índices de rendimiento de *L. vannamei* aún en altas densidades, ya que incrementan la capacidad de carga del sistema (Mishra *et al.*, 2008), condición que comúnmente limita estos índices cuando se cultiva en densidades altas (Davis & Arnold, 1998; Arnold *et al.*, 2005).

Desde una perspectiva ambiental, los resultados obtenidos demuestran que los tapetes microbianos (TaM) disminuyen la carga amoniacal (71-80%) y carbonosa (68-79%), de efluentes provenientes de cultivos intensivos de camarón, con lo cual se reducen los posibles impactos en el ambiente una vez que los efluentes alcanzan su destino final. Además, su inclusión dentro del sistema de cultivo contribuye en el mejoramiento de la calidad del agua, manteniendo

niveles aceptables de NAT, nitritos, DBO₅ y SST con un reducido recambio de agua.

Se comprobó el potencial biotecnológico de los microorganismos colectados en el medio natural, la efectividad del TaM para remover xenobióticos se basó no solo en su estructura y función, sino también a su integración en el sistema de recirculación (SR) diseñado *ex-profeso*, que albergó el TaM sumergido dentro del contenedor (Fig. 1b) y posterior al hidrociclón, lo que permitió mantener la biomasa microbiana y microalgal activa en contacto con el agua, y que contribuyó a evitar que fuera contaminado por insectos o residuos propios del cultivo (Bender *et al.*, 2004; Terry, 2005).

Esta biotecnología es innovadora, económica y ambientalmente compatible para reutilizar el agua de cultivo a la escala y en las condiciones experimentadas. Actualmente, no existen iniciativas que consideren la integración de tapetes microbianos como los desarrollados en este trabajo en el tratamiento de efluente y el co-cultivo de *Litopenaeus vannamei* en un sistema de recirculación.

En la aplicación de humedales para el tratamiento de efluentes, que dista mucho de nuestro desarrollo, su componente vascular incide preferencialmente en los nutrientes particulados de la columna de agua, y marginalmente en los disueltos y por lo general están orientados hacia condiciones extensivas de acuerdo a la biomasa que pueden sustentar e inciden preferencialmente en calidad del agua. Además, por su condición de sistema expuesto, por lo general, no considera la densidad de la biomasa de camarón, sino los tiempos de retención hidráulica. En el sistema de recirculación propuesto con tapetes microbianos, se expone durante 24 h una biomasa elevada de microorganismos bio-remediadores a los nutrientes disueltos (heces y alimento) y busca conciliar calidad del agua con capacidad de carga.

Un sistema que pudiera presentar cierta analogía con el propuesto, podría ser el de reactores nitrificantes, sin embargo estos reactores están limitados por la componente microalgal que colabora en la emisión de oxígeno fotosintético en los tapetes microbianos y colabora en el proceso aerobio de nitrificación de los tapetes e indirectamente son complemento alimentario y refugio para los camarones. Estas ventajas difícilmente pueden conciliarse y obtenerse en los reactores nitrificantes. El desarrollo de sistemas basados en tapetes microbianos es de baja energía, el soporte utilizado (polyester de baja densidad) es de fácil acceso en establecimientos comerciales y su costo público a nivel de menudeo es *ca.* US\$ 5/m².

El concepto desarrollado puede aplicarse a una escala superior de sistema de producción si se consideran aspectos como recambio de agua y densidad de postlarvas de acuerdo a la superficie de tapetes microbianos, aspectos importantes para una capacidad de carga adecuada del sistema a nivel de estanque o tanque de cultivo en condiciones intensivas o hiperintensivas.

AGRADECIMIENTOS

Carlos Lezama Cervantes fue becado por el programa de posgrado PROMEP de SEP-México y a través del proyecto CICESE-JPM, Bioprospección y bioactividad de metabolitos y recursos marinos costeros. Expresamos nuestro agradecimiento a los Drs. Fernando Díaz y Manuel Acosta por permitir el uso de las instalaciones para el cultivo del camarón, así como al oceanólogo Enrique Félix y personal de la Granja Acuícola Vizomar.

Agradecemos la valiosa revisión y atinadas sugerencias de dos árbitros anónimos que contribuyeron a mejorar este artículo.

REFERENCIAS

- Abeyasinghe, D.H., A. Shanableh & Ridgen B. 1996. Biofilters for water reuse in aquaculture. *Water Sci. Technol.*, 34: 253-260.
- Agraz-Hernández, C.M. 1999. Reforestación experimental de manglares en ecosistemas lagunares estuarinos de la costa noroccidental de México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, 136 pp.
- American Public Health Association (APHA). 1995. Standard Methods for the examination of water and wastewater. APHA-AWWA-WPCF. Washington, D. C., 1108 pp.
- Arnold, S.A., M.J. Sellars, P.J. Crocos, & G.J. Coman. 2005. Response of juvenile brown tiger shrimp (*Penaeus esculentus*) to intensive culture conditions in a flow through tank system with three dimensional artificial substrate. *Aquaculture*, 246: 231-238.
- Bachar, A., E. Omoregie, R. De Wit & H.M. Jonkers. 2007. Diversity and function of chloroflexus-like bacteria in a hypersaline microbial mat: phylogenetic characterization and impact on aerobic respiration. *App. Environ. Microb.*, 73: 3975-3983.
- Bender, J., R. Lee, M. Sheppard, K. Brinkley, P. Phillips, Y. Yeboah & R.C. Wah. 2004. A waste effluent treatment system based on microbial mats for black sea bass *Centropristis striata* recycled-water mariculture. *Aquacult. Eng.*, 31: 73-82.

- Boyd, C.E. & D. Gautier. 2000. Effluent composition and water quality standards. *Glob. Aquacul. Advoc.*, 3: 61-66.
- Bratvold, D. & C.L. Browdy. 2001. Effects of sand sediment and vertical surfaces (Aqua Mats) on production, water quality, and microbial ecology in an intensive *Litopenaeus vannamei* culture system. *Aquaculture*, 195: 81-94.
- Buffan-Dubau, E., O. Pringault, & R. de-Wit. 2001. Artificial cold-adapted microbial mats cultured from Antarctic lake samples. 1. Formation and structure. *Aquat. Microb. Ecol.*, 26: 115-125.
- Burford, M.A. & K.C., Williams. 2001. The fate of nitrogenous waste from shrimp feeding. *Aquaculture*, 198: 79-93.
- Chen, S., D. Coffin & R. Malone. 1991. Sludge management for recirculating aquaculture systems. Workshop on design of high density recirculating aquacultural systems. Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana. Sep 25-27, pp. 36-43.
- Cheng, S., W. Lee, L. Shieh & J. Chen. 2004. Increased production and excretion of urea in the kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) exposed to combined environments of increased ammonia and nitrite. *Arch. Environ. Con. Tox.*, 47: 352-362.
- Cheng, T., Y. Fu & P. Bishop. 1995. Competition for substrate and space in biofilms. *Water Environ. Res.*, 67: 992-1003.
- Cohen, J.M., T.M. Samocha, J.M. Fox, R.L. Gandy & A.L. Lawrence. 2005. Characterization of water quality factors during intensive raceway production of juvenile *Litopenaeus vannamei* using limited discharge and biosecure management tools. *Aquacult. Eng.*, 32: 425-442
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONA PESCO). 2005. Minuta del acuerdo 04/200205/033. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. Comité Técnico de la CONAPESCO-SAGARPA, México, 3 pp.
- Costanzo, S.D., M.J. O'Donohue & W. Dennison. 2004. Assessing the influence and distribution of shrimp pond effluent in a tidal mangrove creek in north-east Australia. *Mar. Pollut. Bull.*, 48: 514-525.
- D'Amelio E.D., Y. Cohen & D. Des Marais. 1989. Comparative functional ultrastructure of two hypersaline submerged cyanobacterial mats: Guerrero Negro, Baja California Sur, Mexico and Solar Lake Sinai, Egypt. In: Y. Choen & E. Rosemberg (eds.). *Microbial mats: physiological ecology of benthic microbial communities*. American Society of Microbiology, Washington, DC, pp. 97-113.
- Davis, D.A. & C.R., Arnold, 1998. The design, management and production of a recirculating raceway system for the production of marine shrimp. *Aquacult. Eng.*, 17: 193-211.
- Dumas, A., G. Laliberte, P. Lessard & J. de la Noüe. 1998. Biotreatment of fish farm effluents using the cyanobacterium *Phormidium bohneri*. *Aquacult. Eng.*, 17: 57-68.
- Ebeling, J.M., M.B. Timmons, & J.J. Bisogni. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257: 346-358.
- Ferris, M.J. & D.M. Ward. 1997. Seasonal distributions of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Appl. Environ. Microb.*, 63: 1375-1381
- Gárate-Lizarraga, I., D.A. Sequeiros-Beltrones & C.H. Lechuga-Devéze. 1990. Estructura de las asociaciones microfitoplantónicas en la región central del Golfo de California en el otoño de 1986. *Cienc. Mar.*, 16: 131-153.
- Granados-Machuca, C. 1999. Inmovilización e identificación pigmentaria en tapetes microbianos artificiales. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California, México, 64 pp.
- Hagopian, D.S. & J.G. Riley. 1998. A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquacult. Eng.*, 18: 223-244.
- Handy, M., T.M. Samocha, S. Patnaik, R.L. Gandy & D.A. McKee. 2004. Nursery trial compares filtration system performance in intensive raceways. *Global Aquacult. Advoc.*, 8: 77-79.
- Hirayama, K. 1974. Water control by filtration in closed culture systems. *Aquaculture*, 4: 369-385.
- Kim, J.K., B. Lee, S. Kim & J. Moon. 1999. Characterization of denitrifying photosynthetic bacteria isolated from photosynthetic sludge. *Aquacult. Eng.*, 19: 179-193.
- Kinne, P., T. Samocha, E. Jones & C. Browdy. 2001. Characterization of intensive shrimp pond effluent and preliminary studies on biofiltration. *N. Am. J. Aquacult.*, 63: 25-33.
- Kir, M. & O. Eroldogan. 2004. Effects of temperature on acute toxicity of ammonias to *Peaneus semscalatus* juveniles. *Aquaculture*, 241: 479-489.
- Kirchman, D. 1990. Limitation of bacterial growth rates by dissolved organic matter in the subarctic Pacific. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 62: 47-54.
- Komarov, M. & G. Lyberatos. 1998. Kinetic modeling of *Pseudomonas denitrificans* growth and denitrification under aerobic, anoxic and transient operating conditions. *Water Res.*, 32: 1912-1922.

- Liu, F. & W. Han. 2004. Reuse strategy of wastewater in prawn nursery by microbial remediation. *Aquaculture*, 230: 281-296.
- López-Cortés, A. 1998. Ecología y biotecnología de las comunidades microbianas. *Cienc. Des.*, México, 138: 11-17.
- López-Cortés, A., F. García-Pichel, U. Nübel & R. Vázquez-Juárez. 2001. Cyanobacterial diversity in extreme environments in Baja California, Mexico: a polyphasic study. *Int. Microbiol.*, 4: 227-236.
- Losordo, T.M., M.P. Masser & J. Rakocy. 1998. Recirculating aquaculture tank production systems. An overview of critical considerations. SRAC, USDA, USA, 6 pp.
- Loyless, J.C. & R.F. Malone. 1997. A sodium bicarbonate dosing methodology for pH management in freshwater-recirculating aquaculture systems. *Progr. Fish Cult.*, 59: 198-205
- McIntosh, D., T.M. Samocha, E.R. Jones, A.L. Lawrence, D.A. McKee, S. Horowitz & A. Horowitz. 2001. The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. *Aquacult. Eng.*, 21: 215-227.
- Mevel, G. & S. Chamroux. 1981. A study on nitrification in the presence of prawn (*P. japonicus*) in marine closed system. *Aquaculture*, 23: 29-43.
- Mishra, J., T. Samocha, S. Patnaik, M. Speed, R. Gandy & A.M. Ali. 2008. Performance of an intensive nursery system for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, under limited discharge condition. *Aquacult. Eng.*, 38: 2-15.
- Neori, A., T. Chopin, M. Troell, A.H. Buschmann, G.P. Kraemer, C.H. Halling, M. Shpigel & Ch. Yarish. 2004. Integrated aquaculture: rationale evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture*, 231: 361-391.
- Neori, A., M. Shipigel & D. Ben Ezra. 2000. A sustainable integrated system for culture of fish seaweed and abalone. *Aquaculture*, 186: 279-291.
- Otoshi, C., S. Arce & S. Moss. 2003. Growth and reproductive performance of broodstock shrimp reared in a biosecure recirculating aquaculture system versus a flow-through pond. *Aquacult. Eng.*, 29: 93-107.
- Paerl, H.W., J.L. Pinckney & T.F. Steppe. 2000. Cyanobacterial and bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments. *Environ. Microbiol.*, 2: 11-26.
- Páez-Osuna, F., S.R. Guerrero-Galván, A.C. Ruiz-Fernández & R. Espino-Angulo. 1997. Fluxes and mass balances of nutrients in a semi-intensive shrimp farm in Northwest México. *Mar. Pollut. Bull.*, 34: 290-297.
- Palmisano, A., S. Cronin & J. Des Marais. 1989. Analysis of lipophilic pigments from a phototrophic microbial mat community by high performance liquid chromatography. NASA-TM-101278. Unclass 2709 01. California, USA, 20 pp.
- Paniagua-Michel, J. & O.G. García. 2003. *Ex-situ* bioremediation of shrimp culture effluent using constructed microbial mats. *Aquacult. Eng.*, 28: 131-139.
- Parsons, T.R., Y. Maita & C.M. Lilly. 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press, London, 173 pp.
- Pérez-Farfante, I. & B. Kensley. 1997. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. *Mém. Mus. Natl. Hist. Nat.*, Paris, 175: 1-234.
- Phillips, P., J. Bender, J. Word, D. Niyogi & B. Donovan. 1994. Biodegradation of naphthalene, phenanthrene, chrysene and hexadecane with constructed silage -microbial mats. In: R.E. Hincee, D.B. Anderson, F.B. Meeting & G.D. Sayles (eds.). Applied biotechnology for site remediation. Lewis Publications, Boca Raton, pp. 305-309.
- Ramos, R., L. Vinatea & R. da Costa. 2008. Tratamiento de efluentes del cultivo de *Litopenaeus vannamei* por sedimentación y filtración por la ostra *Crassostrea rhizophorae*. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 36: 235-244.
- Stern, S., A. Borut & D. Cohen. 1984. The effect of salinity and ion composition on oxygen consumption and nitrogen excretion of *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 79: 271-274.
- Teichert-Coddington, D.R., D.B. Rouse & C.E. Boyd. 1999. Treatment of harvest discharge from intensive shrimp ponds by settling. *Aquacult. Eng.*, 19: 147-161.
- Terry, J.L. 2005. Microbial mats remove nitrogen, phosphorous from aquaculture effluents. *Global Aquacul. Advoc.*, June: 54-55.
- Thakur, D.P. & C.K. Lin. 2003. Water quality and nutrient budget in closed shrimp (*Penaeus monodon*) culture systems. *Aquacult. Eng.*, 27: 159-176.
- Thompson, F.L., P.C. Abreu & W. Wasielesky. 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture*, 203: 263-278.
- Timmons, M., J. Ebeling, F. Wheaton, S. Summerfelt & B.D. Vinci. 2002. Recirculating Aquaculture System.

- NRAC Publication No 001-002, Ithaca, New York, 769 pp.
- Trott, L.A. & D.M. Alongi. 2000. The impact of shrimp pond effluent on water quality and phytoplankton biomass in a tropical mangrove estuary. *Mar. Pollut. Bull.*, 40: 947-951.
- Tseng, K. & K. Wu. 1998. Culture of *Penaeus monodon* in a recirculating system. *Aquacult. Eng.*, 17: 138-147.
- Urmeneta, J., O. Alcoba, E. Razquín, E. Tarroja, A. Navarrete & R. Guerrero. 1998. Oxygenic photosynthesis and respiratory activity in microbial mats of the Ebro Delta, Spain, by oxygen exchange method. *Curr. Microbiol.*, 37: 151-155.
- Van Rijn, J., Y. Tal & H.J. Schreier. 2006. Denitrification in recirculating systems: theory and applications. *Aquacult. Eng.*, 34: 364-376.
- Velasco, M., A.L. Lawrence & F.L. Castille. 1999. Effects of variations in daily feeding frequency and ration size on growth of shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone), in zero exchange culture system. *Aquaculture*, 179: 141-148.
- Whetstone, J.M., G.D. Treece, C.L. Browdy & A.D. Stokes. 2002. Opportunities and constraints in marine shrimp farming. SRAC, USDA, USA, 8 pp.
- Yamane, T. 1999. Estadística. Oxford University Press, Harla-México, 771 pp.
- Zamora-Castro, J., J. Paniagua-Michel & C. Lezama-Cervantes. 2008. A novel approach for bioremediation of a coastal marine wastewater effluent based on artificial microbial mats. *Mar. Biotechnol.*, 10: 181-189.
- Zar, J.H. 1984. Biostatistical analysis. Prentice-Hall, New York, 718 pp.
- Zhu, C.J. & Y.K. Lee. 1997. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *J. Appl. Phycol.*, 9: 189-194.
- Zhu, S. & S. Chen. 2001. Effects of organic carbon on nitrification rate in fixed film biofilters. *Aquacult. Eng.*, 25: 1-11.

Received: 19 March 2009; Accepted: 15 December 2009

