



TÍTULO

**UTILIZACIÓN DE BACTERIAS NITRIFICANTES COMO
BIORREMEDIADORAS DEL AGUA DE CULTIVO DE
Litopenaeus vannamei EN TUMBES, PERÚ**

AUTOR

Óscar Augusto Mendoza Neyra

Esta edición electrónica ha sido realizada en 2010
Director / Tutor Cayo Juan Ramos Rodríguez
Curso Programa Interuniversitario de Doctorado en Biotecnología
2007-2009
ISBN 978-84-693-3767-7
© Óscar Augusto Mendoza Neyra
© Para esta edición, la Universidad Internacional de Andalucía



Reconocimiento-No comercial-Sin obras derivadas 2.5 España.

Usted es libre de:

- Copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra.

Bajo las condiciones siguientes:

- **Reconocimiento.** Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciador (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o apoyan el uso que hace de su obra).
- **No comercial.** No puede utilizar esta obra para fines comerciales.
- **Sin obras derivadas.** No se puede alterar, transformar o generar una obra derivada a partir de esta obra.

- *Al reutilizar o distribuir la obra, tiene que dejar bien claro los términos de la licencia de esta obra.*
- *Alguna de estas condiciones puede no aplicarse si se obtiene el permiso del titular de los derechos de autor.*
- *Nada en esta licencia menoscaba o restringe los derechos morales del autor.*



UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE ANDALUCIA
Sede Iberoamericana de La Rabida

Programa Interuniversitario de Doctorado en Biotecnología
2007-2009

**Utilización de bacterias nitrificantes como
biorremediadoras del agua de cultivo de
Litopenaeus vannamei en Tumbes - Perú**

Memoria de periodo de investigación presentada para superar la fase
de capacidad investigativa

Elaborada por:
OSCAR AUGUSTO MENDOZA NEYRA

Tutor:
Dr. CAYO JUAN RAMOS RODRÍGUEZ

La Rabida, España

2009

AUTORIZACION



Sede
Iberoamericana
Santa María de La
Rábida



PROGRAMA INTERUNIVERSITARIO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA

AUTORIZACIÓN DE PRESENTACIÓN DE MEMORIA DE INVESTIGACIÓN

D. **CAYO JUAN RAMOS RODRÍGUEZ**, profesor titular de la Universidad de Málaga, hace constar que:

D. **OSCAR AUGUSTO MENDOZA NEYRA**, ha realizado bajo mi dirección el periodo de investigación en la línea Biotecnología ambiental, con el tema "**Utilización de bacterias nitrificantes como biorremediadoras del agua de cultivo de *Litopenaeus vannamei* en Tumbes – Perú**".

Y, por tanto, autoriza la presentación de la memoria de investigación y considera **APTO** para su defensa.

Málaga, 17 de septiembre de 2009

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Cayo Ramos', written over a horizontal line.

Cayo Ramos

Fdo. Director de tesis

Certificado de realización del estudio



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA

25
Años
BODAS DE PLATA
1984 - 2009

“AÑO DE LA UNION NACIONAL FRENTE A LA CRISIS EXTERNA”

vannamei, TUMBES”; trabajo aprobado con Resolución

CONSTANCIA

EL DECANO DE LA FACULTAD DE INGENIERIA PESQUERA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES, que suscribe:

HACE CONSTAR:

Que, el **M. Sc. OSCAR AUGUSTO MENDOZA NEYRA**, docente principal de la Facultad de Ingeniería Pesquera de la Universidad Nacional de Tumbes, ha desarrollado desde el 17 de junio al 17 de agosto del año en curso, en el Laboratorio de Acuicultura I, el trabajo de investigación:

“UTILIZACIÓN DE BACTERIAS NITRIFICANTES COMO BIORREMIADORAS DEL AGUA DE CULTIVO DE *Litopenaeus vannamei* EN TUMBES - PERÚ; trabajo aprobado con Resolución Rectoral N° 824-2008/UNT-R, modificada con Resolución Rectoral N° 206-2009/UNT-R.

Es así como consta en los archivos y registros de esta Facultad, a los cuales me remito en caso necesario.

Se expide la presente, a solicitud del interesado, para los fines que estime convenientes.

Puerto Pizarro, 21 de agosto de 2009



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE INGENIERIA PESQUERA
Marco Antonio Zapata Cruz
Ing. Marco Antonio Zapata Cruz
DECANO

C.c. :
- Archivo
MAZC/Decano
Argentina B

Argentina B

AGRADECIMIENTO

A la empresa de producción de larva de camarón MarinaAzul

Un especial agradecimiento al Dr. Cayo Juan Ramos Rodríguez, quien tuvo a bien, aceptar ser tutor del presente trabajo de investigación.

A un dilecto amigo M. Sc. Benoit Diringer, por el apoyo incondicional en el presente trabajo y sobre todo por las sugerencias hechas para mejorar la idea.

A la Br. Yovani Rosales Maceda, quien realizó los análisis de PCR.

A los colaboradores directos en el experimento, Ing. Gerardo Panta Farfán, a la estudiante Milagros Guevara Nuñez y al Br. Pablo Preciado Neyra, sin ellos no se hubiera podido culminar con éxito este trabajo.

A los que de alguna manera directa e indirectamente, colaboraron con el estudio.

A todos ustedes, amigos; ¡Muchas gracias!

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi esposa e hijos, quienes
son la fuente de mi inspiración

RESUMEN

El presente informe reporta los resultados obtenidos en el trabajo de investigación cuyo título es Utilización de bacterias nitrificantes como biorremediadoras del agua de cultivo de *Litopenaeus vannamei* en Tumbes - Perú, llevado a cabo del 17 de junio al 17 de agosto del año 2009, en la Facultad de Ingeniería Pesquera de la Universidad Nacional de Tumbes. El trabajo consistió de 5 tratamientos más un control cada uno de ellos con 2 repeticiones (T₁: geotextil + perifiton espontáneo; T₂: geotextil + perifiton domesticado; T₃: geotextil + perifiton espontáneo + azúcar; T₄: geotextil + perifiton domesticado + azúcar; T₅: Normal + azúcar). El control (T₀) se manejó como se hace tradicionalmente, sin geotextil. La densidad fue de 270 camarones/m³; la alimentación fue el 4% de la biomasa calculada, el azúcar que se adicionó para agregar carbono al medio, fue de 0,1g por cada gramo de alimento al 40% de proteína y sirvió para ayudar a mejorar la metabolización de los microorganismos presentes en el agua, tal como se hace actualmente en el cultivo de camarón, utilizando melaza como fuente de carbono.

Los parámetros físicos fluctuaron durante la experiencia se presentaron como se indica: Temperatura de 23 a 24,5°C; salinidad de 35 a 40 ppt; el pH tuvo un mínimo de 7,44 a un máximo de 9,04. Los nutrientes presentes en el agua fluctuaron de la siguiente manera: amonio 0,0005 a 0,36 ppm; ion amonio 0,007 a 2,61 ppm; nitritos 0,03 a 22,36 ppm; nitratos 0,25 a 13,0 ppm y fosfatos 0,46 a 4,99 ppm, siendo estos resultados mejores en los tratamientos con presencia de bacterias nitrificantes, aunque no hubo diferencia significativa entre tratamientos.

Los análisis de ADN, mediante PCR y posterior migración electroforética, indican la presencia de bacterias de los géneros Nitrosomonas y Nitrobacter.

A simple vista, por transparencia, la mejor calidad del agua, correspondió a los tratamientos que tenían geotextil.

Palabras clave: Microorganismos nitrato-reductasa, *Litopenaeus vannamei*, PCR, geotextil, perifiton.

ABSTRACT

This work report the results of the research, Use of nitrifying bacteria as water bioremediate *Litopenaeus vannamei* culture in Tumbes - Peru, from 17 June to 17 August of 2009, in the Faculty of Fisheries Engineering, National University of Tumbes. The work consisted of 5 treatments more one control each one of them with 2 replications (T₁: geotextile + spontaneous periphyton; T₂: geotextile + tamed periphyton; T₃: geotextile + spontaneous periphyton + sugar; T₄: geotextil + tamed periphyton + sugar; T₅: Normal + sugar). The control (T₀) was handled as is done traditionally, without geotextile. The density was 270 shrimp/m³; the food was 4% of estimated biomass, the sugar was added to carbon to the medium was 0,1 g per gram of food to 40% protein and was used to help improve the metabolism in microorganisms in the water, as is currently done in shrimp farming, using molasses as carbon source.

The physical parameters fluctuated during the experiment were presented as follows: temperature from 23 to 24,5°C, salinity from 35 to 40 ppt, the pH had a minimal 7, 44 to a maximum 9,04. The nutrients in the water ranged as follows: ammonia 0,0005 to 0,36 ppm; ammonium ion from 0,007 to 2,61 ppm; nitrite 0,03 to 22,36 ppm; nitrate from 0,25 to 13,0 ppm and phosphate from 0,46 to 4,99 ppm, and these results better in treatments with nitrifying bacteria, although no significant difference between treatments.

DNA analysis PCR and subsequent electrophoretic migration, indicating the presence of genus *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*.

At first sight, transparency, better quality water found in the treatments that had geotextile.

Key words: Nitrate-reductase microbial, *Litopenaeus vannamei*, PCR, geotextile, periphyton.

CONTENIDO

	Pag.
Autorización	2
Certificado de realización del estudio	3
Agradecimiento	4
Dedicatoria	5
Resumen	6
Abstract	7
Glosario de términos	11
I. Introducción	12
1.1. Justificación .	13
1.2. Objetivos	16
1.3. Hipótesis	17
1.4. Antecedentes	17
II. Material y métodos	22
2.1. Lugar y fecha del estudio	22
2.2. Material	23
2.3. Método	24
2.3.1. Población del estudio	24
2.3.2. Crianza del camarón	24
2.3.3. Microorganismos nitrato-reductasa	28
2.3.4. Análisis del agua y de microorganismos	29
2.3.5. Análisis de fragmentos de ADN	30
2.3.6. Diseño de experimentación	32
2.3.7. Diseño de contrastación	33
III. Resultados	34
3.1. Cultivo del camarón	34
3.2. Parámetros físicos del agua	37
3.3. Bacterias domesticadas	41
3.4. Microorganismos espontáneos	41
3.5. Nutrientes en el agua	41
IV. Discusión	52
V. Conclusiones	55
VI. Referencias Bibliográficas	56
Apéndice	62

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
1. Ubicación de la Facultad de Ingeniería Pesquera de la Universidad Nacional de Tumbes - Perú.	22
2. Batería de acuarios en el experimento	25
3. Alimento balanceado administrado al camarón	25
4. Blower usado en el experimento	27
5. Geotextil usado como sustrato microbiano en el experimento	28
6. Crecimiento en peso (g) del camarón	35
7. Supervivencia (%) del camarón	37
8. Fluctuación de la temperatura (°C) durante el experimento	38
9. Fluctuación de la salinidad (‰) durante el experimento	39
10. Fluctuación del pH durante el experimento	40
11. Fluctuación del amonio (ppm) durante el experimento	43
12. Fluctuación del ion amonio (ppm) durante el experimento	45
13. Fluctuación del nitrito (ppm) durante el experimento	47
14. Fluctuación del nitrato (ppm) durante el experimento	49
15. Fluctuación del fosfato (ppm) durante el experimento	51
16. Fotografías con microscopio confocal de microorganismos presentes en tapetes de geotextil	63
17. Fotografías con microscopio confocal de microorganismos presentes en el agua de cultivo.....	63
18. Fotografías de equipos usados en el laboratorio de acuicultura.....	64
19. Fotografías de equipos usados en el laboratorio de biología molecular.....	64
20. Camarones de mar <i>Litopenaeus vannamei</i>	65

ÍNDICE DE TABLAS

	Pag.
1. Evolución del crecimiento en peso (g) del camarón	34
2. Evolución de la supervivencia (%) del camarón	36
3. Resultados del amonio	42
4. Resultados del ión amonio	44
5. Resultados del nitrito	46
6. Resultados del nitrato	48
7. Resultados del fosfato	50

GLOSARIO DE TERMINOS

Biopelícula. (*Biofilm* en Ingles), son organizaciones microbianas compuestas por microorganismos que se adhieren a superficies duras, semiduras e incluso blandas que se encuentran en lugares húmedos o acuosos, gracias a la secreción de un exopolímero. Estas conformaciones microbianas presentan una gran heterogeneidad y una diversidad de microambientes.

Biorremediación. Proceso de recuperación del medio ambiente alterado por las actividades humanas, haciendo uso de microorganismos, hongos, plantas o las enzimas derivadas de ellos.

Geotextil. (Tapete) tela gruesa que se puede enrollar, cortar y cocer, se utiliza como sustrato para la fijación microbiana que formara las biopelículas.

Nitrificación. Oxidación biológica del amonio con oxígeno en nitrito, seguido por la oxidación de esos nitritos en nitratos. La nitrificación es una etapa en el ciclo del nitrógeno y juega un importante rol en la remoción del nitrógeno orgánico de aguas servidas, donde la remoción convencional es por esa nitrificación bacteriana.

Nitrobacter. Bacterias aerobias que se convierten los nitritos en nitrato, nutriente del agua menos perjudicial para los organismos cultivados, mas bien sirve como fertilizante de las microalgas.

Nitrosomas. Bacterias nitrificadoras de tipo aeróbico, que convierten el amonio en nitrito mediante la oxidación del mismo.

Perifiton. Comunidad de microorganismos acuáticos que se adhieren a plantas enraizadas, sustratos sólidos y semisólidos sumergidos. Forman una película incrustante creciente a medida que prosperan. Comprenden una gran variedad de especies: algas de todo tipo, bacterias, cianobacterias, protozoos, etc.

I. INTRODUCCION

Debido al crecimiento demográfico en el planeta, y consecuentemente el aumento de las necesidades básicas, entre ellas, la producción de mayor cantidad de alimentos; cada día se van multiplicando los problemas que se le ocasiona al medio ambiente, tal como la eliminación de residuos sólidos y líquidos, que lógicamente van en crecimiento. Entre el aumento de los contaminantes, no solo es el incremento de las aguas domésticas residuales municipales, sino también, de los residuos sólidos y líquidos industriales; todo esto, como consecuencia de una civilización industrializada y su demanda por una mejor calidad de vida.

El objetivo principal de la presente investigación, fue encontrar una solución al arrojado de efluentes sin tratar, producto de la acuicultura de camarón en la Región Tumbes en Perú. Esta posible solución, se planteó utilizando microorganismos que transformen los nutrientes presentes en el agua de cultivo a formas asimilables por las microalgas, tal como los nitratos, a través del proceso de nitrificación.

En tal sentido, en la presente memoria de investigación se pretende explicar el proceso de nitrificación y la importancia de los microorganismos nitrato-reductasa NR, que se encuentran presentes en el agua, los mismos que, deben ser usados como biorremediadores del agua, para mejorar la calidad de los efluentes de la acuicultura, permitiendo de esta manera, un menor impacto al ecosistema de manglar y zonas aledañas, o como se dice en la actualidad; hacer uso de una acuicultura amigable con el medio ambiente.

1.1. JUSTIFICACION

En nuestros tiempos, la acuicultura, es una actividad con un alto despliegue en ciencia y tecnología, la misma que asocia a muchas disciplinas que interactúan con ella, tales como la biología, la ingeniería, la economía y la administración de negocios, entre otras; siendo las ramas biológicas, como la fisiología, la genética, la ecología, la patología y la biotecnología, las que presentan mayor implicancia en la producción de los organismos acuáticos.

La biotecnología es la ciencia que aporta los medios para aumentar la producción en la acuicultura, actividad que se ha incrementado cuantitativamente en la últimas décadas, gracias a una serie de aportes, entre los cuales destaca la biotecnología aplicada a diversos ámbitos como reproducción, nutrición, patología y mejoramiento genético de las especies cultivadas, así como también, el mejoramiento de la calidad del agua utilizada en el cultivo, a través de la biotecnología ambiental.

La acuicultura, probablemente, es el sector de más rápido crecimiento en la producción de alimentos, en la actualidad casi el 50% del pescado que se consume en el mundo es producto de ella, siendo pues, una actividad potencial para satisfacer la creciente demanda de alimentos acuáticos. Así pues, teniendo en cuenta la creciente población proyectada para los próximos dos decenios, se calcula que al menos un adicional de 40 millones de toneladas de alimentos acuáticos, serán necesarios en el año 2030 para mantener el actual consumo per cápita por persona que es de 16,4 kg/año (FAO, 2006).

La industria camaronera en el Perú, se ha desarrollado en el extremo norte de la costa peruana, específicamente en la Región Tumbes, actividad que viene funcionando de manera comercial desde la década de los 70s. Actualmente existen cerca de 3 500 Hectáreas (ocupando el 0,26% del área mundial destinada para el cultivo del camarón) en estanques de producción, agrupados en casi 50 empresas que exportan anualmente cerca de 6 000 TM (casi 0,9% de la

producción mundial) de camarón de mar por un valor comercial de casi 60 millones de dólares (Talavera, Sánchez y Zapata 1999).

El cultivo del “langostino blanco” *Litopenaeus vannamei*, llamado también “camarón de mar”, viene siendo por varias décadas, una actividad económica de gran importancia para la Región Tumbes, en Perú; pues a través de ella, muchas personas, entre personal altamente capacitado (Ingenieros Pesqueros y Biólogos Pesqueros), así como personal técnico, entre otros; como personal de apoyo, dependen económicamente, tanto directa como indirectamente, de esta industria.

Como toda actividad antropogénica presenta sus problemas, uno de ellos y quizá el más notable, es el arrojado de efluentes sin tratar al medio ambiente con una gran carga de metabolitos, producto de la alimentación del camarón y su metabolismo; por consiguiente, estos efluentes se encuentran cargados de materia orgánica en descomposición, tal como, alimento no consumido, heces de los organismos que habitan los estanques; camarones, bacterias y microalgas muertas, entre otros.

Toda esta gran carga de contaminantes perjudica las aguas del medio natural, adicionando una abundante cantidad de nutrientes como nitrógeno y fosfato, presencia de sólidos en suspensión; elementos que en su conjunto impiden la normal transferencia de los rayos solares, favoreciendo de esta manera la eutrofización del medio y la proliferación de microorganismos que dañan la calidad del agua del medio natural; entre ellos, los esteros que colindan con el ecosistema de manglar de Tumbes y las empresas camaroneras.

Todo esto se puede evitar si se utiliza una fauna microbiana que favorezca la nitrificación de la materia orgánica en suspensión, transformándola a formas asimilables por las microalgas, tal como los nitratos, estos últimos, producto del proceso de nitrificación, proceso que es llevado a cabo por las bacterias y microalgas nitrato-reductasa, objeto de este estudio. Estos microorganismos degradan con facilidad los nutrientes presentes en el agua, dentro de los estanques de crianza, con lo cual se tiene un agua de mejor calidad para el cultivo, por otro lado, los efluentes eliminados al medio ambiente, son también de

mejor calidad que los que se arrojan actualmente, y por último se sabe también, que esta heterogénea flora y fauna de microorganismos que conforman el perifiton, es consumido como alimento por los camarones, disminuyendo de esta manera en un buen porcentaje los piensos balanceados que se les administra, por consecuencia se disminuirá también, en buena parte los costos de producción de éste crustáceo.

Es por este motivo, la gran importancia que tendría el conocimiento y manejo de los microorganismos nitrato-reductasa presente en la producción de camarones, pues con ello se lograría una mejor calidad de los efluentes arrojados al medio natural, a la vez que servirían como fuente de alimento para el crecimiento de los camarones.

1.2. OBJETIVOS

El presente trabajo plantea los siguientes objetivos:

1.2.1. Objetivo general

Mediante la técnica Polymerase Chain Reaction (PCR), utilizando varios juegos de cebadores específicos para individuos y genes nitrato-reductasa, evaluar a los microorganismos que nitrifican la materia orgánica presente en el agua de cultivo de *Litopenaeus vannamei* en Tumbes - Perú.

1.2.2. Objetivos específicos

1. Determinar la biorremediación del agua de cultivo de *Litopenaeus vannamei* utilizando bacterias nitrato-reductasa
2. Identificación de microorganismos nitrato-reductasa que forman parte del perifiton en el cultivo de *Litopenaeus vannamei*, haciendo uso de la técnica Polymerase Chain Reaction (PCR).
3. Caracterización de microorganismos nitrato-reductasa por PCR en el cultivo de *Litopenaeus vannamei*.
4. Cuantificar a los microorganismos nitrato-reductasa presentes en el cultivo de *Litopenaeus vannamei*.

1.3. HIPOTESIS

El presente trabajo plantea la presente hipótesis de trabajo:

Existen varios microorganismos nitrificantes entre ellos algunas bacterias y microalgas que forman parte del perifiton en el cultivo de *Litopenaeus vannamei*, que degradan la materia orgánica hasta nitrato.

1.4. ANTECEDENTES

a) Impacto ambiental:

Como toda actividad humana, la crianza de organismos acuáticos causa un deterioro en el medio ambiental (Féray *et al.*, 1999; Dacho and Mustafa, 2008; Pardo, Suárez y Soriano, 2006; Sousa *et al.*, 2006), por su parte Ramos, Vinatea & Da Costa, 2008, refieren que los principales problemas ocasionados por la acuicultura son el arrojado de efluentes no tratados, con lo que se contamina los cuerpos de aguas naturales con nutrientes y materia orgánica; en tal sentido, actualmente se busca realizar una acuicultura de menor impacto al medioambiente, en la que se usen microorganismos tal como bacterias y microalgas que sirvan como biorremediadores de los efluentes, asimismo, se les utilice como fuente de alimento natural para las especies en cultivo (Thakur and Lin, 2002; Abreu *et al.*, 2007; Khatoon *et al.*, 2007; Crab *et al.*, 2007).

Un apropiado manejo en el cultivo de camarón es lo que se requiere actualmente, ya sea un sistema cerrado, con recambios mínimos de agua (Thakur and Lin, 2002) o el uso del perifiton como alimento y como biorremediador del agua (Abraham *et al.*, 2004) este tipo de acuicultura, es a la que se tiene que llegar y de manera urgente.

b) Uso de Perifiton en acuicultura:

Las Biopelículas de bacterias, con frecuencia en asociación con algas, protozoos y hongos, se encuentran en todas las estructuras sumergidas en los ambientes marinos (Callow and Callow, 2006; Hodoki, 2005), una sola especie bacteriana puede formar una biopelícula, pero en el medio ambiente natural, se forman a partir de diversas especies (Kumar and Prasad, 2006). Estas biopelículas microbianas son comunidades estratificadas, que están compuestas de un complejo de bacterias y cianobacterias (Bender *et al.*, 2004; Bender and Phillips, 2004), crecen en lugares húmedos y con superficies duras especialmente inertes, al mismo tiempo que se recubren por una matriz extracelular polimérica o glicocálix que está formada por exopolisacáridos (Herrera, 2004). El bambú se recomienda como sustrato para crecimiento de perifiton, en vista de su producción de alta calidad, su disponibilidad en los trópicos, la facilidad de uso y durabilidad, así mismo por que no presenta ningún efecto adverso sobre parámetros de calidad del agua (Azim *et al.*, 2001).

c) Acumulación de nutrientes en el agua de cultivo:

La acumulación de nitrógeno disuelto especialmente amonio como resultado de la adición de alimento y la excreción de los organismos cultivados en alta densidad, es uno de los principales problemas en los sistemas de cultivo intensivo de camarón, afectando su ingestión de alimento, crecimiento y porcentaje de supervivencia (Tomasso, 1994; Wasielesky *et al.*, 1994; Ostrensky and Wasielesky, 1995 and Cavalli *et al.*, 1996, citados por Lopes, Abreu and Wasielesky, 2002). Estos componentes nitrogenados pueden ser eliminados del agua a través de la asimilación por parte de microorganismos como bacterias y microalgas (Cervantes-Carrillo, Pérez y Gómez, 2000). Los desechos producidos por la acuicultura son, principalmente alimentos no consumidos por los peces, excretas y antibióticos. Estos desechos, rápidamente incrementan las concentraciones de nutrientes (fósforo total, amonio, nitrógeno orgánico y materia

orgánica), en el sedimento y la columna de agua, descendiendo la concentración de oxígeno disuelto y aumentando el nivel trófico en el cuerpo de agua (Tartarotti *et al.*, 2004), el resultado de todo esto es la eutrofización de las aguas por la materia orgánica a través de amonio, nitrito, fosfatos y silicatos (González-Félix y Pérez-Velázquez, 2006; Urakawa *et al.*, 2006).

El amonio es producido principalmente por la excreción directa de los camarones en los estanques de cultivo, así como la descomposición del material orgánico que contiene nitrógeno bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas, los cuales son descompuestos principalmente por bacterias. Con el aumento de la alimentación, aumenta la acumulación del ion amonio (NH_4). El amonio no ionizado (NH_3) es la forma de amoniaco liberado hacia el medio ambiente. Al aumentar el pH, desde 7,5 a 8,5 y la temperatura desde 25 a 35°C, se incrementa la forma de amonio no ionizado, el cual, al igual que el nitrito, es más tóxico para los camarones (Boyd, 1990 en Talavera, Zapata y Sánchez, 1997).

La continua descarga de nutrientes, principalmente fosfatos y nitrógeno en el agua residual estimulan el crecimiento de algas y otras formas de vida acuática fotosintéticas, acelerando la eutrofización del medio receptor, reducen significativamente la concentración del oxígeno disuelto y producen cambios indeseables en las poblaciones acuáticas (Knobelsdorf, 2005 y Ruíz, 2008).

Debido a sus bajas tasas de crecimiento y su muy alta sensibilidad al pH, concentración de oxígeno disuelto, temperatura y componentes tóxicos, la nitrificación se considera la clave en el proceso de eliminación biológica de nitrógeno (Zgajnar and Zagorc-Koncan, 2009). La nitrificación es un proceso de dos fases llevadas a cabo por dos grupos de bacterias quimolíticas autotróficas: la oxidación de amonio a nitritos representada por las bacterias Nitrosomonas y Nitrosospira, y la oxidación de nitrito a nitrato representada por las bacterias Nitrospira y Nitrobacter (Risgaard-Petersen *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2008). La oxidación de ion amonio (NO_4^+) a nitrito (NO_2^-) es realizado por bacterias oxidantes de amonio (AOB); la oxidación de nitrito (NO_2^-) a nitrato (NO_3^-), el

llevado a cabo por bacterias oxidantes de nitrito (Risgaard-Petersen *et. al.*, 2004), así pues, todas las grandes transformaciones del nitrógeno inorgánico en el medio ambiente, tales como la asimilación de nitrógeno, la nitrificación y desnitrificación se llevan a cabo exclusivamente por microorganismos (Abeliovich, 1992). La nitrificación transforma el amoniaco a nitrito y nitratos, es un importante proceso del ciclo del nitrógeno en los ecosistemas acuáticos (Feliatra, Nursyiwani y Bianchi, 2003; Risgaard-Petersen *et. al.*, 2004; Risgaard-Petersen *et. al.*, 2004)

d) Microorganismos nitrato-reductasa como biorremediadores del agua de cultivo:

En la mayoría de eucariotas de dominio funcional nitrato reductasa (Euk-NR), las diatomeas de genes NR, por lo general son idénticas en 50% a 60% con los de plantas y algas al nivel de aminoácidos (Allen and Ward, 2005); muchas veces el perifiton presenta abundancia de diatomeas, microorganismos que producen las más altas tasas de desnitrificación (Risgaard-Petersen *et. al.*, 2004; Ishida *et al.*, 2007).

El incremento de biomasa del perifiton a través del período de cultivo y sus efectos sobre la turbidez del agua, afectan el proceso de oxigenación del estanque y la calidad del agua, debido a las diferentes profundidades del fondo (Azim *et al.*, 2003). Según Lin *et al.*, 2004, demuestran que las células en los microorganismos, efectivamente, remueven los sólidos suspendidos totales de 55 a 66%, la demanda bioquímica de oxígeno en 5 días es de 37–54%, el amonio total de 64–66% y nitrito de 83–94%.

Muchos lugares del mundo limitados en recursos hídricos han dado lugar a un mayor uso de agua reciclada para fines agrícolas e industriales (Kaplan, Wilhelm and Abeliovich, 2000).

La abundancia natural de los isótopos estables de carbono y nitrógeno ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) se han empleado con el fin de determinar la contribución de la riqueza natural y artificial como fuente de alimento para el crecimiento de los camarones *penaeus*. La biopelícula suministra más del 70% del nitrógeno requerido en el cultivo del camarón de mar *Farfante paulensis* (Abreu *et. al.*, 2007).

Un buen manejo de los nutrientes presentes en los efluentes de la acuicultura del camarón, se logra midiendo y controlando las cantidades de amonio, nitrito y fosfatos que están presentes en el estanque de cultivo y son arrojados al medio ambiente natural (Limsuwan, 2005; Ramos, Vinatea & da Costa, 2008).

II. MATERIAL Y METODOS

2.1. Lugar y fecha del estudio. El presente trabajo de investigación se llevó a cabo del 17 de junio al 17 de agosto del año 2009, en el laboratorio de Acuicultura I de la Facultad de Ingeniería Pesquera de la Universidad Nacional de Tumbes, Perú ($3^{\circ}30'17,94''$ S y $80^{\circ}23'36,81''$ O (Fig. 1), algunos análisis se realizaron en el laboratorio de Biología molecular, también de la misma Facultad (análisis de fragmentos nitrato-reductasa por PCR), así como también otros análisis se realizaron en los laboratorios de la empresa camaronera Marinaazul (determinación de amonio, nitrito y fosfato del agua de cultivo).



Fig. 1. Facultad de Ingeniería Pesquera de la Universidad Nacional de Tumbes
(foto Google Earth 2007)



2.2. MATERIAL

A) Material Biológico:

- 360 poslarvas de *Litopenaeus vannamei*, PL12
- Bacterias nitrato-reductasa: *Shewanella algae* (1-A), *Shewanella algae* (8-A), *Shewanella* sp. (17-A), *Bacillus* sp. (76-G) y *Bacillus* denitrificante (21-D)

B) Material de campo:

- 12 acuarios de 110 L de capacidad (0,9 x 0,4 x 0,3) m
- 1 kg de alimento balanceado KR1 40% de proteína.
- 4 kg de alimento balanceado acabado 35% de proteína.
- 0,8 m² de geotextil
- 1 kg de melaza ó azúcar
- 5 m de celosía
- 5 L de hipoclorito de sodio al 5%

C) Material de laboratorio:

- Termociclador marca TECHNE TC-312 para 25 tubos
- Centrifuga con refrigeración (15000 rpm) marca SIGMA
- Equipo para baño maría
- Refrigeradora
- Transiluminador
- Cámara fotográfica
- Equipo para electroforesis Termo EC Medicell R Primo TM
- Lector fotométrico de marca Labsystems Multiskan RC
- Balanza de precisión portátil digital Ohaus-Traveler™.
- Micropipetas 0,5-10µL; 10-20µL; 10-100 µL; 20-200 µL y 100-1000 µL
- Puntas con filtro de 10 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL
- Tubos eppendorf de 1,5 mL
- Reactivos necesarios para realizar PCR
- Cebadores para genes nitrato-reductasa
- Kit para análisis de agua (SALT water aquaculture, La Motte Model AQ-4)
- Termómetro de inmersión.(La Motte 5 a 50°C)
- Potenciómetro (Mettler Toledo MP220)
- Refractómetro (VISTA AA366ATC de 0 a 100ppt)
- Microscópio confocal a barrido láser Marca Olympus FV1000
- Maquina de Elisa (Labsystems Multiskan RC).

- Microplacas de 96 pozos
- Algodón
- Agua desionizada
- Agua destilada
- Papel aluminio
- Papel filtro

2.3. METODO

2.3.1. Población del estudio. La población de camarón del estudio, estuvo conformada por 360 larvas PL12, habiéndose colocado a razón de 30 en cada uno de los 12 acuarios, lo que hace una densidad de siembra de unos 270 larvas/m³.

2.3.2. Crianza del camarón:

Preparación y llenado de los acuarios.

Los acuarios para el cultivo de camarón fueron lavados con detergente, luego de ser enjuagados, se les adicionó agua con hipoclorito de sodio a 20 ppm, con el fin de eliminar las bacterias u otro organismo no conveniente para este estudio. Una vez realizado el lavado y después de dejar escurrir los sobrantes de agua por 24 horas, se les lleno con agua de mar previamente tratada con hipoclorito de sodio a 20 ppm.

Aclimatación y siembra. Las larvas de camarones fueron traídas del laboratorio de reproducción de la Empresa Marinaazul localizado en Punta mero, unos 65km al lugar del experimento, llegaron en bolsas de polietileno con aireación a una salinidad de 33 ppt y una temperatura de 24°C, en tal sentido se tuvo que realizar una aclimatación a la salinidad y a la temperatura por dos horas, pues la salinidad del agua de los acuarios fue de 35 ppt y temperatura de 25°C. Una vez aclimatadas las larvas se colocaron en 12 acuarios de 110 litros de capacidad cada uno (Fig. 2), a una densidad de 270 larvas/m³ (30 por acuario).



Fig. 2. Bateria de 12 acuarios de 110 litros de capacidad utilizados durante el experimento

Alimentación. La alimentación se realizó diariamente por las mañanas, proporcionándoseles alimento balanceado, primeramente y hasta los 20 días KR1 de 40% de proteínas y luego, hasta el final del experimento, alimento acabado de 35% de proteínas, a una tasa del 4% del peso de la biomasa total (Fig. 3).



Fig. 3. Dos tipos de alimento balanceado usados durante el cultivo del camarón, el primero de gránulo más fino que el segundo

Muestras biométricos. El cálculo del peso y la supervivencia de los camarones, se realizaron cada 10 días, para ello se pesó a cada uno de los ejemplares que aún quedaban vivos. Luego se promedió el peso en gramos y se calculó el porcentaje de supervivientes en el muestreo. Acto seguido fueron devueltos a sus respectivos acuarios.

Para la toma del peso, se procedió de la siguiente manera: En el primer muestreo, debido a que no se podía usar un método apropiado para pesarlos, pues estaban demasiado pequeños, se les midió al milímetro mediante una regla graduada, para luego transformar la longitud a peso mediante la fórmula siguiente:

$$P = \text{Anti log } (3,037 \times \log (L) - 5,197) \text{ (Alimentos Ralston Purina, 1984).}$$

Donde:

P: peso en gramos

L: longitud en milímetros

En el segundo y tercer muestreo se usó una probeta de 10 mL, así por desplazamiento de volumen y con una corrección del 1,03 debido al peso específico del agua de mar, se calculó el peso promedio de los camarones.

A partir del cuarto muestreo, se utilizó una balanza analítica de buena sensibilidad, para pesar a cada uno de los camarones.

La supervivencia se calculó cada 10 días, aprovechando que se extrajeron los camarones para pesarlos, se les contó y luego se obtuvo el porcentaje de supervivientes a la fecha de muestreo.

Fertilización. La fertilización se realizó semanalmente para aumentar el crecimiento del bloom algal en los acuarios de cultivo, se usó abono inorgánico conocido como Nutrisil a razón de 10 kg por hectárea ó 1 g por cada 1m³ de agua, lo que correspondió a 0,1g por acuario.

Adición de carbono. Se le adicionó carbono al agua de cultivo, a través de azúcar con la finalidad de aumentar el metabolismo microbiano y como consecuencia aumentar el proceso de nitrificación. Se adicionó solo a los tratamientos que así lo requerían (T₃, T₄ y T₅), se realizó dejando un día.

Recambio de agua. El agua de cultivo, no se recambio totalmente durante el experimento, solo se le agregó lo suficiente para recuperar el nivel cuando se limpiaba el alimento no consumido por más de una semana. El agua que se adicionó siempre fue tratada previamente con hipoclorito de sodio a 20 ppm.

Aireación de los acuarios. La aireación al cultivo fue constante, mediante un blower de 3 HP (Fig. 4). Solo se dejó de agregar aire una hora por cada 8 horas de funcionamiento del equipo, pues en este tiempo se apagó para dejarlo enfriar por un momento.



Fig. 4. Blower de 3 HP usado durante le fase de experimentación

2.3.3. Microorganismos nitrato-reductasa

Uso de geotextil como sustrato. El geotextil se colocó en los tratamientos que lo requirieron, habiéndose colocado a razón de 1m² de tapete por cada 1m³ de agua, lo cual, según el volumen de agua de los acuarios (110 litros) hizo un área de geotextil de 0,1 m² (1 000 cm²), utilizando para el caso tapetes de 50cm x 20cm (Fig. 5). Se les colocó dentro de los acuarios de manera vertical al nivel del agua y dentro de una envoltura de celosía para que el perifiton fijado en ellos no sea consumido por los camarones.



Fig. 5. Geotextil dentro de una celosía, tapetes de 50 cm x 20 cm, utilizados para el experimento para impregnar las bacterias nitrificantes

Inoculación de bacterias nitrato-reductas cultivadas al geotextil. Cuatro tapetes de geotextil se colocaron dentro de un depósito que contenía un cultivo de bacterias nitrato-reductasa: *Shewanella algae* (1-A), *Shewanella algae* (8-A), *Shewanella* sp. (17-A), *Bacillus* sp. (76-G) y *Bacillus* denitrificante (21-D), durante 5 días para que se impregnen en él. A esto se le llamó perifiton domesticado (tratamientos T₂ y T₄).

Impregnación de bacterias espontáneas nitrato-reductasa al geotextil. Cuatro tapetes de geotextil se colocaron en el estero también por 5 días, para que se impregnen de bacterias nitrato-reductasa del medio natural. A esto se le llamó perifiton espontáneo (tratamientos T₁ y T₃).

2.3.4. Análisis del agua y de microorganismos

a) La toma de parámetros físicos del agua (temperatura, salinidad y pH) se realizó diariamente por las mañanas.

La temperatura se registró en grados centígrados mediante un termómetro de inmersión de rango 5 a 50°C.

La salinidad se midió en partes por mil (ppt) mediante un refractómetro ATAGO con rango de 0 a 100.

El pH se midió con un potenciómetro digital marca Mettler Toledo MP220, con escala de 0 a 14 y un error de $\pm 0,001$.

b) Determinación de nutrientes en el agua (amoníaco, amonio total, Ion amonio, nitritos, nitratos y fosfatos), se realizó semanalmente.

La determinación del amonio, Ion amonio, nitritos y fosfatos, se llevó a cabo en la empresa Marinaazul. Las muestras se llevaron refrigeradas en tubos falcón con una capacidad de 50 mL. El análisis de estos parámetros se realizó bajo la técnica

de microplacas de 96 pozos en un lector fotométrico de marca Labsystems Multiskan RC. Los límites de detección de los parámetros son: Amonio y Amonio total, se trabajó con una longitud de Onda de 540 nm con una sensibilidad de 0 – 5 ppm; el Nitrito se trabajó, con una longitud de Onda de 510 nm con una sensibilidad es de 0 – 5,5 ppm; el Fosfato se trabajó con una longitud de Onda de 620 nm con una sensibilidad de 0 – 9,5 ppm.

Los nitratos se calcularon en la Universidad Nacional de Tumbes el mismo día en que se llevaron las muestras de agua a la empresa Marinaazul. Estos se determinaron en la Facultad de Ingeniería Pesquera, por colorimetría, mediante un Kit (SALT water aquaculture, La Motte Model AQ-4).

2.3.5. Análisis de fragmentos de ADN. Estos análisis consistieron en la evaluación de los microorganismos nitrato-reductasa mediante PCR, migración electroforética y secuenciación de los amplicones.

Para determinar la presencia de microorganismos nitrato-reductasa se utilizó los siguientes cebadores específicos:

- 16SrRNA AOB (identificación de bacterias)
- 16SrRNA Nitrobacter sp. (identificación de bacterias)
- 16SrRNA Nitrospira sp. (identificación de bacterias)
- Ammonium monooxygenase (amoA) (identificación de gen)
- Nitrite of nitrobacter sp. (identificación de gen)
- Nitrite reductase (nirK oxidoreductase (nxB) (identificación de gen)
- Nitrite reductase (nirS) (identificación de gen)
- N₂O reductase (nosZ) (identificación de gen)

Extracción del ADN de los microorganismos.

De los tratamientos que tuvieron geotextil, se colocó un pequeño trozo de 1cm² o 1mL de agua de cultivo de los tratamientos que no tuvieron geotextil, todo ello en un tubo eppendorf que contenía 200 µL de sustancia buffer alcalina (solución de lisis para extracción de ADN), luego pasó al vortex, para posteriormente incubar el contenido por 10 minutos a 95°C.

Después de este tiempo se centrifugó por 30 segundos y se recuperó 150 µL de sobrenadante y se precipitó con 450 µL de etanol al 95%, acto seguido se centrifugó por 10 minutos a 15 000 rpm, dejándose a temperatura ambiente por 10 minutos.

Se elimina el alcohol y se lava con etanol al 70%, se secó y se resuspendió con 20µL de TE.

Amplificación del PCR.

Se adicionó por cada reacción en un tubo de PCR:

- H ₂ O ultra pura	34,80 µL
- Buffer 5x	10µL
- dNTPs	1µL
- Praction (Forward)	1µL
- Praction (Reverse)	1µL
- TaqDNApol	0,20µL
- ADN	2µL
- Volumen total	50µL

Programación del termociclador.

- Desnaturalización	94°C, 5 minutos
40 ciclos de:	
- Desnaturalización	94°C, 45 segundos
- Hibridación	55°C, 45 segundos
- Polimerización	72°C, 90 segundos
- Polimerización final	72°C, 7 minutos
- Conservación	4°C, indefinido

Migración electroforética.

La migración de los amplicones se realizó en geles de agarosa al 3%, conteniendo Bromuro de etidio como sustancia de revelado (0,5 mg * mL⁻¹).

Se utilizó como tampón de migración TAE 0,5X (Tris-Acido acético-EDTA) y como tampón de depósito azul de bromofenol al 5%. El voltaje empleado fue de 93 voltios durante 30 minutos.

2.3.6. Diseño experimental. Se usaron 12 acuarios de 110 litros capacidad para colocar los tratamientos con sus dos repeticiones:

T₀: Control (sin geotextil).

T₁: geotextil + perifiton espontáneo.

T₂: geotextil + perifiton domesticado.

T₃: geotextil + perifiton espontáneo + azúcar.

T₄: geotextil + perifiton domesticado + azúcar.

T₅: Sin geotextil + azúcar.

2.3.7. Diseño de contrastación. Los datos se colocaron en tablas debidamente ordenados, según muestreo y fecha. A estos datos se les aplicó un análisis de varianza (ANVA) con $\alpha = 0,05$ para determinar la relación existente intra e inter tratamientos. Se consideró significativo si el F (tabular) fue menor al F (calculado).

III. RESULTADOS

3.1. Cultivo del camarón. El cultivo del camarón tuvo una duración de 61 días, con un crecimiento individual promedio que se encontró entre el rango de 0,88g a 1,49g. No existió significación estadísticamente ante un análisis de varianza (ANVA), a un nivel de significación del 5%, entre los diferentes tratamientos, pues el F tabular fue de 2,477 frente a un F calculado de 0,122; aunque observando las figuras parecen ser diferentes. La tabla 1 y fig. 6, muestran el crecimiento en peso durante los 60 días de cultivo en cada uno de los 5 tratamientos experimentales y el tratamiento testigo.

Tabla 1: Evolución del crecimiento en peso (g) para cada uno de los tratamientos y sus respectivas repeticiones

Fecha	Días	T ₀ R ₁	T ₀ R ₂	Promedio
17-Jun	0	0.002	0.002	0.002
26-Jun	9	0.008	0.004	0.006
07-Jul	20	0.09	0.11	0.1
16-Jul	29	0.17	0.18	0.18
27-Jul	40	0.31	0.49	0.4
05-Ago	49	0.43	0.7	0.57
17-Ago	61	0.75	1.01	0.88

Fecha	Días	T ₁ R ₁	T ₁ R ₂	Promedio
17-Jun	0	0.002	0.002	0.002
26-Jun	9	0.004	0.007	0.006
07-Jul	20	0.13	0.12	0.13
16-Jul	29	0.33	0.15	0.24
27-Jul	40	0.47	0.5	0.49
05-Ago	49	0.77	0.69	0.73
17-Ago	61	1.34	1.42	1.38

Fecha	Días	T ₂ R ₁	T ₂ R ₂	Promedio
17-Jun	0	0.002	0.002	0.002
26-Jun	9	0.011	0.009	0.01
07-Jul	20	0.11	0.11	0.11
16-Jul	29	0.25	0.45	0.35
27-Jul	40	0.55	0.55	0.55
05-Ago	49	0.92	0.9	0.91
17-Ago	61	1.42	1.56	1.49

Fecha	Días	T ₃ R ₁	T ₃ R ₂	Promedio
17-Jun	0	0.002	0.002	0.002
26-Jun	9	0.012	0.018	0.015
07-Jul	20	0.12	0.1	0.11
16-Jul	29	0.2	0.28	0.24
27-Jul	40	0.4	0.58	0.49
05-Ago	49	0.83	0.97	0.9
17-Ago	61	1.35	1.6	1.48

Fecha	Días	T ₄ R ₁	T ₄ R ₂	Promedio
17-Jun	0	0.002	0.002	0.002
26-Jun	9	0.16	0.007	0.0835
07-Jul	20	0.11	0.06	0.085
16-Jul	29	0.44	0.1	0.27
27-Jul	40	0.53	0.27	0.4
05-Ago	49	1.1	0.29	0.695
17-Ago	61	1.81	0.69	1.25

Fecha	Días	T ₅ R ₁	T ₅ R ₂	Promedio
17-Jun	0	0.002	0.002	0.002
26-Jun	9	0.013	0.003	0.008
07-Jul	20	0.10	0.05	0.075
16-Jul	29	0.28	0.16	0.22
27-Jul	40	0.48	0.51	0.495
05-Ago	49	0.87	0.89	0.88
17-Ago	61	1.31	1.33	1.32

T₀: tratamiento control (sin geotextil)

T₁: geotextil + perifiton espontáneo

T₂: geotextil + perifiton domesticado

T₃: geotextil + perifiton espontáneo + carbono (azúcar)

T₄: geotextil + perifiton domesticado + carbono (azúcar)

T₅: sin geotextil (sólo carbono)

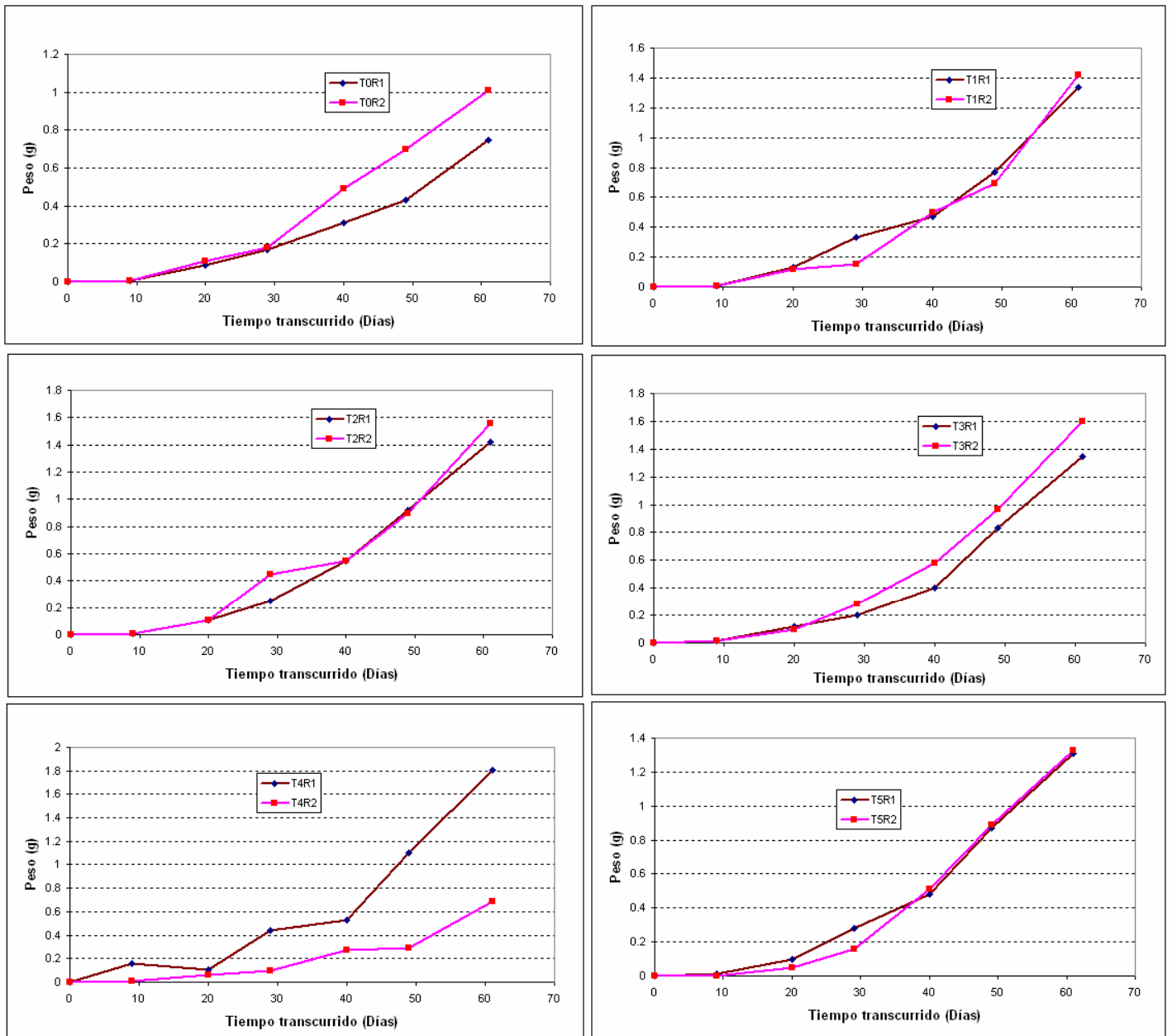


Fig. 6: Crecimiento en peso (g) en cada uno de los tratamientos, durante el experimento

T₀: tratamiento control (sin geotextil)

T₃: geotextil + perifiton espontáneo + carbono (azúcar)

T₁: geotextil + perifiton espontáneo

T₄: geotextil + perifiton domesticado + carbono (azúcar)

T₂: geotextil + perifiton domesticado

T₅: sin geotextil (sólo carbono)

La supervivencia promedio se encontró entre el rango de 70% a 81,7%. Estadísticamente ante un análisis de varianza (ANVA), a un nivel de significación del 5%, no existe significancia entre los diferentes tratamientos, pues el F tabular es 2,477 frente a un F calculado de 1,403, con una probabilidad < 0,246 de que se presente lo contrario, aunque comparando las figuras parecen ser diferentes. En la tabla 2 y fig. 7 se muestra la supervivencia en porcentaje durante los 60 días de cultivo en cada uno de los 5 tratamientos experimentales y el tratamiento testigo.

Tabla 2: Evolución de la supervivencia (%) en los diferentes tratamientos durante el experimento

Fecha	Días	T ₀ R ₁	T ₀ R ₂	Promedio
17-Jun	0	100	100	100
26-Jun	9	93.3	86.7	90
07-Jul	20	80	86.7	83.4
16-Jul	29	80	86.7	83.4
27-Jul	40	80	80	80.0
05-Ago	49	80	80	80.0
17-Ago	61	80	76.7	78.4

Fecha	Días	T ₁ R ₁	T ₁ R ₂	Promedio
17-Jun	0	100	100	100
26-Jun	9	96.7	90	93.4
07-Jul	20	93.30	86.7	90.0
16-Jul	29	93.3	73.3	83.3
27-Jul	40	80	73.3	76.7
05-Ago	49	80	70	75
17-Ago	61	80	70	75

Fecha	Días	T ₂ R ₁	T ₂ R ₂	Promedio
17-Jun	0	100	100	100
26-Jun	9	86.7	96.7	91.7
07-Jul	20	86.7	76.7	81.7
16-Jul	29	86.7	76.7	81.7
27-Jul	40	86.7	76.7	81.7
05-Ago	49	86.7	76.7	81.7
17-Ago	61	86.7	76.7	81.7

Fecha	Días	T ₃ R ₁	T ₃ R ₂	Promedio
17-Jun	0	100	100	100
26-Jun	9	90	86.7	88.4
07-Jul	20	86.70	86.7	86.7
16-Jul	29	86.7	86.7	86.7
27-Jul	40	80	86.7	83.4
05-Ago	49	80	86.7	83.4
17-Ago	61	73.3	86.7	80

Fecha	Días	T ₄ R ₁	T ₄ R ₂	Promedio
17-Jun	0	100	100	100
26-Jun	9	90	100	95
07-Jul	20	76.7	73.3	75
16-Jul	29	76.7	73.3	75
27-Jul	40	70	73.3	71.7
05-Ago	49	70	70	70
17-Ago	61	70	70	70

Fecha	Días	T ₅ R ₁	T ₅ R ₂	Promedio
17-Jun	0	100	100	100
26-Jun	9	100	100	100
07-Jul	20	100	93.3	96.7
16-Jul	29	100	93.3	96.7
27-Jul	40	76.7	93.3	85
05-Ago	49	76.7	90	83.4
17-Ago	61	73.3	90	81.7

T₀: tratamiento control (sin geotextil)

T₁: geotextil + perifiton espontáneo

T₂: geotextil + perifiton domesticado

T₃: geotextil + perifiton espontáneo + carbono (azúcar)

T₄: geotextil + perifiton domesticado + carbono (azúcar)

T₅: sin geotextil (sólo carbono)

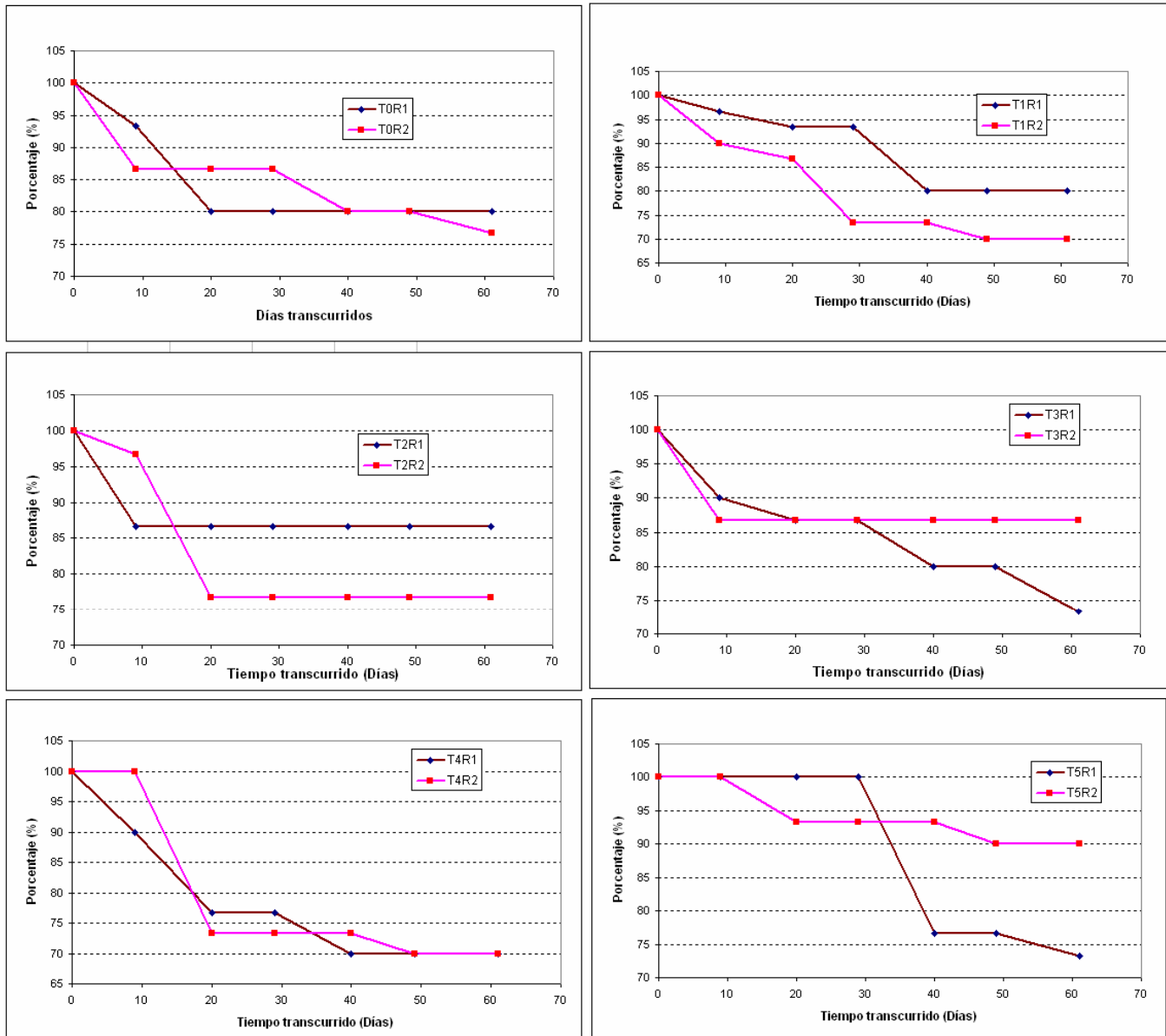


Fig. 7: Supervivencia (%) del camarón en cada tratamiento, durante el experimento

T₀: tratamiento control (sin geotextil)

T₁: geotextil + perifiton espontáneo

T₂: geotextil + perifiton domesticado

T₃: geotextil + perifiton espontáneo + carbono (azúcar)

T₄: geotextil + perifiton domesticado + carbono (azúcar)

T₅: sin geotextil (sólo carbono)

3.2. Parámetros físicos del agua. Los parámetros físicos del agua estuvieron dentro de los rangos permitidos en el cultivo de éste crustáceo, aunque la temperatura bajo considerablemente bajo la media anual. La temperatura del agua fluctuó entre una mínima de 23°C y una máxima de 24,8°C (fig. 8); la salinidad se encontró de 35 ppt a 40 ppt (fig. 9); el pH se presentó entre un límite de 7,44 a 9,04 (fig. 10).

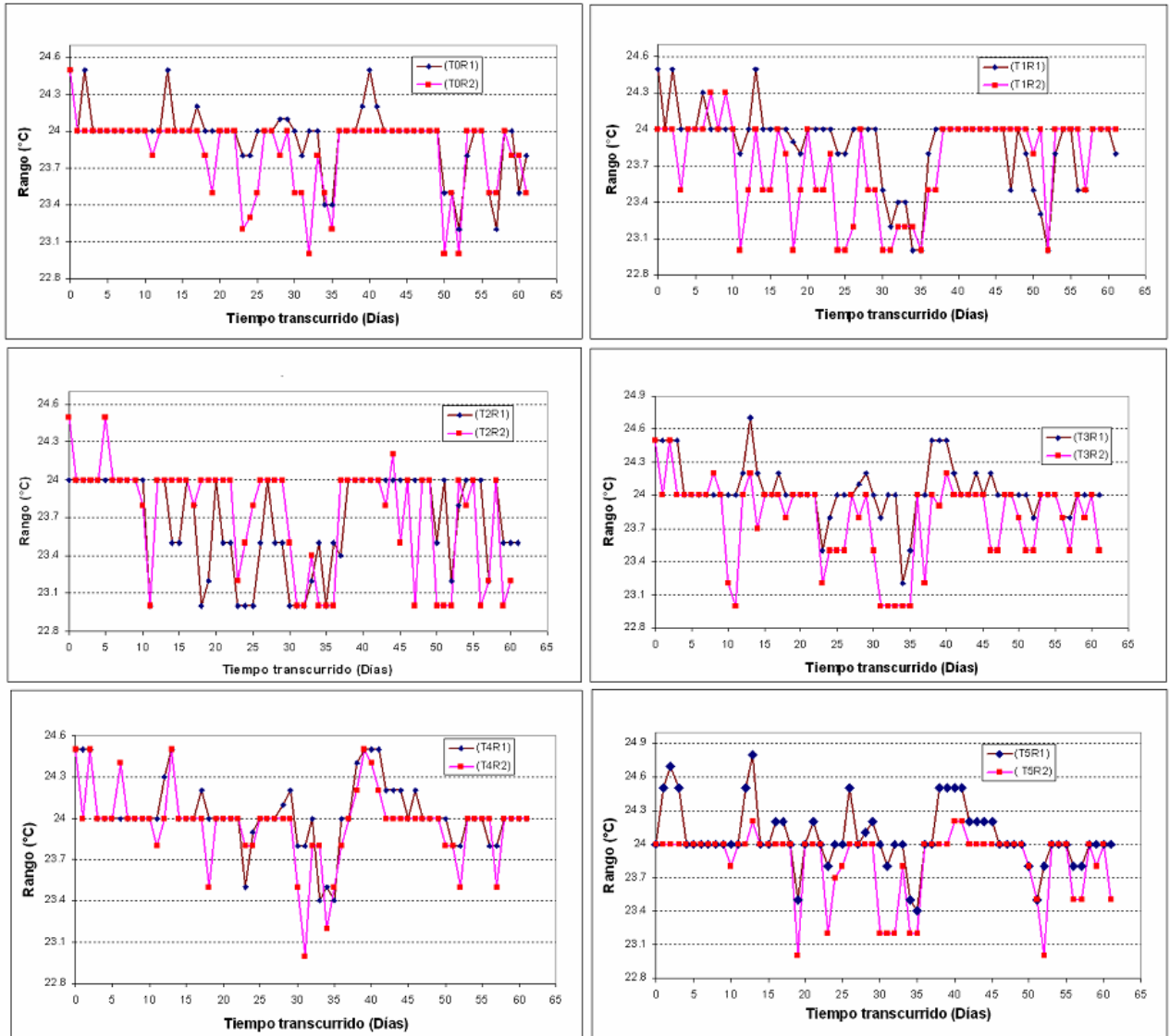


Fig. 8: Fluctuación de la temperatura (°C) en los diferentes tratamientos durante el experimento

T₀: tratamiento control (sin geotextil)

T₁: geotextil + perifiton espontáneo

T₂: geotextil + perifiton domesticado

T₃: geotextil + perifiton espontáneo + carbono (azúcar)

T₄: geotextil + perifiton domesticado + carbono (azúcar)

T₅: sin geotextil (sólo carbono)

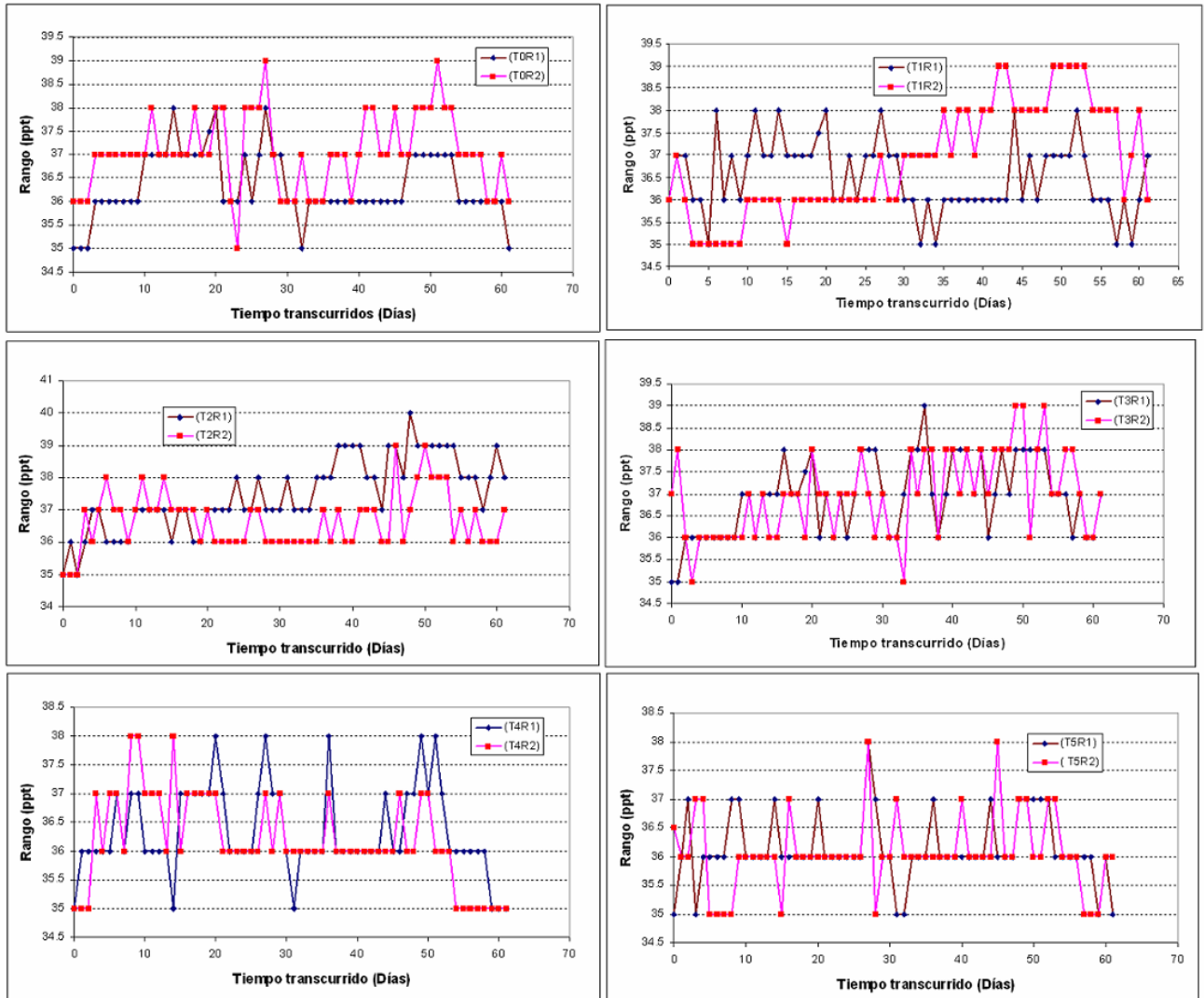


Fig. 9: Fluctuación de la salinidad (ppt) en cada uno de los tratamientos durante el experimento

T₀: tratamiento control (sin geotextil)

T₁: geotextil + perifiton espontáneo

T₂: geotextil + perifiton domesticado

T₃: geotextil + perifiton espontáneo + carbono (azúcar)

T₄: geotextil + perifiton domesticado + carbono (azúcar)

T₅: sin geotextil (sólo carbono)

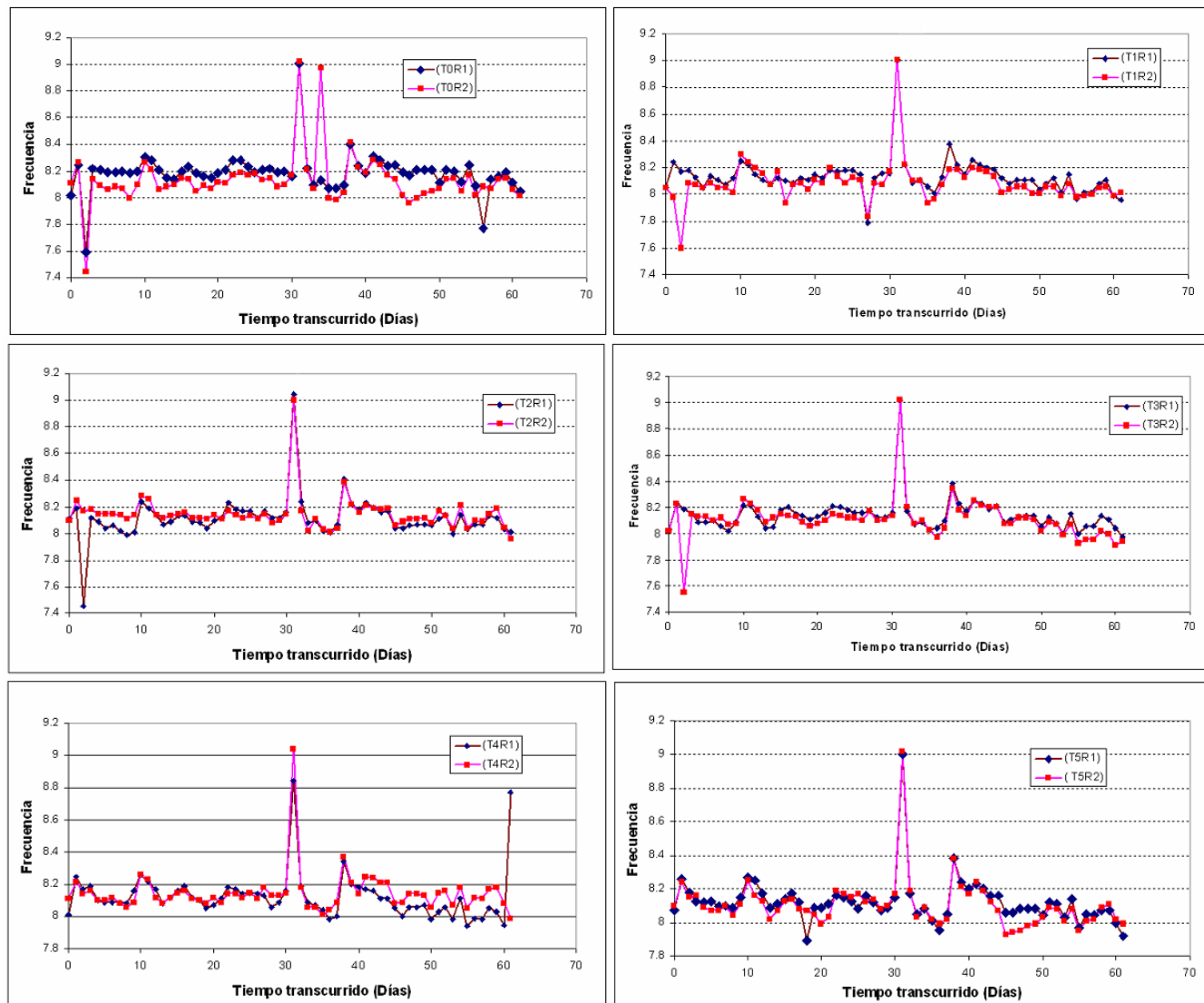


Fig. 10: Fluctuación del pH en los diferentes tratamientos durante el experimento

T₀: tratamiento control (sin geotextil)

T₁: geotextil + perifiton espontáneo

T₂: geotextil + perifiton domesticado

T₃: geotextil + perifiton espontáneo + carbono (azúcar)

T₄: geotextil + perifiton domesticado + carbono (azúcar)

T₅: sin geotextil (sólo carbono)

3.3. Bacterias domesticadas. Las bacterias nitrato-reductasa NR, que intervienen en el proceso de nitrificación de los nutrientes presentes en el agua de cultivo de *Litopenaeus vannamei* en la investigación, se mantuvieron hasta el final del cultivo, los mismos que son los que a continuación se mencionan: Cepa 1-A *Shewanella* sp., Cepa 8-A *Shewanella* sp., Cepa 17-A *Shewanella* sp y Cepa 76-G *Bacillus* sp. Esto se comprobó mediante la técnica de PCR, aplicada con cebadores específicos a los tratamientos con bacterias cultivadas.

3.4. Microorganismos espontáneos. Los microorganismos que presentan gen nitrato-reductasa NR, detectados mediante técnicas de PCR en el presentes en los tratamientos con bacterias espontáneas o naturales, y que participan del proceso de nitrificación de los nutrientes en el agua de cultivo de *Litopenaeus vannamei*, son especies de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*. Esto se comprobó mediante la técnica de PCR, aplicada con cebadores específicos para identificación de bacterias y genes, a los tratamientos con bacterias espontáneas.

3.5. Nutrientes en el agua.

El amonio se mantuvo en una constante subida, a medida que pasaban los días del cultivo, teniendo un mínimo de 0,0005 ppm a un máximo de 0,36 ppm, aunque estadísticamente no hubo diferencia significativa, si se apreció que en los tratamientos con geotextil estuvieron más bajos que los tratamientos sin geotextil, tal como se muestra en la tabla 3 y la figura 11.

Tabla3. Resultados del amonio durante el experimento

Fecha	Días	(T ₀ R ₁)	(T ₀ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	0.006	0.005	0.0055
24/06/2009	7	0.004	0.061	0.0325
02/07/2009	15	0.002	0.135	0.0685
08/07/2009	21	0.002	0	0.001
15/07/2009	28	0.002	0.005	0.0035
23/07/2009	36	0.007	0.073	0.04
31/07/2009	44	0.038	0.076	0.057
05/08/2009	49	0.007	0.005	0.006
13/08/2009	57	0.015	0.192	0.1035

Fecha	Días	(T ₁ R ₁)	(T ₁ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	0.006	0.006	0.006
24/06/2009	7	0.061	0.042	0.0515
02/07/2009	15	0.135	0.091	0.113
08/07/2009	21	0	0.004	0.002
15/07/2009	28	0.008	0.002	0.005
23/07/2009	36	0.006	0.01	0.008
31/07/2009	44	0.008	0.018	0.013
05/08/2009	49	0.008	0.019	0.0135
13/08/2009	57	0.003	0.01	0.0065

Fecha	Días	(T ₂ R ₁)	(T ₂ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	0.005	0.004	0.0045
24/06/2009	7	0.057	0.007	0.032
02/07/2009	15	0.127	0.01	0.0685
08/07/2009	21	0.001	0.002	0.0015
15/07/2009	28	0.004	0.017	0.0105
23/07/2009	36	0.012	0.013	0.0125
31/07/2009	44	0.015	0.192	0.1035
05/08/2009	49	0.01	0.023	0.0165
13/08/2009	57	0.003	0.027	0.015

Fecha	Días	(T ₃ R ₁)	(T ₃ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	0.01	0.006	0.008
24/06/2009	7	0.66	0.067	0.3635
02/07/2009	15	0.14	0.149	0.1445
08/07/2009	21	0.007	0.001	0.004
15/07/2009	28	0.022	0.012	0.017
23/07/2009	36	0.003	0.01	0.0065
31/07/2009	44	0.014	0.018	0.016
05/08/2009	49	0.008	0.01	0.009
13/08/2009	57	0.003	0.011	0.007

Fecha	Días	(T ₄ R ₁)	(T ₄ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	0.004	0.005	0.0045
24/06/2009	7	0.089	0.082	0.0855
02/07/2009	15	0.202	0.185	0.1935
08/07/2009	21	0	0.001	0.0005
15/07/2009	28	0.005	0.009	0.007
23/07/2009	36	0.012	0.014	0.013
31/07/2009	44	0.006	0.014	0.01
05/08/2009	49	0.004	0.003	0.0035
13/08/2009	57	0.012	0.019	0.0155

Fecha	Días	(T ₅ R ₁)	(T ₅ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	0.006	0.006	0.006
24/06/2009	7	0.061	0.042	0.0515
02/07/2009	15	0.135	0.091	0.113
08/07/2009	21	0	0.004	0.002
15/07/2009	28	0.008	0.002	0.005
23/07/2009	36	0.006	0.01	0.008
31/07/2009	44	0.008	0.018	0.013
05/08/2009	49	0.008	0.019	0.0135
13/08/2009	57	0.005	0.01	0.0075

T₀: tratamiento control (sin geotextil)

T₁: geotextil + perifiton espontáneo

T₂: geotextil + perifiton domesticado

T₃: geotextil + perifiton espontáneo + carbono (azúcar)

T₄: geotextil + perifiton domesticado + carbono (azucar)

T₅: sin geotextil (sólo carbono)

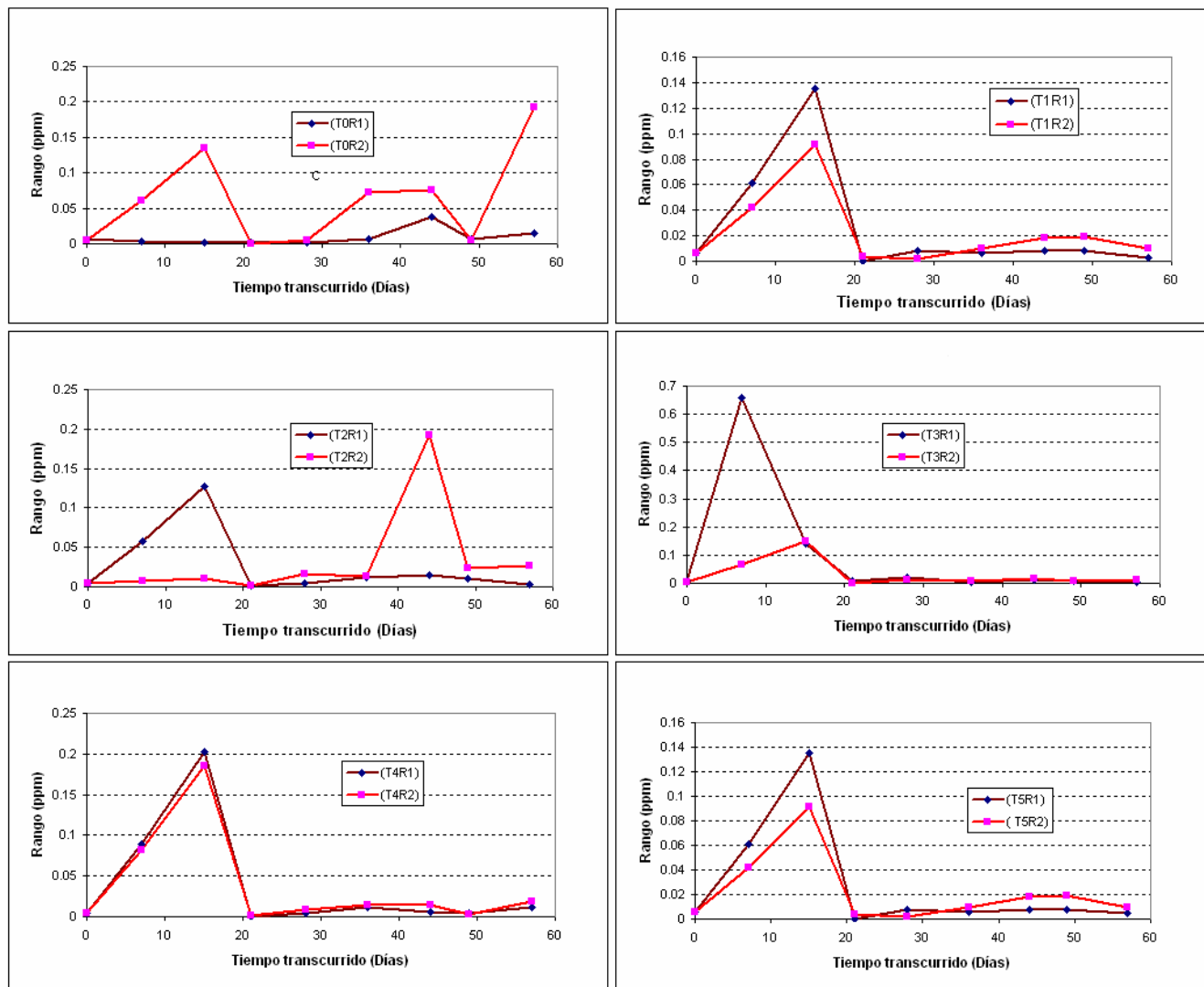


Fig. 11. Fluctuación del Amonio durante el experimento

T₀ : tratamiento control (sin geotextil)

T₁ : geotextil + perifiton espontáneo

T₂ : geotextil + perifiton domesticado

T₃ : geotextil + perifiton espontáneo + carbono (azúcar)

T₄ : geotextil + perifiton domesticado + carbono (azucar)

T₅ : sin geotextil (sólo carbono)

El ion amonio tuvo subidas y bajadas a medida que pasaban los días del cultivo, teniendo un mínimo de 0,007 ppm a un máximo de 2,61 ppm, aunque estadísticamente no hubo diferencia significativa, si se apreció que en los tratamientos con geotextil estuvieron ligeramente más bajos que los tratamientos sin geotextil, tal como se muestra en la tabla 4 y la figura 12.

Tabla 4. Resultados del ion amonio durante el experimento

Fecha	Días	(T ₀ R ₁)	(T ₀ R ₂)	Promedio	Fecha	Días	(T ₁ R ₁)	(T ₁ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	0,076	0,073	0,0745	17/06/2009	0	0,087	0,076	0,0815
24/06/2009	7	0,057	0,829	0,443	24/06/2009	7	0,84	0,573	0,7065
02/07/2009	15	0,034	1,836	0,935	02/07/2009	15	1,843	1,236	1,5395
08/07/2009	21	0,021	0	0,0105	08/07/2009	21	0,002	0,05	0,026
15/07/2009	28	0,027	0,074	0,0505	15/07/2009	28	0,11	0,031	0,0705
23/07/2009	36	0,101	0,32	0,2105	23/07/2009	36	0,082	0,139	0,1105
31/07/2009	44	0,524	1,033	0,7785	31/07/2009	44	0,114	0,244	0,179
05/08/2009	49	0,098	0,065	0,0815	05/08/2009	49	0,105	0,265	0,185
13/08/2009	57	0,197	2,605	1,401	13/08/2009	57	0,063	0,132	0,0975

Fecha	Días	(T ₂ R ₁)	(T ₂ R ₂)	Promedio	Fecha	Días	(T ₃ R ₁)	(T ₃ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	0,067	0,06	0,0635	17/06/2009	0	0,14	0,087	0,1135
24/06/2009	7	0,78	0,09	0,435	24/06/2009	7	0,898	0,916	0,907
02/07/2009	15	1,73	0,131	0,9305	02/07/2009	15	1,908	2,022	1,965
08/07/2009	21	0,01	0,027	0,0185	08/07/2009	21	0,092	0,011	0,0515
15/07/2009	28	0,057	0,225	0,141	15/07/2009	28	0,303	0,161	0,232
23/07/2009	36	0,161	0,175	0,168	23/07/2009	36	0,047	0,139	0,093
31/07/2009	44	0,2	2,605	1,4025	31/07/2009	44	0,185	0,227	0,206
05/08/2009	49	0,132	0,317	0,2245	05/08/2009	49	0,103	0,43	0,2665
13/08/2009	57	0,035	0,37	0,2025	13/08/2009	57	0,043	0,155	0,099

Fecha	Días	(T ₄ R ₁)	(T ₄ R ₂)	Promedio	Fecha	Días	(T ₅ R ₁)	(T ₅ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	0,056	0,062	0,059	17/06/2009	0	0,107	0,08	0,0935
24/06/2009	7	1,212	1,114	1,163	24/06/2009	7	1,269	1,052	1,1605
02/07/2009	15	2,753	2,518	2,6355	02/07/2009	15	2,819	2,349	2,584
08/07/2009	21	0	0,007	0,0035	08/07/2009	21	0,02	0,522	0,271
15/07/2009	28	0,068	0,122	0,095	15/07/2009	28	0,114	0,031	0,0725
23/07/2009	36	0,161	0,195	0,178	23/07/2009	36	0,168	0,25	0,209
31/07/2009	44	0,085	0,189	0,137	31/07/2009	44	0,142	0,247	0,1945
05/08/2009	49	0,051	0,047	0,049	05/08/2009	49	0,159	0,142	0,1505
13/08/2009	57	0,165	0,253	0,209	13/08/2009	57	0,035	0,018	0,0265

T₀: tratamiento control (sin geotextil)

T₁: geotextil + perifiton espontáneo

T₂: geotextil + perifiton domesticado

T₃: geotextil + perifiton espontáneo + carbono (azúcar)

T₄: geotextil + perifiton domesticado + carbono (azúcar)

T₅: sin geotextil (sólo carbono)

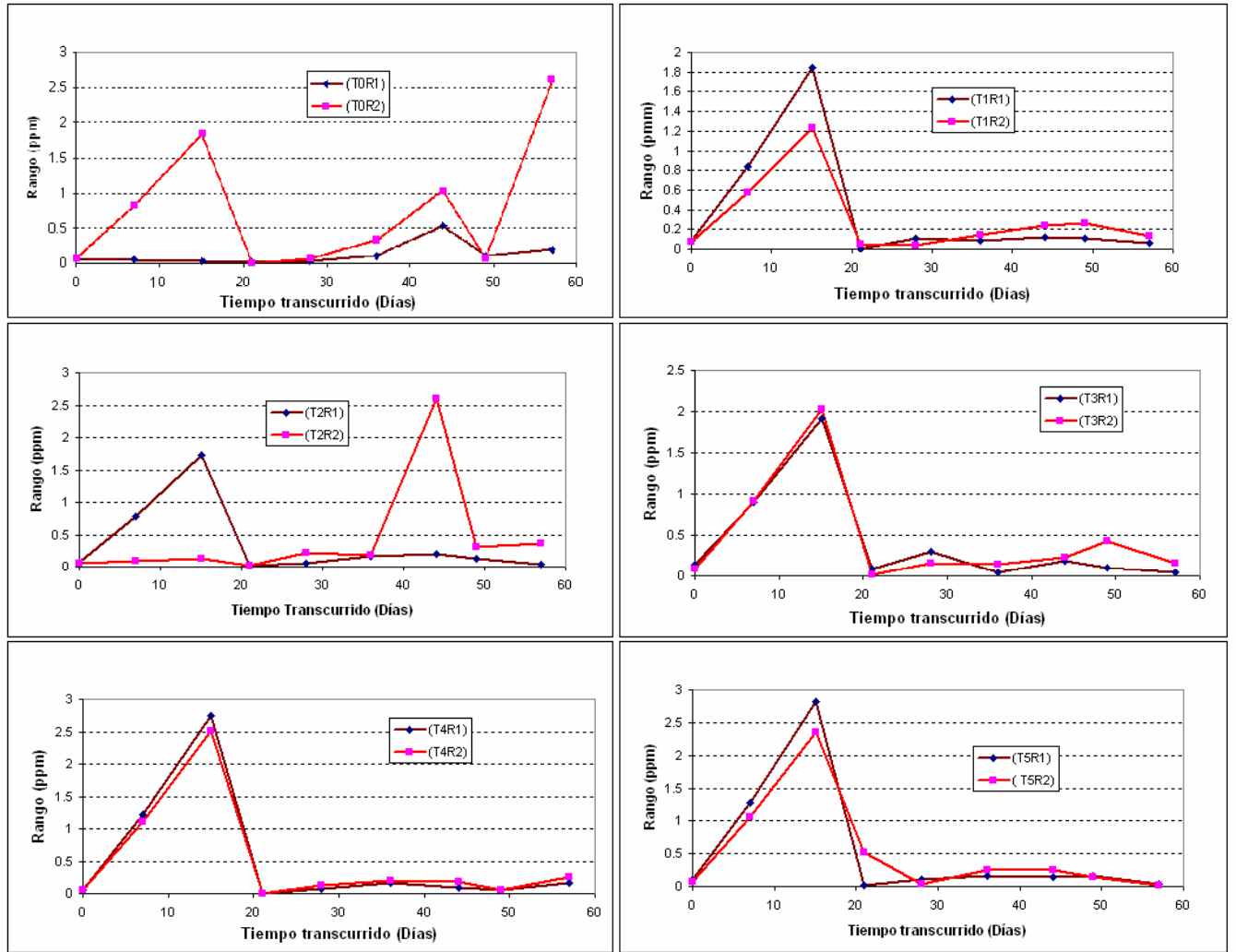


Fig. 12. Fluctuación del Ion amonio durante el experimento

T₀ : tratamiento control (sin geotextil)

T₁ : geotextil + perifiton espontáneo

T₂ : geotextil + perifiton domesticado

T₃ : geotextil + perifiton espontáneo + carbono (azúcar)

T₄ : geotextil + perifiton domesticado + carbono (azucar)

T₅ : sin geotextil (sólo carbono)

Los nitritos subieron por algunas semanas, pero luego disminuyeron hasta estabilizarse teniendo un mínimo de 0,03 ppm a un máximo de 22,36 ppm, aunque estadísticamente no hubo diferencia significativa, si se apreció que en los tratamientos sin geotextil estuvieron ligeramente más altos que los tratamientos con geotextil, tal como se muestra en la tabla 5 y la figura 13.

Tabla 5. Resultados de los nitritos durante el experimento

Fecha	Días	(T ₀ R ₁)	(T ₀ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	0.019	0.068	0.0435
24/06/2009	7	1.824	0.996	1.41
02/07/2009	15	4.231	2.079	3.155
08/07/2009	21	4.923	4.647	4.785
15/07/2009	28	15.783	13.686	14.7345
23/07/2009	36	12.76	10.42	11.59
31/07/2009	44	13.615	8.821	11.218
05/08/2009	49	22.566	18.9	20.733
13/08/2009	57	13.586	6.001	9.7935

Fecha	Días	(T ₁ R ₁)	(T ₁ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	0.019	0.23	0.1245
24/06/2009	7	1.462	1.213	1.3375
02/07/2009	15	3.385	2.359	2.872
08/07/2009	21	4.654	4.714	4.684
15/07/2009	28	13.238	12.068	12.653
23/07/2009	36	7.69	16.153	11.9215
31/07/2009	44	12.757	15.87	14.3135
05/08/2009	49	17.018	18.559	17.7885
13/08/2009	57	17.545	17.369	17.457

Fecha	Días	(T ₂ R ₁)	(T ₂ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	0.23	0.154	0.192
24/06/2009	7	1.213	1.796	1.5045
02/07/2009	15	2.359	3.986	3.1725
08/07/2009	21	4.714	6.112	5.413
15/07/2009	28	12.068	9.279	10.6735
23/07/2009	36	16.153	8.372	12.2625
31/07/2009	44	15.87	8.031	11.9505
05/08/2009	49	18.559	13.05	15.8045
13/08/2009	57	17.369	2.013	9.691

Fecha	Días	(T ₃ R ₁)	(T ₃ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	0.032	0.028	0.03
24/06/2009	7	0.968	0.589	0.7785
02/07/2009	15	2.215	1.338	1.7765
08/07/2009	21	6.372	4.966	5.669
15/07/2009	28	13.803	11.756	12.7795
23/07/2009	36	11.405	11.902	11.6535
31/07/2009	44	11.451	12.663	12.057
05/08/2009	49	18.539	17.35	17.9445
13/08/2009	57	18.54	15.292	16.916

Fecha	Días	(T ₄ R ₁)	(T ₄ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	0.173	0.18	0.1765
24/06/2009	7	1.077	1.004	1.0405
02/07/2009	15	2.283	2.103	2.193
08/07/2009	21	4.377	4.593	4.485
15/07/2009	28	21.906	12.058	16.982
23/07/2009	36	13.657	9.854	11.7555
31/07/2009	44	13.81	9.93	11.87
05/08/2009	49	21.191	11.236	16.2135
13/08/2009	57	16.55	5.464	11.007

Fecha	Días	(T ₅ R ₁)	(T ₅ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	0.049	0.071	0.06
24/06/2009	7	0.75	0.188	0.469
02/07/2009	15	1.685	0.344	1.0145
08/07/2009	21	4.563	5.687	5.125
15/07/2009	28	22.305	16.563	19.434
23/07/2009	36	12.799	11.502	12.1505
31/07/2009	44	15.546	13.335	14.4405
05/08/2009	49	25.862	13.927	19.8945
13/08/2009	57	25.481	19.232	22.3565

T₀: tratamiento control (sin geotextil)

T₁: geotextil + perifiton espontáneo

T₂: geotextil + perifiton domesticado

T₃: geotextil + perifiton espontáneo + carbono (azúcar)

T₄: geotextil + perifiton domesticado + carbono (azúcar)

T₅: sin geotextil (sólo carbono)

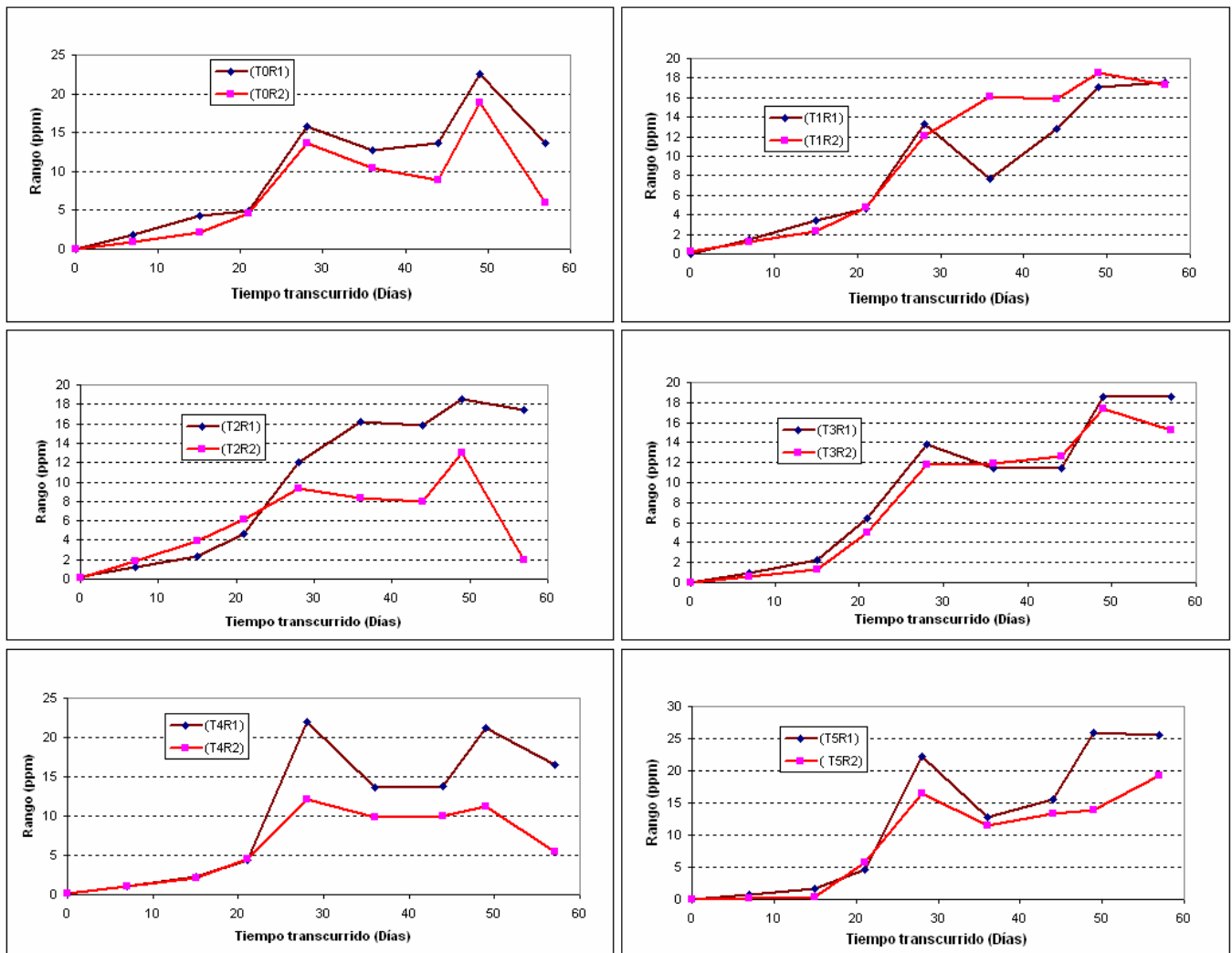


Fig. 13. Fluctuación de los nitritos durante el experimento

T₀: tratamiento control (sin geotextil)

T₃: geotextil + perifiton espontáneo + carbono (azúcar)

T₁: geotextil + perifiton espontáneo

T₄: geotextil + perifiton domesticado + carbono (azúcar)

T₂: geotextil + perifiton domesticado

T₅: sin geotextil (sólo carbono)

Los nitratos se mantuvieron en un constante subida, a medida que pasaban los días del cultivo, pero después de la tercera semana se mantuvo casi constante, teniendo un mínimo de 0,25 ppm a un máximo de 13,0 ppm, estadísticamente no hubo diferencia significativa entre los tratamientos con geotextil y los tratamientos sin geotextil, tal como se muestra en la tabla 6 y la figura 14.

Tabla 6. Resultados de los nitratos durante el experimento

Fecha	Días	(T ₀ R ₁)	(T ₀ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	0.25	0.25	0.25
24/06/2009	7	1	0.8	0.9
02/07/2009	15	12	3.5	7.75
08/07/2009	21	12	12	12
15/07/2009	28	11.5	12	11.75
23/07/2009	36	12	11	11.5
31/07/2009	44	12	12	12
05/08/2009	49	12	12	12
13/08/2009	57	12	12	12

Fecha	Días	(T ₁ R ₁)	(T ₁ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	0.25	0.25	0.25
24/06/2009	7	0.2	0.3	0.25
02/07/2009	15	6	3.5	4.75
08/07/2009	21	12	11	11.5
15/07/2009	28	11	12	11.5
23/07/2009	36	12	11	11.5
31/07/2009	44	12	11.5	11.75
05/08/2009	49	12	12	12
13/08/2009	57	12	11	11.5

Fecha	Días	(T ₂ R ₁)	(T ₂ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	1	0.5	0.75
24/06/2009	7	1	1.3	1.15
02/07/2009	15	4	9	6.5
08/07/2009	21	12	10	11
15/07/2009	28	12	11	11.5
23/07/2009	36	12	11	11.5
31/07/2009	44	12	11.5	11.75
05/08/2009	49	12	12	12
13/08/2009	57	12	10	11

Fecha	Días	(T ₃ R ₁)	(T ₃ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	0.2	0.25	0.225
24/06/2009	7	0.2	0.3	0.25
02/07/2009	15	4	2.5	3.25
08/07/2009	21	12	12	12
15/07/2009	28	12	13	12.5
23/07/2009	36	12	12.5	12.25
31/07/2009	44	12	12.5	12.25
05/08/2009	49	12	12	12
13/08/2009	57	12	12	12

Fecha	Días	(T ₄ R ₁)	(T ₄ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	0.4	1	0.7
24/06/2009	7	0.25	0.8	0.525
02/07/2009	15	4	4	4
08/07/2009	21	13	13	13
15/07/2009	28	11	11	11
23/07/2009	36	12.5	11	11.75
31/07/2009	44	12.5	11	11.75
05/08/2009	49	12	11.5	11.75
13/08/2009	57	12	10.5	11.25

Fecha	Días	(T ₅ R ₁)	(T ₅ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	0.2	0.25	0.225
24/06/2009	7	0.2	0.3	0.25
02/07/2009	15	3	1	2
08/07/2009	21	13	11	12
15/07/2009	28	11	13	12
23/07/2009	36	11	12	11.5
31/07/2009	44	11	12	11.5
05/08/2009	49	11.5	12	11.75
13/08/2009	57	12	11.5	11.75

T₀ : tratamiento control (sin geotextil)

T₁ : geotextil + perifiton espontáneo

T₂ : geotextil + perifiton domesticado

T₃ : geotextil + perifiton espontáneo + carbono (azúcar)

T₄ : geotextil + perifiton domesticado + carbono (azúcar)

T₅ : sin geotextil (sólo carbono)

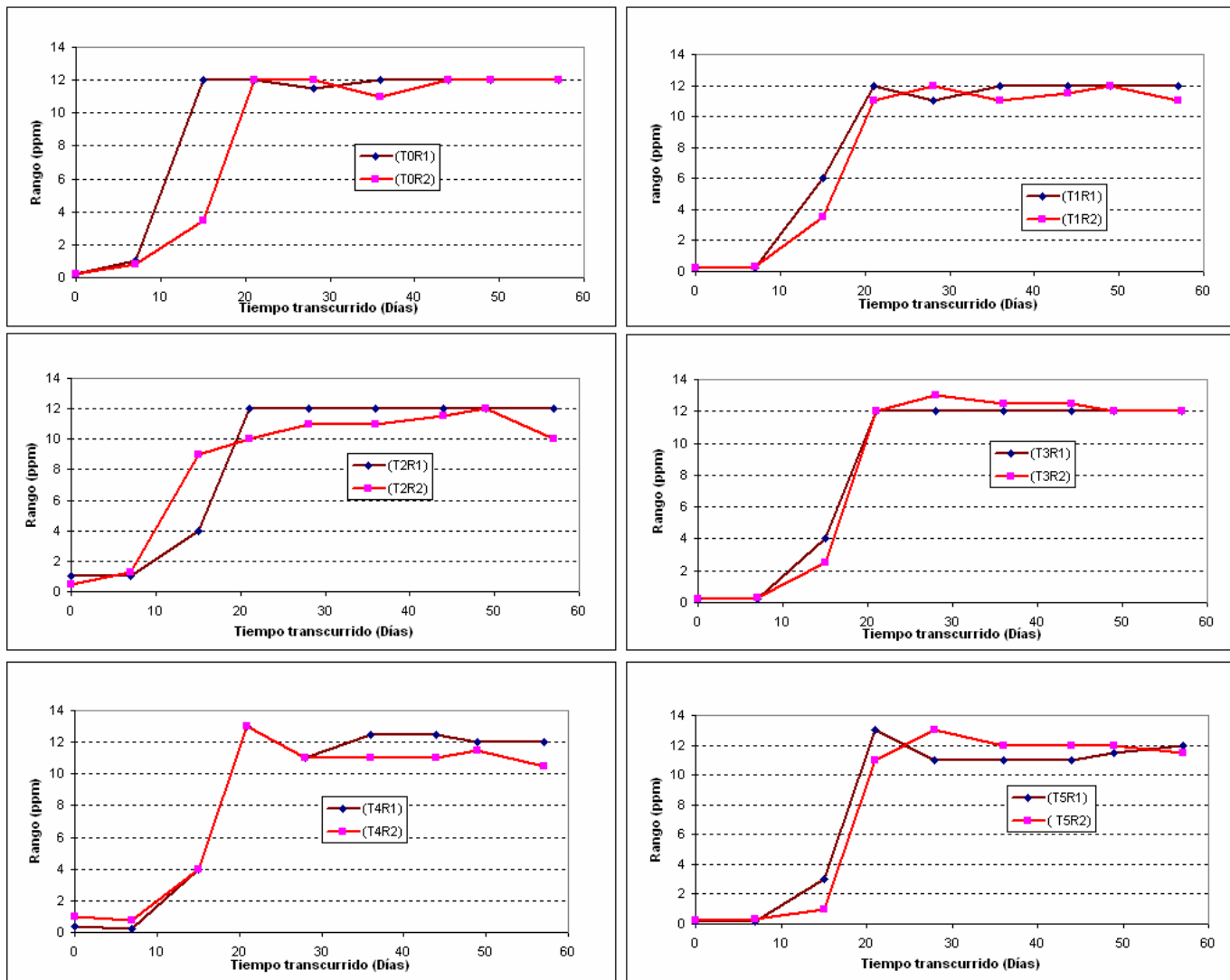


Fig. 14. Fluctuación del nitrato durante el experimento

T₀: tratamiento control (sin geotextil)

T₃: geotextil + perifiton espontáneo + carbono (azúcar)

T₁: geotextil + perifiton espontáneo

T₄: geotextil + perifiton domesticado + carbono (azúcar)

T₂: geotextil + perifiton domesticado

T₅: sin geotextil (sólo carbono)

Los fosfatos se mantuvieron en un constante subida, a medida que pasaban los días del cultivo, teniendo un mínimo de 0,46 ppm a un máximo de 4,99 ppm, aunque estadísticamente no hubo diferencia significativa, si se apreció que en los tratamientos sin geotextil estuvieron ligeramente más altos que los tratamientos con geotextil, tal como se muestra en la tabla 7 y la figura 15.

Tabla 7. Resultados de los fosfatos durante el experimento

Fecha	Días	(T ₀ R ₁)	(T ₀ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	0.192	0.721	0.4565
24/06/2009	7	0.844	0.943	0.8935
02/07/2009	15	1.713	1.238	1.4755
08/07/2009	21	2.211	1.629	1.92
15/07/2009	28	1.966	1.586	1.776
23/07/2009	36	1.916	1.391	1.6535
31/07/2009	44	2.571	1.989	2.28
05/08/2009	49	3.375	2.701	3.038
13/08/2009	57	5.229	3.801	4.515

Fecha	Días	(T ₁ R ₁)	(T ₁ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	0.204	0.112	0.158
24/06/2009	7	0.736	0.547	0.6415
02/07/2009	15	1.445	1.127	1.286
08/07/2009	21	1.563	1.533	1.548
15/07/2009	28	2.061	1.579	1.82
23/07/2009	36	1.472	1.41	1.441
31/07/2009	44	2.372	2.724	2.548
05/08/2009	49	3.103	3.781	3.442
13/08/2009	57	4.222	4.846	4.534

Fecha	Días	(T ₂ R ₁)	(T ₂ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	0.405	0.646	0.5255
24/06/2009	7	0.578	1.216	0.897
02/07/2009	15	0.809	1.977	1.393
08/07/2009	21	2.264	1.924	2.094
15/07/2009	28	1.843	2.28	2.0615
23/07/2009	36	1.943	2.146	2.0445
31/07/2009	44	2.682	2.766	2.724
05/08/2009	49	3.559	4.138	3.8485
13/08/2009	57	4.23	5.747	4.9885

Fecha	Días	(T ₃ R ₁)	(T ₃ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	0.922	0.103	0.513
24/06/2009	7	1.139	0.834	0.987
02/07/2009	15	1.429	1.809	1.619
08/07/2009	21	1.104	1.924	1.514
15/07/2009	28	1.295	1.839	1.567
23/07/2009	36	1.334	1.514	1.424
31/07/2009	44	1.686	2.268	1.977
05/08/2009	49	2.57	3.452	3.011
13/08/2009	57	2.709	4.781	3.745

Fecha	Días	(T ₄ R ₁)	(T ₄ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	1.301	0.749	1.025
24/06/2009	7	1.559	1.554	1.5565
02/07/2009	15	1.904	2.628	2.266
08/07/2009	21	2.422	3.046	2.734
15/07/2009	28	2.065	2.862	2.4635
23/07/2009	36	2.245	2.257	2.251
31/07/2009	44	2.789	2.69	2.7395
05/08/2009	49	4.03	4.161	4.0955
13/08/2009	57	4.846	2.088	3.467

Fecha	Días	(T ₅ R ₁)	(T ₅ R ₂)	Promedio
17/06/2009	0	0.974	0.462	0.718
24/06/2009	7	1.218	0.68	0.949
02/07/2009	15	1.544	0.97	1.257
08/07/2009	21	2.399	1.59	1.9945
15/07/2009	28	1.464	2.264	1.864
23/07/2009	36	2.387	2.058	2.2225
31/07/2009	44	2.548	2.138	2.343
05/08/2009	49	3.119	2.789	2.954
13/08/2009	57	3.973	3.169	3.571

T₀: tratamiento control (sin geotextil)

T₁: geotextil + perifiton espontáneo

T₂: geotextil + perifiton domesticado

T₃: geotextil + perifiton espontáneo + carbono (azúcar)

T₄: geotextil + perifiton domesticado + carbono (azúcar)

T₅: sin geotextil (sólo carbono)

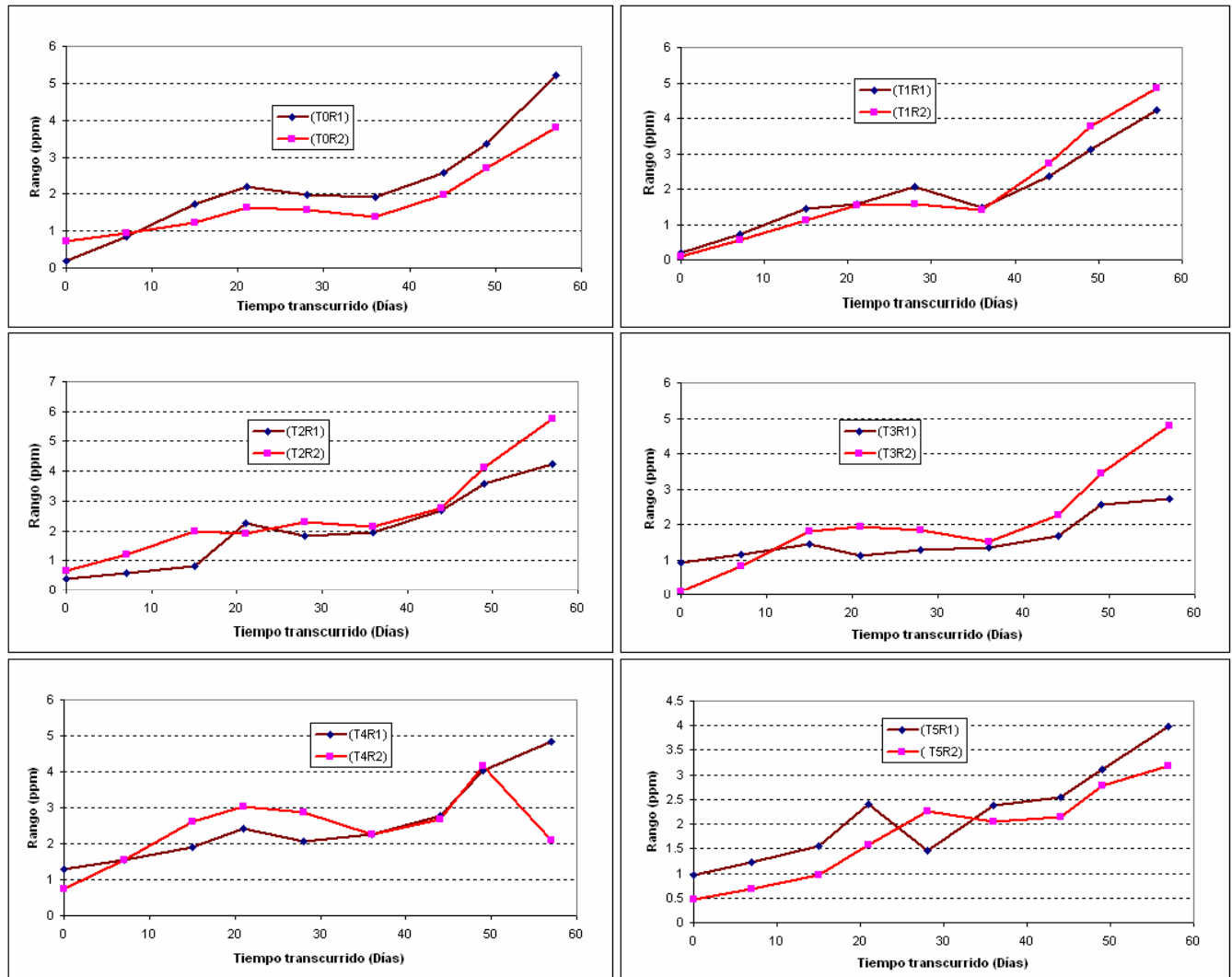


Fig. 15. Fluctuación del fosfato durante el experimento

T₀: tratamiento control (sin geotextil)

T₃: geotextil + perifiton espontáneo + carbono (azúcar)

T₁: geotextil + perifiton espontáneo

T₄: geotextil + perifiton domesticado + carbono (azúcar)

T₂: geotextil + perifiton domesticado

T₅: sin geotextil (sólo carbono)

IV. DISCUSION

El uso de bacterias nitrificantes, como biorremediadores de efluentes, tanto bacterias de los géneros nitrobacter como nitrosomas, es de gran importancia en la degradación de la materia orgánica presente en endosos del agua de cultivo de camarones. Estas bacterias con ayuda del oxígeno oxidan los nutrientes, convirtiéndolos en primer lugar de amonio a nitrito y luego de nitrito a nitrato, este último menos tóxico para los organismos cultivados y además sirve como fertilizante del agua, tal como lo mencionan Azim *et. al.*, 2003 y Bender *et. al.*, 2004.

El nitrógeno es uno de estos nutrientes; el mismo que es introducido a los sistemas de cultivo principalmente a través de la adición de alimentos balanceados e incorporado en biomasa de camarón. Sin embargo, los sistemas de cultivo pueden ser ineficientes en transformar el nitrógeno en biomasa, su eficiencia puede ser determinada por medio de un cálculo del nitrógeno en el estanque de cultivo (González-Félix y Pérez-Velázquez, 2006). Por su parte (Gómez y Ramírez, 2004), manifiestan que la mayoría de los contaminantes tiene un efecto directo sobre diferentes procesos fisiológicos y biológicos de la biota, manifestándose algunos de sus efectos tóxicos, ejemplo, la reducción del crecimiento, inhibición de la fotosíntesis, variación en el contenido de pigmentos fotosintéticos celulares, inhibición de la actividad enzimática y degeneración de cloroplastos y mitocondrias, entre otros. Generalmente, los efluentes industriales se consideran como mezclas complejas que contienen sustancias orgánicas disueltas, incluyendo tóxicos, materiales biodegradables y persistentes, sustancias inorgánicas disueltas, nutrientes, sustancias orgánicas insolubles y solubles, con un impacto negativo sobre el ecosistema. Todo esto se puede corroborar en menor o mayor grado como un impacto ecológico al ecosistema de manglar que colinda con la industria camaronera de (Tumbes) Perú y Ecuador.

La nitrificación es un proceso biológico aerobio realizado por microorganismos Gram-negativos litroautotróficos que pertenecen a la familia Nitrobacteriaceae,

cuya función es la eliminación del nitrógeno presente en las aguas residuales, este proceso consiste en dos etapas que consiste en la conversión de el amonio a nitrito y este a su vez en es convertido nitrato, mediante las bacterias específicas de los géneros Nitrosomas y Nitrosolobus para la primera fase y los géneros Nitrobacter y Nitrosococcus para la segunda fase (Cervantes-Carrillo, Pérez y Gómez, 2000).

La nitrificación se ve limitada por la temperatura, por debajo de 5°C y por encima de 40 °C la nitrificación es muy baja. En este trabajo no hubo este problema, pues la temperatura del agua osciló en el rango de 23°C, con un promedio de 24,5°C, siendo aún muy baja para la zona, pues el promedio anual es de 27°C; según (Limsuwan, 2005), la temperatura óptima de cultivo debe fluctuar entre 27 y 31° C, por debajo de este rango el crecimiento es lento y arriba de 31° C el animal pierde peso por alto metabolismo necesitando consumir más alimento balanceado.

Los componentes de nitrógeno desempeñan un papel clave en la gestión de la calidad del agua de la acuicultura, el cultivo de especies acuáticas semiintensiva depende de la producción primaria, que puede ser mejorada por la aportación de nitrógeno en la columna de agua a través de la fertilización.

Por su parte, el pH es un factor decisivo en la nitrificación, por debajo de pH 5 no se registra nitrificación en cultivos puros. Para el trabajo se registró un pH mínimo de 7,44 a un máximo de 9,04; por consecuencia, osciló entre el rango recomendado por la literatura, para que las bacterias realicen la nitrificación. El rango óptimo del pH para el cultivo de camarón es de 7,5 en la mañana y 8,5 en la tarde (Limsuwan, 2005).

Las bacterias espontáneas reportadas por la técnica de PCR, usando cebadores específicos para genes nitrato-reductasa, corresponden a los géneros Nitrosomonas y Nitrobacter, siendo similares a las bacterias que presentan gen nitrato-reductasa, importantes en el proceso de nitrificación de los desechos orgánicos presentes en el agua de cultivo de camarón en Tumbes y que se

cultivaron para ser utilizadas como bacterias domesticadas como son Bacterias nitrato-reductasa: *Shewanella sp.* y *Bacillus sp.*

Aunque estadísticamente, en lo que respecta al crecimiento del camarón, no hubo diferencias significativas entre los diferentes tratamientos y el control, si se pudo notar aritméticamente que los resultados favorecieron a los tratamientos donde se colocó geotextil; por otro lado, entre las bacterias espontáneas y las domesticadas no se pudo notar diferencia estadística ni aritmética alguna, mucho menos en donde no se colocó geotextil pero si azúcar como fuente de nutrientes para el metabolismo de las bacterias.

Con respecto a la supervivencia de los camarones, no se pudo mostrar diferencia estadística alguna entre los diferentes tratamientos y el control, siendo el porcentaje de supervivientes entre 70 a 80% similar a como se maneja en el cultivo de este crustáceo en la región Tumbes desde hace varios años.

Los parámetros físicos del agua, salinidad y pH se encontraron dentro de los rangos recomendados para el cultivo de este crustáceo por Boyd, 2000, más no así la temperatura que se manifestó muy por debajo de la media anual, provocando con ello el lento crecimiento del camarón.

La oxigenación de los acuarios fue constante, pues se trabajo con un blower de 3 HP, el mismo que dejó de airear sólo una hora por 8 horas de trabajo, todo esto, considerando que el oxígeno es importante en la nitrificación ya que las bacterias nitrificantes quimioautotróficas son aerobios obligadas.

En el cultivo de camarón, la melaza, junto con los nutrientes mayores (nitrógeno, fósforo), el carbono orgánico aportado por la melaza es requerido por las bacterias y algas, en la constitución de sus membranas y organelos y como fuente de energía principalmente en el proceso de fotosíntesis (Talavera, Sánchez y Zapata, 1998). En este trabajo se utilizó, en 6 tratamientos, azúcar como fuente de carbono orgánico, observándose en los tratamientos con geotextil, un mejor desarrollo bacteriano.

V. CONCLUSIONES

1. La presencia de nutrientes como amonio ionizado, nitrito y nitrato son reducidos a través del proceso de nitrificación por parte de las bacterias nitrificantes, siendo esto ligeramente mayor en los tratamientos con tapetes de geotextil y microorganismos de este tipo.
2. Los tratamientos con presencia de tapetes de geotextil, como sustrato de fijación de microorganismos (entre ellos bacterias nitrificantes), fueron los que presentaron mejor calidad de agua en el cultivo y efluente, ya sea por transparencia del agua o por la menor cantidad de ion amonio y nitritos.
3. Las bacterias que presentan genes nitrato-reductasa NR, presentes en el agua de cultivo de *Litopenaeus vannamei*, identificadas a través de la técnica molecular PCR, son las que a continuación se mencionan: especies Nitrosomonas y Nitrobacter.
4. No hubo diferencia significativa entre las bacterias cultivadas (domesticadas) y las que se encuentran presentes en el medio (espontáneas) en lo que a nitrificación corresponde.
5. La adición de carbono ayudó a mejorar la metabolización bacteriana pues en los tratamientos en que se agregó azúcar se encontró mayor concentración de bacterias.
6. El crecimiento del camarón se presentó muy lento, debido a la baja temperatura que se presentó en la época, siendo ésta menor al promedio anual que se observa en la zona.
7. La supervivencia del camarón si estuvo dentro de los rangos recomendados por los criadores de camarón de la zona.
8. Los parámetros físicos como salinidad y pH se mantuvieron dentro del rango de cultivo de camarón en Tumbes, más no así la temperatura que para la época bajo por el nivel medio anual (27°C), observándose como consecuencia un bajo crecimiento del camarón.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abeliovich A. 1992. Transformations of ammonia and the environmental impact of nitrifying bacteria. *Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. Biodegradation* 3: 255-264, 1992.
- Abraham, T. J.; Ghosh, S.; Nagesh, T. S. and Sasmal D. 2004. Distribution of bacteria involved in nitrogen and sulphur cycles in shrimp culture systems of West Bengal, India. *Aquaculture* 239: 275–288.
- Abreu, P. C.; Ballester, E. L. C.; Odebrecht C.; Wasielesky Jr. W.; Cavalli, R. O.; Granéli, W. and Anésio, A. M. 2007. Importance of biofilm as food source for shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*) evaluated by stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 347: 88–96.
- Allen, A. E. and Ward, B. B. 2005. Characterization of diatom (bacillariophyceae) nitrate reductase genes and their detection in marine phytoplankton communities. *Phycological Society of America. J. Phycol.* 41: 95–104.
- Azim, M. E.; Wahab, M. A.; van Dam, A. A.; Beveridge, M. C. M., and Verdegem, M. C. J. 2001. The potential of periphyton-based culture of two Indian major carps, rohu *Labeo rohita* (Hamilton) and gonia *Labeo gonia* (Linnaeus). *Aquaculture Research*, Vol. 32(3), 209-216.
- Azim, M. E.; Milstein, A.; Wahab, M. A. and Verdegem, M. C. J. 2003. Periphyton-water quality relationships in fertilized fishponds with artificial substrates. *Aquaculture*, Vol. 228 (1-4), 169-187.
- Bender, J.; Lee, R.; Sheppard, M.; Brinkley, K.; Phillips, P.; Yeboah, Y. and Wah, R. Ch. 2004. A waste effluent treatment system based on microbial mats for black sea bass *Centropristis striata* recycled-water mariculture. *Aquacultural Engineering* 31: 73–82.

- Bender, J. and Phillips, P. 2004. Microbial mats for multiple applications in aquaculture and bioremediation. *Bioresource Technology*, Vol. 94(3), 229-238.
- Berges, J. A. 1997. Algal nitrate reductases. *European Journal of Phycology*, 32:1,3 - 8.
- Boyd C. E. 2000. Prácticas de manejo para reducir el impacto ambiental del cultivo de camarón Department of Fisheries and Allied Aquacultures Auburn University, Alabama 36849 USA.
- Callow J.A. and Callow M.E. 2006. Biofilms. School of Biosciences the University of Birmingham. UK.
- Cervantes-Carrillo, F.; Pérez, J. y Gómez J. 2000. Avances en la Eliminación Biológica del Nitrógeno de las Aguas Residuales. *Rev. Latinoamericana de Microb.* 42:73-82.
- Crab, R.; Avnimelech, Y.; Defoirdt, T.; Bossier, P. and Verstraete, W. 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*, Vol. 270: 1-14.
- Dacho, N. and Mustafa, S. 2008. Effluent and disease management in traditional practices of shrimp farming: A case study on the west coast of Sabah, Malaysia. Borneo Marine Research Institute, University Malaysia Sabah, 88999 Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia.
- Feliatra, F., Nur Nursyiwani, Bianchi, M. 2003. Role of nitrifying bacteria in purification process of brackish water ponds (Tambak) in Riau Province, Indonesia. *Jurnal Natur Indonesia* 5(2): 133-138.
- Féray C., B. Volat, V. Degrange, A. Clays-Josserand and B. Montuelle. 1999. Assessment of Three Methods for Detection and Quantification of Nitrite-

Oxidizing Bacteria and *Nitrobacter* in Freshwater Sediments (MPN-PCR, MPN-Griess, Immunofluorescence). *Microb Ecol* (1999) 37:208–217.

Food And Agriculture Organization Of The United Nations. 2006. State of world aquaculture 2006. Inland Water Resources and Aquaculture Service Fishery Resources Division. FAO Fisheries Department. Rome.

Gómez Luna L. M. y Z. Ramírez Carmenate. 2004. Microalgas como biomonitores de contaminación. Laboratorio de Ecotoxicología Marina, Universidad de Oriente. *Rev. Cubana de Química*. Vol. XVI, N° 2.

González-Félix M. L. y M. Pérez-Velázquez. 2006. Un Panorama de los Presupuestos de Nitrógeno para Cultivo de Camarón. *Avances en Nutrición Acuícola VIII*. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 Noviembre. Mazatlán, Sinaloa, México.

Herrera, M. M. T. 2004. El papel del biofilm en el proceso infeccioso y la resistencia. *Univ. Colegio Mayor de Cundinamarca*. Bogotá, Colombia. Vol 2, pp 71-80.

Hodoki, Y. 2005. Bacteria biofilm encourages algal immigration onto substrata in lotic systems. *Hydrobiologia* 539: 27–34.

Ishida, C. K.; Arnon, S.; Peterson, C. G.; Kelly, J. J. and Gray, K. A. 2007. Influence of Algal Community Structure on Denitrification Rates in Periphyton Cultivated on Artificial Substrata. *Microb. Ecol.* Vol. Published online: 28 October 2007.

Kaplan D., R. Wilhelm and A. Abeliovich, 2000. Interdependent environmental factors controlling nitrification in waters. *Water Science and Technology* Vol 42 No 1–2 pp 167–172.

- Khatoon, H.; Yusoff, F. MD; Banerjee, S.; Shariff, M. and Mohamed, S. 2007. Use of periphytic cyanobacterium and mixed diatoms coated substrate for improving water quality, survival and growth of *Penaeus monodon* Fabricius postlarvae. *Aquaculture*, Vol. 271: 196-205.
- Knobelsdorf M. 2005. Eliminación biológica de nutrientes en un ARU de baja carga orgánica mediante el proceso VIP. Tesis doctoral. Univ. Politécnica de Catalunya. España.
- Kumar, A. and Prasad, R. 2006. Biofilms. JK Science. Journal Medical Education & Resecar. Edit. Board.
- Limsuwan Ch. 2005. CULTIVO INTENSIVO DEL CAMARON BLANCO (Resumen de visitas y conferencias a camarónicas del Perú en Noviembre 2005). Boletín Nicovita Camarón de mar.
- Lin, Y. F.; Jing, S. R.; Lee D. Y.; Chang, Y. F.; Chen, Y. M. and Shih, K. Ch. 2004. Performance of a constructed wetland treating intensive shrimp aquaculture wastewater under high hydraulic loading rate. *Environmental Pollution* 134: 411–421.
- Lopes, T. F.; Abreu, P. C. and Wasielesky, W. 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture* 203: 263–278.
- Pardo, S.; Suárez, H. y Soriano, E. 2006. Tratamiento de efluentes para la acuicultura responsable. *Rev. MVZ Córdoba*, Vol 11, Univ. de Córdoba, Montería, Colombia, pp 20-29.
- 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(2): 235-244.

- Risgaard-Petersen N., M. Nicolaisen, N. Revsbech, and B. Aa Lomstein. 2004. Competition between Ammonia-Oxidizing Bacteria and Benthic Microalgae. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Sept. 2004, p. 5528–5537.
- Ruíz O. 2008. Nitrification and denitrification bacterial communities in the sediment and rhizosphere of free water surface constructed wetland. Tesis doctoral. Univ. de Girona-España.
- Sousa, O. V.; Macrae, A.; Menezes, F.G.R.; Gomes, N.C.M.; Vieira, R.H.S.F. and Mendonca-Hager, L.C.S. 2006. The impact of shrimp farming effluent on bacterial communities in mangrove waters, Ceará, Brazil. *Marine Pollution Bulletin* Vol. 52, Issue 12, p. 1725–1734.
- Talavera V., M. Zapata y D. Sánchez. 1997. Amoníaco en estanques de producción camaronera. *Boletín Nicovita*. Edición Tumpis. Vol. 2.
- Talavera V., D. Sánchez y M. Zapata. 1998. Utilización de melaza en estanques de cultivo de camarón *Boletín Nicovita*, Vol.3.
- Talavera V., D. Sánchez y M. Zapata. 1999. La acuicultura potencial de camarón y otras especies acuícolas en los desiertos. *Boletín Nicovita*, Vol.4.
- Tartarotti B., G. Baffico, P. Temporetti, H. Zagarese. 2004. Dinámica del fósforo en cuerpos de agua con cría intensiva de salmonidos. *Journal of Plankton Research*. Oxford Univ.
- Thakur, D. P. and Lin, C. K. 2002. Water quality and nutrient budget in closed shrimp (*Penaeus monodon*) culture systems. *Aquacultural Engineering* 27: 159-176.

- Urakawa H., Sh. Murata, T. Fujiwara, D. Kuroiwa, H. Maki, S. Kawabata, T. Hiwatari, H. Ando, T. Kawai, M. Watanabe and K. Kohata. 2006. Characterization and quantification of ammoniaoxidizing bacteria in eutrophic coastal marine sediments using polyphasic molecular approaches and immunofluorescence staining. *Environmental Microbiology* (2006) 8 (5), 787–803.
- Zgajnar A. and J. Zagorc-Koncan. 2009. Identification of inhibitory effects of industrial effluents on nitrification. *Water Science & Technology*.
- Zhang Y., J. Zhou, J. Guo, X. Zhang, L. Zhao and Sh. Yuan. 2008. Study on Nitrite Accumulation Characteristics and Nitrifying Population Dynamics at Different Growth Environments. *Proceedings of World Academy of Science, Engineering and Technology*.

APENDICE

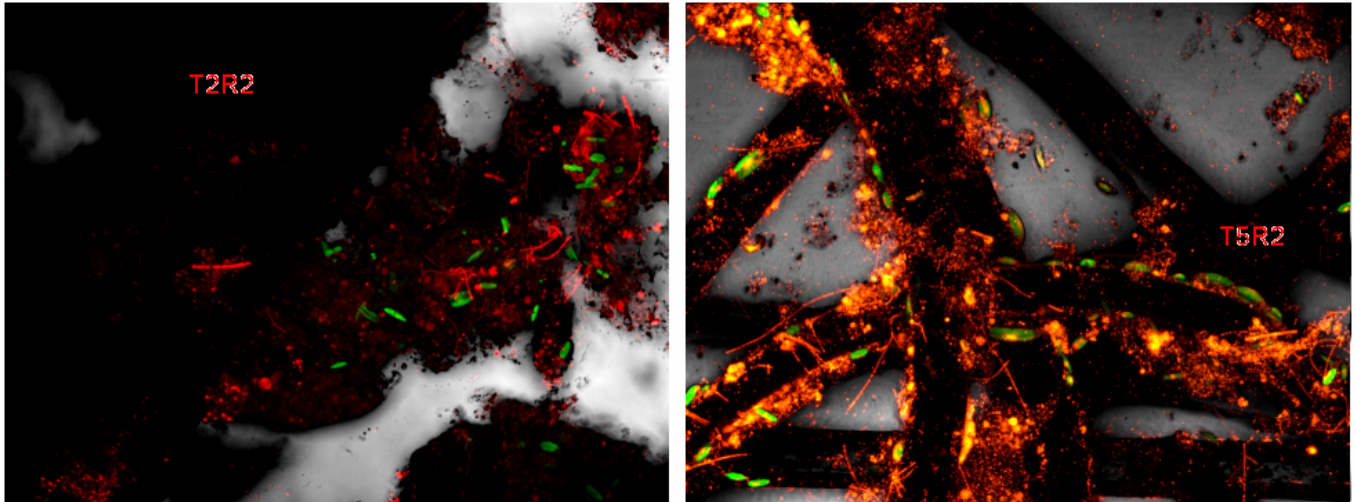


Fig. 16. Fotografías del geotextil en microscopio confocal 40x, en rojo las bacterias presentes y en verde las microalgas (presencia de clorofila) se nota las diatomeas presentes

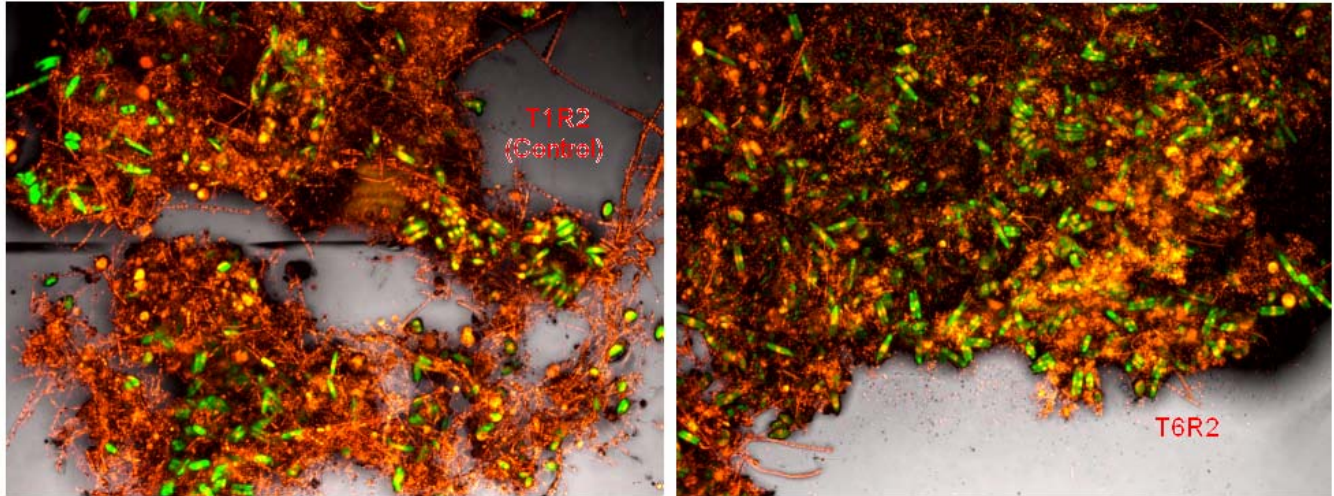


Fig. 17. Fotografías de los microorganismos presentes en el agua mediante microscopio confocal 40x, en rojo las bacterias, en verde la presencia de clorofila de las diatomeas



Fig. 18. Fotografías de algunos instrumentos usados en el laboratorio de Acuicultura



Fig. 19. Fotografías de algunos instrumentos usados en el laboratorio de Biología molecular



Fig. 20. Camarones de mar *Litopenaeus vannamei* cosechados al termino de la experiencia