

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA  
MOLECULAR**



**Aplicación de biotecnologías “ómicas” para la caracterización y evaluación de bacterias y microalgas domesticadas de biofloc en cultivo super-intensivo a baja salinidad de *Litopenaeus vannamei* y con recirculación de agua**

**TESIS**

**para optar por el grado académico de Maestro en Ciencias con  
mención en Biotecnología Molecular**

**Autor: Gorky Vladimir Lajones Ruano**

**Tumbes, 2023**

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

## ESCUELA DE POSGRADO

### MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR



**Aplicación de biotecnologías “ómicas” para la caracterización y evaluación de bacterias y microalgas domesticadas de biofloc en cultivo super-intensivo a baja salinidad de *Litopenaeus vannamei* y con recirculación de agua**

**Tesis aprobada en forma y estilo por:**

**Dr. Saldarriaga Yacila David Edilberto (presidente) .....**

**Dr. Ordinola Zapata Alberto (secretario) .....**

**Dr. Motte Emmerik (vocal) .....**

**TUMBES, 2023**

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

## ESCUELA DE POSGRADO

### MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR



**Aplicación de biotecnologías “ómicas” para la caracterización y evaluación de bacterias y microalgas domesticadas de biofloc en cultivo super-intensivo a baja salinidad de *Litopenaeus vannamei* y con recirculación de agua**

**Los suscritos declaramos que la tesis es original en su contenido y forma:**

**Br. Lajones Ruano Gorky Vladimir (autor)**

**Dra. Solís Castro Rosa Liliana (asesora)**

**Mg. Saavedra Olivos Katherine Yuliana (co-asesora)**

**Tumbes, 2023**

# ACTA DE SUSTENTACIÓN



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES  
Licenciada  
Resolución del Consejo Directivo N° 155-2019-SUNEDU/CD  
**ESCUELA DE POSGRADO**  
Tumbes - Perú

"Año de la unidad, la paz y el desarrollo"

## **ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS**

En Tumbes, a los ocho días del mes de noviembre del dos mil veintitrés, siendo las dieciséis horas y cero minutos, en **modalidad virtual** (link: <https://meet.google.com/aqf-nrox-uos?hs=224>), se reunieron el jurado calificador de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes designado con resolución N° 150-2019/UNTUMBES-EPG-D, del 9 de agosto de 2019, Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila (presidente) y Dr. Alberto Ordinoia Zapata (secretario) (el Dr. Emmerick Motte Darricau, vocal, no asistió). Se contó con la presencia de la asesora de la tesis: Dra. Rosa Liliana Solís Castro, teniendo como co-asesora a la Mg. Katherine Yuliana Saavedra Olivos. El Jurado procedió a evaluar, calificar y deliberar la sustentación de tesis titulada: **"Aplicación de biotecnologías "ómicas" para la caracterización y evaluación de bacterias y microalgas domesticadas de biofloc en cultivo super-intensivo a baja salinidad de *Litopenaeus vannamei* y con recirculación de agua"** para optar el grado académico de **MAESTRO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**, presentado por el:


**Maestrando: Gorky Vladimir Lajones Ruano**


Concluida la sustentación y absueltas las preguntas, por parte del sustentante y después de la deliberación el jurado según el artículo N° 65 del Reglamento de Tesis para Pregrado y Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes, declara al: Maestrando Gorky Vladimir Lajones Ruano, aprobado con calificativo de **MUY BUENA**

En consecuencia, queda apto, para continuar con los trámites correspondientes a la obtención del grado académico de Maestro en Ciencias con mención en Biotecnología Molecular, de conformidad con lo estipulado en la ley universitaria N° 30220, el estatuto, Reglamento General, Reglamento general de grados títulos y reglamento de tesis de la Universidad Nacional de Tumbes

Siendo las diecisiete horas y quince minutos, del mismo día, se dio por concluido la ceremonia académica, procediendo a firmar el acta en presencia de Público asistente.

Tumbes, 08 de noviembre de 2023.

  
Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila  
DNI N°: 00320699  
ORCID N° 0000-0002-4919-6607  
Presidente

  
Dr. Alberto Ordinoia Zapata  
DNI N° 00326333  
ORCID N° 0000-0002-9644-0531  
Secretario

C.c.  
Jurado de Tesis (03)  
Asesora: Dra. Rosa Liliana Solís Castro  
Interesado  
Coasesora: Mg. Katherine Yuliana Saavedra Olivos  
Archivo (Director EPG)

## INFORME TURNITIN

# Aplicación de biotecnologías “ómicas” para la caracterización y evaluación de bacterias y microalgas domesticadas de biofloc en cultivo super- intensivo a baja salinidad de *Litopenaeus vannamei* y con r

por Gorky Vladimir Lajones Ruano

---

Fecha de entrega: 23-nov-2023 10:36p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2237216064

Nombre del archivo: s\_final\_Gorky\_Vladimir\_Lajones\_Ruano\_16-11-2023\_Repositorio.docx (10.37M)

Total de palabras: 15095

Total de caracteres: 84947

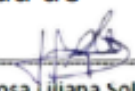


Dra. Rosa Liliana Solis Castro  
Asesora del Proyecto de Tesis  
Orcid 0000-0002-1813-8644

# INFORME TURNITIN

Aplicación de biotecnologías “ómicas” para la caracterización y evaluación de bacterias y microalgas domesticadas de biofloc en cultivo super-intensivo a baja salinidad de *Litopenaeus vannamei* y con r

## INFORME DE ORIGINALIDAD

  
Dra. Rosa Liliana Solis Castro

Asesora del Proyecto de Tesis

Orcid 0000-0002-1813-8644

6%

INDICE DE SIMILITUD

6%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

|   |  |      |
|---|--|------|
| 1 | <a href="http://www.woah.org">www.woah.org</a><br>Fuente de Internet                               | <1 % |
| 2 | <a href="http://repositorio.xoc.uam.mx">repositorio.xoc.uam.mx</a><br>Fuente de Internet           | <1 % |
| 3 | <a href="http://es.scribd.com">es.scribd.com</a><br>Fuente de Internet                             | <1 % |
| 4 | <a href="http://repositorio.lamolina.edu.pe">repositorio.lamolina.edu.pe</a><br>Fuente de Internet | <1 % |
| 5 | <a href="http://www.investigarmqr.com">www.investigarmqr.com</a><br>Fuente de Internet             | <1 % |
| 6 | <a href="http://repositorio.unprg.edu.pe">repositorio.unprg.edu.pe</a><br>Fuente de Internet       | <1 % |
| 7 | <a href="http://repositorio.untumbes.edu.pe">repositorio.untumbes.edu.pe</a><br>Fuente de Internet | <1 % |
| 8 | <a href="http://ksuaquaculture.org">ksuaquaculture.org</a><br>Fuente de Internet                   | <1 % |

|    |  |  |      |
|----|--|--|------|
| 9  | <a href="http://core.ac.uk">core.ac.uk</a><br>Fuente de Internet                               |            | <1 % |
| 10 | <a href="http://assets.researchsquare.com">assets.researchsquare.com</a><br>Fuente de Internet | Dra. Rosa Liliana Solis Castro<br>Asesora del Proyecto de Tesis<br>Orcid 0000-0002-1813-8644 | <1 % |
| 11 | <a href="http://semaqui.paginas.ufsc.br">semaqui.paginas.ufsc.br</a><br>Fuente de Internet     |  | <1 % |
| 12 | <a href="http://dspace.espol.edu.ec">dspace.espol.edu.ec</a><br>Fuente de Internet             |  | <1 % |
| 13 | <a href="http://www.umft.ro">www.umft.ro</a><br>Fuente de Internet                             |  | <1 % |
| 14 | <a href="http://psasir.upm.edu.my">psasir.upm.edu.my</a><br>Fuente de Internet                 |  | <1 % |
| 15 | <a href="http://repositorio.esпам.edu.ec">repositorio.esпам.edu.ec</a><br>Fuente de Internet   |  | <1 % |
| 16 | <a href="http://www.vliz.be">www.vliz.be</a><br>Fuente de Internet                             |  | <1 % |
| 17 | <a href="http://ir.lib.uwo.ca">ir.lib.uwo.ca</a><br>Fuente de Internet                         |  | <1 % |
| 18 | <a href="http://idus.us.es">idus.us.es</a><br>Fuente de Internet                               |  | <1 % |
| 19 | <a href="http://sedici.unlp.edu.ar">sedici.unlp.edu.ar</a><br>Fuente de Internet               |  | <1 % |
| 20 | <a href="http://www.fcb.uanl.mx">www.fcb.uanl.mx</a><br>Fuente de Internet                     |  | <1 % |

|    |   |  |
|----|---|--|
| 21 | Chutchai Piewbang, Sabrina Wahyu Wardhani, Kannika Phongroop, Pattiya Lohavicharn et al. "Naturally acquired feline bocavirus type 1 and 3 infections in cats with neurologic deficits", <i>Transboundary and Emerging Diseases</i> , 2022<br>Publicación | <1 %   |
| 22 | bioline.org.br<br>Fuente de Internet  | Dra. Rosa Liliana Solís Castro<br>Asesora del Proyecto de Tesis<br>Orcid 0000-0002-1813-8644<br><1 % |
| 23 | revistabiociencias.uan.mx<br>Fuente de Internet   | <1 %   |
| 24 | scielo.sld.cu<br>Fuente de Internet   | <1 %   |
| 25 | www.researchgate.net<br>Fuente de Internet  | <1 %   |
| 26 | www.trjfas.org<br>Fuente de Internet  | <1 %   |
| 27 | cibnor.repositorioinstitucional.mx<br>Fuente de Internet  | <1 %   |
| 28 | eelalnx01.epn.edu.ec<br>Fuente de Internet  | <1 %   |
| 29 | posgrado.bdelrio.tecnm.mx<br>Fuente de Internet   | <1 %   |
| 30 | www.dspace.espol.edu.ec<br>Fuente de Internet   | <1 %   |



31

Adam N. Bell, Lior Guttman, Kevan L. Main, Michael Nystrom, Nathan P. Brennan, Sarina J. Ergas. "Hydrodynamics of an integrated fish and periphyton recirculating aquaculture system", Algal Research, 2023

Publicación

<1%

32

journal.trunojoyo.ac.id

Fuente de Internet

<1%



Dra. Rosa Liliana Solis Castro

Asesora del Proyecto de Tesis

Orcid:0000-0002-1813-8644

Excluir coincidencias: < 15 words

Excluir citas

Activo

Excluir bibliografía

Activo

## DEDICATORIA

A Dios por permitirme llegar hasta esta etapa de mi vida, y haberme dado fortaleza y voluntad para cumplir mis objetivos.

A mis padres; Digmar Alfredo Lajones Bone y Dalia Lilian Ruano Torres, que siempre estuvieron ahí guiándome, brindándome su apoyo y confianza total.

A mis hermanos; los cuales siempre me brinda su entera confianza, apoyo y fortaleza para lograr esta meta.

A mi esposa y mis hijos que siempre me apoyan y son la inspiración para seguir adelante a pesar de cualquier cosa.

## AGRADECIMIENTO

Agradezco en primer lugar a Dios, el cual siempre me da la fortaleza para seguir adelante.

A mis padres y hermanos los cuales siempre me apoyaron a seguir adelante

A mi esposa Marilyn Zavala Arellano, porque gracias al equipo que formamos se puede tener este logro familiar.

A mi Asesora Dra. Rosa Liliana Solís Castro, por el apoyo, tiempo dedicado y conocimientos, para lograr esta meta más en la vida.

A mi co-asesora Mg. Katherine Yuliana Saavedra Olivos por todo el conocimiento y apoyo brindado.

Agradezco sinceramente al Dr. Saldarriaga Yacila, David Edilberto, y al Dr. Ordinola Zapata, Alberto, por su valioso tiempo dedicado y su orientación constante en cada fase de esta investigación.

A mi amigo Luis Llacsá el cual siempre tuvo un consejo para que no me rindiera y siguiera adelante.

A la Universidad Nacional de Tumbes y su convenio con INCA Biotec S.A.C , que me permitió concursar y obtener la beca para el programa de la maestría en Biotecnología Molecular .

Asimismo, agradezco al equipo científico de Visión Biotech por su asesoría científica.

Agradezco de manera especial a Bilbo S.A por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y permitirme el uso de sus laboratorios para realizar esta investigación.

Agradezco a mis mentores de esta maestría: Eric Mialhe Ph.D, Virna Cedeño Ph.D, Benoit Diringer Ph.D y Emmerik Mote, por todos sus conocimientos impartidos.

## ÍNDICE GENERAL

|   |       |
|---|-------|
| RESUMEN .....   | xviii |
| ABSTRACT .....  | xix   |
| I. INTRODUCCIÓN.....  | 20    |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA .....  | 25    |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS .....   | 29    |
| 3.1. Obtención de microorganismos de alta salinidad .....                                     | 29    |
| 3.2. Aclimatación de microalgas a baja salinidad .....  | 29    |
| 3.3. Aclimatación de bacterias a baja salinidad .....   | 30    |
| 3.4. Evaluación del crecimiento y supervivencia de bacterias adaptadas a baja salinidad. .... | 31    |
| 3.5. Procedimiento de elaboración y enriquecimiento del biofloc .....                         | 32    |
| 3.6. Evaluación del biofloc. ....   | 33    |
| 3.7. Determinación de parámetros físicos – químicos en los tanques de cultivo. ....           | 34    |
| 3.8. Sobrevivencia .....  | 36    |
| 3.9. Análisis metagenómico .....  | 36    |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....  | 39    |
| 4.1. Aclimatación de microalgas a baja salinidad .....  | 39    |
| 4.2. Adaptación de bacterias a baja salinidad .....   | 40    |
| 4.3. Evaluación de parámetros fisicoquímicos.....   | 42    |
| 4.4. Medición de iones en las unidades de prueba.....   | 48    |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 4.5.  | Sobrevivencia y peso promedio.....   | 49 |
| 4.6.  | Análisis metagenómicos de bacterias de los tanques de cultivo del módulo productivo Cebiomic´s. .... | 52 |
| 4.7.  | Análisis metagenómicos de microalgas en el cultivo experimental .....                                | 58 |
| V.    | CONCLUSIONES .....   | 62 |
| VI.   | RECOMENDACIONES.....   | 63 |
| VII.  | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 64 |
| VIII. | ANEXOS.....  | 79 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Lista de nutrientes para el desarrollo del biofloc. ....          | 32 |
| Tabla 2. Tratamientos empleados en el ensayo para evaluar el biofloc. .... | 33 |
| Tabla 3. Medición de iones e ionización. ....                              | 49 |
| Tabla 4. Supervivencia y peso promedio por tratamiento. ....               | 50 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Crecimiento de microalgas por fase de cultivo .....   | 39 |
| Figura 2. Curva de crecimiento de la bacteria <i>Bacillus cereus</i> en medio líquido TSB .....           | 40 |
| Figura 3. Valores de Nitrógeno Total Amoniacal (TAN) en los tratamientos a baja salinidad .....           | 42 |
| Figura 4. Análisis de varianza TAN .....  | 43 |
| Figura 5. Nivel de nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) en los tratamientos a baja salinidad.....      | 44 |
| Figura 6. Análisis de varianza Nitrito NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....                                 | 44 |
| Figura 7. Concentración de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> en los tratamientos a baja salinidad .....        | 45 |
| Figura 8. Análisis de varianza de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....                                      | 45 |
| Figura 9. Temperatura en los tratamientos a baja salinidad.....   | 46 |
| Figura 10. Oxígeno disuelto en los diferentes tratamientos a baja salinidad.....                          | 47 |
| Figura 11. pH en los tratamientos del experimento a baja salinidad .....                                  | 48 |
| Figura 12. Desviación estándar de los pesos promedio .....  | 51 |
| Figura 13. Curva de rarefacción de bacterias a baja salinidad.....  | 53 |
| Figura 14. Abundancia de filamentos bacterianos en el biofloc de los tanques de cultivo .....             | 54 |
| Figura 15. Filamentos bacterianos exclusivos y compartidos por las muestras Módulo y Prueba.....          | 56 |
| Figura 16. Géneros bacterianos en la muestra Módulo y Prueba del cultivo de <i>L. vannamei</i> .....      | 57 |
| Figura 17. Diagrama de Venn de los géneros exclusivos y compartidos por las muestras Módulo y Prueba..... | 58 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 18. Curva de rarefacción muestra que no hay diferencias entre las muestras a nivel de riqueza y población. .... | 59 |
| Figura 19. Abundancia de filos de microalgas del biofloc en los tanques de cultivo Módulo y Prueba .....               | 60 |
| Figura 20. Géneros de microorganismos (microalgas y protozoos) en las muestras Módulo y Prueba.....                    | 61 |



## ÍNDICE DE ANEXOS

|   |    |
|---|----|
| Anexo 1. Siembra de bacteria .....  | 79 |
| Anexo 2. Aclimatación de microalgas en Laboratorio.....   | 80 |
| Anexo 3. Placas de Bacillus cereus con crecimiento a las 8 horas y a las 100 horas. ....  | 81 |
| Anexo 4. A) Biofloc recién sembrado B) Biofloc madurado por 6 días. ....  | 81 |
| Anexo 5. A ) Langostinos antes de la siembra, B) Langostinos a los 8 días de sembrados, C) Langostinos de 15 días de sembrado. .... | 82 |
| Anexo 6. Medición de nitrógenos en el fotómetro YSI 9300.....   | 82 |
| Anexo 7. Procesamiento de muestras para metagenómica .....  | 83 |
| Anexo 8. Flóculo en conos de Inhoff .....   | 83 |
| Anexo 9. Campos del microscopio observando flóculos a los 10 X de aumento..   | 84 |

## RESUMEN

El biofloc es un suplemento conformado por microalgas, bacterias y otros agregados como restos de alimento y heces, los cuales sirven como alimento y ayudan a mejorar la calidad del agua en el cultivo evitando que compuestos nitrogenados como Nitrógeno total amoniacal (TAN), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) causen toxicidad a los langostinos. En esta investigación se realizó la adaptación de bacterias y microalgas obtenidas de cultivo de alta salinidad (33 ‰) para evaluar su crecimiento en el cultivo super intensivo de baja salinidad (0-5 ‰). Se utilizó la metagenómica para la caracterización y evaluación de microalgas y bacterias presentes en el cultivo a baja salinidad de *L. vannamei*. La evaluación de los microorganismos se realizó en baldes (P) y en tanques (M) del módulo de cultivo de langostinos en fase de precría, estadio pl15 con un peso aproximado de 0,0012 g. El análisis metagenómico demostró la presencia de los siguientes géneros bacterianos en "P": *Cetobacterium* 44%, *Mycobacterium* 12%, *Bacillus* 12%, *Clostridium* 12%, *Peptostreptococcus* 9%, *Methylosinus* 6%, *Caldilinea* 2%, *Rhizobium* 2%; y en M estuvieron presentes los géneros *Lawsonia* 25%, *Oscillatoria* 22%, *Pseudomonas* 19 %, *Bacillus* 14%, *Planctomycetes* 5%, *Rhodobacter* 10%, *Brevinema* 2%, *Hymenobacter* 2%, *Luteolibacter* 1%. A nivel de microalgas se observó en P: *Fottea* 24%, *Spumella* 5%, *Rhodomonas* 4%, *Amphora* 2%, entre otros en menor porcentaje (<1 %); mientras que en M: *Cyclotella* 20%, *Synedra* 16%, *Desmodesmus* 10%, *Nitzschia* 5%, *Scenedesmus* 4%, *Amphora* 3%. Esta investigación permitió determinar la abundancia de los microorganismos presentes en el cultivo *L. vannamei* a baja salinidad. Los resultados obtenidos demuestran que gracias a los análisis metagenómicos se ha logrado determinar la abundancia de microorganismos presentes en el agua de cultivo de langostino a baja salinidad.

**Palabras clave:** biofloc, cultivo de langostino, *Litopenaeus vannamei*, metagenómica, microorganismos,

## ABSTRACT

Biofloc is a supplement made up of microalgae, bacteria and other aggregates such as food remains and feces, which serve as food and help improve the quality of water in the crop by preventing nitrogenous compounds such as: Total ammoniacal nitrogen (TAN), nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) cause toxicity to shrimp. In this research, the adaptation of bacteria and microalgae obtained from high salinity culture (33 ‰) was carried out to evaluate their growth in the super intensive culture of low salinity (0-5 ‰). Metagenomics was used for the characterization and evaluation of microalgae and bacteria present in the low salinity culture of *L. vannamei*. The evaluation of the microorganisms was carried out in buckets (P) and in tanks (M) of the shrimp culture module in the pre-breeding phase, stage pl15 with an approximate weight of 0.0012 g. The metagenomic analysis demonstrated the presence of the following bacterial genera in "P": *Cetobacterium* 44%, *Mycobacterium* 12%, *Bacillus* 12%, *Clostridium* 12%, *Peptostreptococcus* 9%, *Methylosinus* 6%, *Caldilinea* 2%, *Rhizobium* 2%; while in M; *Lawsonia* 25%, *Oscillatoria* 22%, *Pseudomonas* 19%, *Bacillus* 14%, *Planctomycetes* 5%, *Rhodobacter* 10%, *Brevinema* 2%, *Hymenobacter* 2%, *Luteolibacter* 1%. At the microalgae level, it was observed in P: *Fottea* 24%, *Spumella* 5%, *Rhodomonas* 4%, *Amphora* 2%, among others in a lower percentage (<1%); while in M: *Cyclotella* 20%, *Synedra* 16%, *Desmodesmus* 10%, *Nitzschia* 5%, *Scenedesmus* 4%, *Amphora* 3%. This research allowed us to determine the abundance of microorganisms present in the *L. vannamei* culture at low salinity. The results obtained demonstrate that thanks to metagenomic analyzes it has been possible to determine the abundance of microorganisms present in shrimp culture water at low salinity.

**Keywords:** biofloc, shrimp culture, *Litopenaeus vannamei*, metagenomics, microorganisms

## I. INTRODUCCIÓN

La creciente demanda para cubrir las necesidades de alimento a la población humana, que se prevé para el año 2050 superará los 9 mil millones de habitantes, ha provocado un aumento vertiginoso de la actividad acuícola (FAO, 2018). Actualmente, la acuicultura es considerada como una de las actividades alimentarias más importantes y rentables a nivel mundial, que genera grandes ganancias anuales de alrededor de 232 000 millones de USD según reporte de la FAO; siendo el langostino blanco *Litopenaeus vannamei*, uno de los productos acuícolas más comercializados, cuya producción se ha visto en necesidad de expansión para tratar de satisfacer la gran demanda del mercado.

El Ecuador es el segundo productor de langostino a nivel mundial, siendo solo superado por Indonesia (Mincomercioexterior, 2019), por lo que constituye uno de los rubros principales en la economía del país, representando el 25 % de las exportaciones no petroleras con ingresos de más de 3000 millones de dólares al año (Mincomercioexterior, 2019).

La especie *L. vannamei* es utilizada por su versatilidad y su resistencia al cultivo en cautiverio. Sin embargo, el cultivo de langostino enfrenta grandes retos para su expansión, pues al igual que la mayoría de las actividades acuícolas requiere gran cantidad de agua. Por otra parte, sus efluentes constituyen una amenaza al ambiente por sus alto contenido de nitrógeno inorgánico, siendo tóxico para los organismos acuáticos (TAN,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ ) (Avnimelech, 1990) que son responsables de la eutroficación del agua (Suantika et al., 2018).

Además, los cultivos extensivos y semi intensivos, que son los principales sistemas de cultivo en Ecuador, en provincias como Guayas, El Oro, Esmeraldas, Manabí y Santa Elena demandan grandes superficies de terreno cada vez más escasos por las regulaciones ambientales obligatorias, debido al latente peligro de contaminación por salinización de suelos, acuíferos de agua dulce, exceso de compuestos químicos (como silicatos, carbonatos, sulfatos entre otros) así también como la pérdida de hábitat naturales de algunas especies sensibles que se alimentan de la fauna de estos acuíferos y la pérdida de tierras agrícolas (Boyd et al., 2021; Collins et al., 2005).

Cabe mencionar, que los cultivos de langostinos están generalmente en zonas de manglar y consisten en piscinas cavadas en tierra que poseen compuertas para la evacuación del agua, de esta manera se les realiza un recambio total o parcial de agua cuando es requerido. Asimismo, existe otro tipo de cultivo el cual está siendo utilizado para la acuicultura sostenible, y consiste en revestir con geomembrana las piscinas construidas sobre tierra y además, trata de disminuir las descargas directas a los efluentes de agua (FAO, 2018).

También, se viene desarrollando la acuicultura social sostenible, mediante el cultivo tierra adentro, el cual no se limita a zonas costeras, más bien se expande tierra adentro y ayuda al desarrollo de comunidades rurales (FAO, 2018). Los países de Tailandia y Vietnam ya aplican este modelo en cultivos de *L. vannamei*, combinándolo con la tecnología de biofloc y los sistemas de acuicultura con recirculación (RAS), logrando producir más de 10 t al año (Flaherty & Vandergeest, 1998; Suantika, et al., 2018). Confirmando así que los cultivos con RAS y tecnología biofloc, mejoran la calidad del agua, propiciando un medio ideal para el desarrollo del langostino y brindan una producción menos propensa al ataque de patógenos (Effendy et al., 2016; Hernández & Pérez, 2014).

El desarrollo de la acuicultura con RAS representa una buena alternativa para el óptimo desarrollo del cultivo de langostino, reduciendo los efluentes que afectan al ambiente. En este sistema, el recambio de agua es limitado y se requiere de biofiltración para reducir la toxicidad de los compuestos nitrogenados (Prehn et al.,

2012). Sin embargo, las desventajas de estos sistemas son los altos costos, pero son compensados por la alta productividad en sistema de cultivo super-intensivo.

El sistema RAS se aplica alrededor del mundo en diversos cultivos acuícolas teniendo resultados muy favorables como el de Beardsley et al. (2011). Este sistema puede ser fusionado con un componente muy importante que es la tecnología de Biofloc (BT), utilizado para mejorar y maximizar su efectividad (Brown et al., 2013). El biofloc es el conjunto de agregados microbianos como, las microalgas, bacterias, protozoarios y otros tipos de partículas como heces y restos de alimento formando los así denominados flóculos (Hargreaves, 2013). El término biofloc fue introducido en 1983, e implica aprovechar los nutrientes generados como excedentes de los cultivos acuícolas, además de aprovechar los microorganismos que utilizan el carbono orgánico (Chim et al., 2014; Collazos & Arias., 2015).

Este sistema BT en principio intenta emular el medio natural en un cultivo acuícola, y mediante el uso de microorganismos se pretende contrarrestar la acumulación de nitrógenos tóxicos (TAN,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ ), contribuyendo a mantener una mejor calidad del agua. Además, provee alimento a los animales en cultivo por ser rico en proteínas de origen microbiano. Estas proteínas están presentes en los flóculos, formados por colonias de microalgas que poseen una densidad de 10-1000 millones de cél/ml (Avnimelech, 1990; Collazos & Arias, 2015).

En diferentes países como, Indonesia y Vietnam, se ha aplicado la tecnología biofloc como un recurso para mejorar las condiciones de cultivo de especies acuáticas debido a su riqueza de microorganismos (microalgas, protozoarios, nemátodos y bacterias), siendo considerado como un sistema multitrófico simple (Bossier & Ekasari, 2017; Poli et al., 2019). El biofloc es también considerado un agente prebiótico el cual ayuda en los cultivos de langostino a desarrollar probióticos, que a su vez mejoran el estado inmune de los langostinos (Aalimahmoudi et al., 2017; Khatoon et al., 2016; Megahed & Mohamed, 2014b; Panigrahi et al., 2018).

Por otra parte, el biofloc ayuda a mantener la calidad del agua del cultivo, a través del proceso de nitrificación; el cual es realizado por bacterias heterotróficas con

actividad nitrificante y microalgas encargadas de consumir los nitratos, transformando los desechos tóxicos como los nitrogenados, en proteína comestible; manteniendo así estables los niveles de TAN,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  (Hargreaves, 2013; Otsoshi et al., 2011). Un punto importante para mantener una buena calidad de agua para el biofloc, es el control de los sólidos suspendidos, pues estos son causantes de la oclusión de branquias en los cultivos peces, langostinos, y otros, además de disminuir el nivel de oxígeno en el agua en horas de la noche. (Ho, 2011; Nunes & Fonseca, 2012; Ray et al., 2010; Schweitzer et al., 2013; Tierney & Ray, 2018).

De acuerdo a su elaboración, existen dos tipos de biofloc que pueden ser aplicados al cultivo: 1) biofloc *in situ*; que se elabora y se deja madurar dentro del tanque de cultivo aprovechando así los nutrientes dados por el mismo y es suplementado diariamente con una fuente de carbono para controlar los nitrógenos que este produce (Monroy et al., 2013; Sarker et al., 2019); 2), biofloc *ex situ* el cual se establece al exterior del tanque de cultivo, pudiendo emplearse un biorreactor o en un tanque, aunque esto último es más lento; el cultivo debe ser nutrido cada día con la adición de una fuente de nitrógeno constante a fin de mantener vivos los microorganismos, y ser replicado permanentemente para mantener su viabilidad (Monroy et al., 2013; Sarker et al., 2019).

De acuerdo con su origen o formación, también se consideran dos tipos de biofloc: espontáneo y domesticado. El biofloc espontáneo, es el que se forma de manera natural en los sistemas de cultivo requiriendo la adición de nutrientes que favorecen el desarrollo sucesivo de microorganismos como microalgas, protozoarios, bacterias (Hargreaves, 2013; Martínez & Vargas, 2017; Sakkaravarthi, 2015). La desventaja de este tipo de biofloc es que su eficiencia es aleatoria dependiente de los microorganismos que proliferen en cada ocasión con el riesgo de que algunos sean patógenos, lo que junto con limitaciones técnicas para el monitoreo de microorganismos como: la microbiología clásica y morfológica puedan conducir a mortalidades en los cultivos; mientras que, el biofloc domesticado está integrado por consorcios de microorganismos previamente aislados, identificados y cultivados los cuales ayudan a potenciar el crecimiento y mejorar la calidad del agua de cultivo (Hernandez et al., 2009; Luna et al., 2017; G. Luo et al., 2016; L. Luo et al., 2016).

Considerando lo expuesto, la presente investigación tuvo como objetivo aplicar tecnologías ómicas como la metagenómica para la caracterización y monitoreo de bacterias y microalgas domesticadas del biofloc en cultivo super-intensivo a baja salinidad con recirculación de agua de *Litopenaeus vannamei*.



## II. REVISIÓN DE LITERATURA

La tecnología biofloc tiene su fundamento en el trabajo de Avnimelech et al. (1982), quienes describen la co-floculación de microalgas con ayuda de arcillas, para lograr aclarar tanques de agua con niveles altos de nitrógeno y fósforo. Luego, Azam et al. (1983) realizaron estudios para evaluar el rol ecológico de los microorganismos en la columna de agua en el océano, demostrando cómo las bacterias aprovechan el carbono fijado en la fotosíntesis (10-50%) y éstas a su vez se encuentran controladas por el fitoplancton (microplancton), siguiendo la cadena trófica y reutilizando la energía producida. Estos estudios, permitieron conocer el funcionamiento de los sistemas oceánicos y acuáticos controlados, en el cual los microorganismos se encargan de mantener un equilibrio en cuanto a turbidez y calidad de agua, aún en condiciones de alta concentración de nitrógeno y fósforo con la ayuda del carbono fijado como fuente de energía, para realizar la síntesis de proteínas (Roman et al., 2021).

Los microorganismos cumplen un rol relacionado a varias interacciones ecológicas como: comensalismo, depredación, competencia, etc., formando una pequeña red que permite conocer el aprovechamiento de los nutrientes en cada nivel trófico, desde el más pequeño hasta el más grande, siendo así desde bacterias y pico plancton hasta microplancton (diatomeas y flagelados) (Ma et al., 2020; Mavingui et al., 2015; Trombetta et al., 2020).

Al intentar comprender mejor estos procesos o roles ecológicos se empezaron a desencadenar investigaciones para aplicarlos en la acuicultura y de esta manera contrarrestar el exceso de compuestos nitrogenados presentes en los cultivos acuícolas. Así Avnimelech. (1999); Hopkins et al. (1993) y Naylor et al. (1998), realizaron estudios sobre microorganismos bacterianos autotróficos y heterotróficos en sistemas de cultivo de alta densidad, con cero y poco

recambio de agua demostrando que, al mantener una relación carbono: nitrógeno, en los tanques de cultivo de tilapias y de camarones, las bacterias que se alimentaron con los carbohidratos añadidos muestran una mejora en la producción de la proteína microbiana; llevando a asumir que la relación entre la reducción de compuestos nitrogenados tóxicos como el TAN, la aplicación de carbohidratos y la producción de la proteína microbiana va ligada a la relación C:N (20:1). En ese mismo sentido, Shan & Obbard. (2001), también han demostrado el potencial de las bacterias nitrificantes para la remoción del nitrógeno procedente de los cultivos acuícolas.

Así surge el concepto, el concepto biofloc, el cual es definido como el conjunto de microorganismos encargados de mejorar las condiciones de la calidad del agua y brindar alimento mediante una dinámica trófica. Burford et al. (2003) explican, como esta comunidad microbiana (flóculo) puede ser deforme y porosa e ir desde pocas micras hasta varios centímetros de diámetro, otorgándoles así una densidad mayor a la del agua, haciendo que se encuentren flotando en la columna de agua y sean de lento hundimiento tal como menciona Martínez et al. (2010); considerando además que pueden adoptar diferentes comportamientos bioquímicos y fisiológicos según su conformación.

Para la formación de los flóculos, se debe tener en cuenta la relación de C: N, presente en el agua, pudiendo adicionarse diferentes fuentes de carbono, destacando los carbohidratos simples de fácil disolución tales como, melaza, azúcar, glicerina, panela, entre otras, que son usados por los microorganismos para ayudar a mantener la calidad del agua.

También pueden ser utilizados los azúcares complejos, como Salvado de arroz, bagazo de caña, tapioca, salvado de trigo entre otras (Dauda et al., 2017; El-Husseiny et al., 2018; Panigrahi et al., 2018; Sakkaravarthi & Sankar, 2015), Ekasari et al., 2014; Megahed & Mohamed, 2014).

Existen cultivo súper-intensivos, en los que la tasa de recambio es cero o baja, y utilizan fuentes de carbono simples, compuestas e inorgánicas como: carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos; y son llamados sistemas mixotróficos ya que favorecen al crecimiento de microorganismos autotróficos y heterotróficos; y además mejoran

la calidad del agua y del biofloc (Chung et al., 2008; Ray & Lotz, 2016; Salama et al., 2017). Así mismo se ha demostrado que, buena oxigenación y relación C:N del biofloc, mejoran la producción de los cultivos acuícola (Bossier & Ekasari, 2017; Dauda et al., 2017; Ekasari et al., 2014; M. Emerenciano et al., 2013; M. G. C. Emerenciano et al., 2017; Monroy-Dosta et al., 2013 ).

Por lo tanto, ha surgido el interés de aislar y caracterizar microorganismos con potencial para formar biofloc, utilizando técnicas de aislamiento tradicional, además se ha evaluado su potencial para formar flóculos y se ha realizado la caracterización de microalgas con alto potencial proteico, bacterias prebióticas, prebióticos, nitrificantes y floculantes mediante PCR y SDS-PAGE (Che Hashim et al. 2019; Kasan et al. 2017; L. Luo et al. 2016; Mohd Yunos et al. 2017; Trung et al. 2016; Vásquez N. 2019).

Otra de las tecnologías que están teniendo gran auge en los sistemas acuícola, son las denominadas “ómicas”, que son herramientas moleculares de alto rendimiento, que permiten realizar estudios genómicos, transcriptómico, proteómico y metabolómico (Debnath et al. 2005). De ellos, la metagenómica se encarga del estudio de todos los genes de los microorganismos en un ambiente determinado (Martínez-Porchas & Vargas-Albores, 2017), y utiliza la secuenciación de alto rendimiento HTS (por sus siglas en inglés) independientes del cultivo, para investigar la composición genética vírica y microbiana completa de las muestras (Bexfield & Kellam, 2011).

La metagenómica es un método considerablemente imparcial, ya que los microorganismos no se seleccionan mediante métodos de cultivo favorables (o se deseleccionan por condiciones desfavorables) y no requieren conocimientos previos, además permite detectar una amplia gama de agentes infecciosos simultáneamente. Esta tecnología también ha hecho posible identificar agentes patógenos más rápidamente, incluidos aquellos difíciles de identificar mediante cultivo *in vitro*; además complementado con la bioinformática, han permitido el descubrimiento de un gran número de agentes infecciosos (OIE, 2021).

Tal es el caso, que Tapaamorndech et al. (2020) mediante análisis metagenómico, identificaron en sistemas de biofloc, a especies del género *Vibrio* (90%), además de *Pseudoalteromonas*, *Photobacterium*, *Shewanella*, *Alteromonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Marinifilum*, y *Pseudomonas*; coincidiendo con Panigrahi et al. (2021), quienes también reportaron a especies del género *Vibrio*; y a nivel de familias a *Proteobacteria* y *Firmicutes*, en agua de cultivo e intestinos del langostinos.

Por otro lado, Guo et al. (2020) estudiaron la importancia de la relación C:N y su influencia sobre la abundancia de ciertos tipos de bacterias, las cuales a su vez aportan con metabolitos importantes para el desarrollo del langostino tales como, flavonoides, benzenoides, lípidos prenol, y derivados del indol.

Todos estos aportes científicos enriquecen y promueven el estudio de la biotecnología dirigida al biofloc y los sistemas acuícolas para mejorar la productividad y disminuir el daño al ambiente.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Obtención de microorganismos de alta salinidad

Se utilizaron cepas pre aisladas en el laboratorio de biotecnología de la empresa Inca Biotec S.A.C y se estableció un biofloc domesticado compuesto por microalgas y bacterias, aisladas de cultivos de *L. vannamei* a alta salinidad (Risco Com. pers., 2019).

Las microalgas fueron proporcionadas en medio líquido, f/2 medio (Anexo 1) y las bacterias TSB (Caldo Tripticasa Soya), respectivamente.

#### 3.2. Aclimatación de microalgas a baja salinidad

Las microalgas *Thalassiosira pseudonana*, *Tetraselmis* sp, *Chaetoceros gracilis* (Gra), *Navicula cryptocephala*, *Navicula* sp, *Navicula glaciei*, *Navicula cf. perminuta*, *Navicula* sp, *Navicula cryptocephala*, y *Gomphoneis minuta var. cassieae*; aisladas de cultivos de *L. vannamei* a alta salinidad y presentes en el biofloc domesticado, fueron aclimatadas de una salinidad inicial de 33 ‰ a rangos de salinidad de 0,5 y 5 ‰ en los ambientes del laboratorio de microalgas de Cebiomics Manta - Ecuador (Anexo 2).

Para ello, se siguió el procedimiento detallado a continuación:

- a) Se sembraron las microalgas en tubos de 15 ml, considerando 2 ml de cepa y 8 ml de f/2 medio con una salinidad de 30 ‰, manteniendo la temperatura entre 18 a 22°C, durante 72 horas.
- b) Transcurrido el tiempo, se transfirieron los cultivos de microalgas a matraces de 200 ml, para ello se utilizó 10 ml de cepa y 190 ml de f/2 medio con una salinidad al 30 ‰
- c) Luego se volvió a transferir a botellas de 1000 ml, tomando 700 ml de f/2 medio con salinidad de 0 a 5 ‰ y 100 ml de cultivo de microalgas a salinidad

de 30 ‰; reduciéndose la salinidad a 25 ‰ (valor obtenido con el refractómetro digital). Posteriormente, se transfirió a baldes de 10 L, en el que se colocó 1,5 L del cultivo de microalga y 8,5 L de f/2 medio con salinidad de 0 a 5 ‰, obteniendo un rango de salinidad de 8 a 10 ‰.

d) Finalmente, se sembró en tanques de 1 000 L en el que se aplicó las microalgas a una salinidad entre 0-5 ‰, listas para ser aplicadas en los tanques de cultivo

Cada tres días de cultivo de microalgas, se realizó la réplica de las cepas contenidas en los tubos, matraces, botellas y baldes; para ello se extrajo una muestra de 1 ml de cada cepa y se determinó la densidad celular con una cámara de Neubauer, además se midió la salinidad con un refractómetro digital. Los datos obtenidos fueron utilizados para la elaboración de las curvas de crecimiento respectivas, con la finalidad de determinar aquellas cepas con mejor desarrollo y viabilidad en condiciones de baja salinidad

### **3.3. Aclimatación de bacterias a baja salinidad**

Las cepas bacterianas proporcionadas, fueron: *Halomonas* sp, *Halomonas meridiana*, *Halomonas axialensis* y *Bacillus cereus*. Se tomó 100 µl de cada una de las cepas bacterianas aisladas de cultivos de alta salinidad presentes en el biofloc domesticado, y se sembró de manera independiente sobre placas, conteniendo medio tripticasa de soya en agar (TSA), luego se incubaron a una temperatura de 33°C durante 8 horas (Anexo 3). Adicionalmente, se inoculó el mismo volumen de las cepas, sobre 900 µl de tripticasa de soya en caldo (TSB), bajo las mismas condiciones, obteniendo cultivos de salinidad del 5 ‰ ya que ambos medios presentan en su constitución 5 g de cloruro de sodio.

Transcurrido el tiempo, se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) y la medición de la densidad óptica (OD), cada 8 horas manteniendo esto hasta observar crecimiento bacteriano y muerte celular.

### 3.4. Evaluación del crecimiento y supervivencia de bacterias adaptadas a baja salinidad.

Para la evaluación del crecimiento y supervivencia de cada una de las cepas bacterianas, se utilizó el protocolo usado por Maier (2009) que consistió en realizar diluciones seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ . Para tal fin, se utilizaron tubos de 15 ml, conteniendo 9 ml de caldo TSB los cuales fueron debidamente rotulados (operación realizada por duplicado por cada cepa).

Al primer tubo, rotulado con la dilución  $10^{-1}$ , se le adicionó 1 ml del cultivo bacteriano inicial (cultivo madre), luego de éste, se tomó nuevamente 1 ml y se adicionó al tubo siguiente ( $10^{-2}$ ), y así sucesivamente hasta llegar al tubo rotulado con  $10^{-10}$ . Posteriormente, se tomó 10  $\mu$ l de cada dilución y se sembró por barrido, en placas Petri debidamente rotuladas, conteniendo agar TSA (por duplicado). Finalmente, tanto los tubos como las placas fueron incubados a 30 °C, durante 10 días, y cada 8 horas se realizó el conteo de las UFC obtenidas en las placas Petri, y la medición de la absorbancia de los medios líquidos.

Para el conteo de la UFC en medio sólido, se dividió por secciones cada placa y se contabilizó cada sección con un contador manual, luego se aplicó la siguiente fórmula:

$$UFC = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias por placas} \times \text{Factor de dilución}}{\text{ml de la muestra sembrada}}$$

Mientras que la determinación del crecimiento bacteriano en medio líquido se realizó mediante la densidad óptica, utilizando un espectrofotómetro ELISA a una densidad óptica de 620 nm, para ello, se colocó por triplicado la muestra y un control, y el equipo realizó la medición de manera automática. Los datos obtenidos fueron utilizados para la elaboración de curvas de crecimiento bacteriano.

### 3.5. Procedimiento de elaboración y enriquecimiento del biofloc

La preparación de los tanques de biofloc para el cultivo de langostinos, siguió las recomendaciones descritas por Gomes et al. (2016) y Merchan & Monserrate (2014):

- a. En primer lugar, se desinfectaron los tanques de una tonelada con 1000 ml de hipoclorito de calcio al 80 %.
- b. Luego se agregó 900 L agua filtrada con mangas de 1  $\mu\text{m}$ , para reducir la carga microbiana.
- c. El agua se desinfectó con hipoclorito de calcio al 80 %, y se esperó que haga efecto de 3 a 6 horas, cada hora se observó una muestra del agua al microscopio para verificar la eliminación de los microorganismos.
- d. Para eliminar el cloro residual en los tanques se encendió la aireación por 1 hora y se agregó tiosulfato de sodio al 50%.
- e. Luego se aplicó los nutrientes necesarios (Tabla 1), a los tanques para que se desarrolle el biofloc.
- f. Después se inocularon las bacterias a una concentración aproximada de  $3 \times 10^6$  UFC, se dejó desarrollar por 6 horas.
- g. Luego de esto, se inocularon con las microalgas utilizadas a los tanques y se dejaron madurar por un tiempo de 4-6 días (Anexo 4).

**Tabla 1**

*Lista de nutrientes para el desarrollo del biofloc*

| Sustratos y fertilizantes | Cantidad (g/t) |
|---------------------------|----------------|
| Fuente de carbono         | 30             |
| Agente floculante         | 40             |
| Fuente de fosfato         | 10             |
| Fuente de metasilicato    | 30             |
| Fuente de nitrógeno       | 30             |



### 3.6. Evaluación del biofloc.

Para evaluar el efecto del consorcio (microalgas y bacterias) en el cultivo de langostinos, se estableció una prueba constando de 3 tratamientos + 1 control y 3 repeticiones cada uno, esta prueba se realizó en baldes (ver tabla 2).

Los baldes fueron llenados con 18 L de agua y los tanques con 100 000 L. En cada recipiente se colocó 1,5 poslarvas/L (27 poslarvas por cada balde) en estadio PL15 (Anexo 5) y con un peso individual de 0,0012 g, para simular la densidad utilizada en el módulo de cultivo super-intensivo, siendo ésta de 1 500 poslarvas/m<sup>3</sup> en la fase de precría.

**Tabla 2**

*Tratamientos empleados en el ensayo para evaluar el biofloc*

| Tratamiento | Contenido   | Recambio  |
|-------------|---|---|
| C1          | Agua de mar (30 ‰) sin biofloc. En baldes.  | Lo que sea necesario recambiar diariamente sea 30 % o mas |
| T1          | Agua a baja salinidad (0 a 5 ‰) sin biofloc en baldes.  | Lo que sea necesario recambiar diariamente sea 30 % o mas |
| T2          | Agua a baja salinidad (0 a 5 ‰) + Biofloc con el consorcio a baja salinidad. En baldes            | Recambio del 10 %   |
| T3          | Agua a baja salinidad (0 a 5 ‰) + Biofloc con el consorcio a baja salinidad. En tanques de 100 t. | Recambio del 10 %   |

A los tratamientos T2, T3 se adicionó azúcar como fuente de carbono en relación C: N (6:1).

Los experimentos se mantuvieron durante 30 días.

### **3.7. Determinación de parámetros físicos – químicos en los tanques de cultivo.**

#### **3.7.1. Determinación de nitrito, nitrato y nitrógeno amoniacal total, del agua de cultivo**

De cada tanque se tomó una muestra de 50 ml, y se analizó la presencia de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitrógeno amoniacal total (TAN) cada 4 horas, mediante colorimetría con los kits de nitrógeno total amoniacal, nitrito y nitrato de API (Aquarium Pharmaceuticals).

Para cada parámetro se aplicó un diseño completamente aleatorizado. Para el análisis estadístico se realizó la Prueba de ANOVA y fue corroborado diferencias entre los tratamientos mediante la prueba de Bonferroni.

#### **3.7.2. Determinación de temperatura, oxígeno disuelto y pH del agua de cultivo**

Los parámetros de temperatura y pH, fueron registrados diariamente durante intervalos de dos horas, el oxígeno cada seis horas, a lo largo de 1 mes. Los procedimientos empleados se detallan a continuación:

##### **a) Medición de temperatura y oxígeno disuelto (O.D)**

- Se toma el medidor de oxígeno YSI PRO 20.
- En la unidad experimental (tanque o balde de cultivo), se introdujo directamente el electrodo, a cada unidad experimental y se esperó 10 segundos aproximadamente hasta que establezca las medidas.
- Luego se realizaron anotaciones en el sistema de datos.
- Se repite el proceso por cada unidad experimental.

##### **b) Medición de pH**

- Para la medición de pH se preparó el área de toma de muestra.
- Luego se colectó 50 ml de cada unidad experimental.
- Se sumergió el electrodo del equipo pH Orión Thermo Fisher. Se esperó 20 segundos aproximadamente hasta que se estabiliza la medición. Después se registró cada dato en el sistema.

- Se repitió el procedimiento con cada unidad experimental.

Para cada parámetro se aplicó un diseño completamente aleatorizado. Para el análisis estadístico se realizó la Prueba de ANOVA y fue corroborado diferencias entre los tratamientos mediante la prueba de Bonferroni.

### 3.7.3. Determinación de iones del agua de cultivo

La medición de la alcalinidad total ( $Mg^{+2}$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{+2}$ ) se realizó una vez por semana, con el uso de un fotómetro YSI 9300 (Anexo 6), siguiendo el procedimiento detallado a continuación.

- a. Se recolectó 50 ml de agua de cada unidad experimental, cada muestra tomada se llevó al laboratorio.
- b. Luego se colocó 10 ml de esta muestra en los tubos de vidrio del fotómetro con lo cual se hizo un blanco.
- c. Después se tomó 1 ml de cada muestra, la cual se completó con 9 ml de agua desionizada.
- d. Luego se aplicó el reactivo indicado para cada ion medido y se procedió con el resto según el manual del fotómetro.
- e. Luego de cada medición se desinfecto los contenedores de cristal del fotómetro y se anotó en el sistema cada medición para luego ser evaluado.
- f. Y se repitió este procedimiento con cada unidad experimental.

Para lograr tener un mejor control de los iones en las unidades de cultivo se realizó mediciones cada semana, la primera medición que se realizó fue antes de la siembra.

Los iones como  $Mg^{+2}$ ,  $K^{+1}$  y  $Ca^{+2}$  fueron suplementados en el agua de baja salinidad luego de su respectiva medición como se observa en la Tabla 3.

Para evitar la acumulación de residuos, las sales fueron aplicadas al agua del reservorio y luego fue integrada al sistema, a ésta se le aplicó suplementación de iones para que esté de acuerdo a lo necesitado, utilizando la fórmula aplicada por CIBA (2016):

$$Dosis\left(\frac{g}{m^3}\right) = \frac{\text{concentracion deseada}\left(\frac{mg}{L}\right)}{\%variable(\% \text{ al que viene el producto})/100}$$

Cada semana se realizó la medición e ionización para mantener el agua en una buena cantidad de iones, los cuales benefician el desarrollo de los langostinos en el cultivo (Valenzuela-Madrigal et al., 2017).

### 3.8. Supervivencia

Se determinó el porcentaje de supervivencia de cada uno de los tratamientos. Para calcular el porcentaje de supervivencia se aplicó la siguiente fórmula (Quimi, 2010; Saldarriaga, 1995):

$$S = \frac{Nf}{Ni} * 100$$

Donde, Nf = Población final y Ni = Población inicial.

### 3.9. Análisis metagenómico

Para realizar el análisis metagenómico se tomaron muestras de biofloc de los tanques de cultivo intensivo a baja salinidad durante los días de del experimento. Las muestras fueron identificadas como P que corresponde al tratamiento T2 (ensayo en baldes) y M que corresponde al tratamiento T3 (módulo de producción a baja salinidad en fase de pre-cría de langostinos). Luego fueron trasladadas al laboratorio Cebiomics (Anexo 7) Manta – Ecuador, para la realización de los procedimientos siguientes.

#### 3.9.1. Extracción de ADN metagenómico

Las muestras de biofloc, obtenidas de los tanques, fueron sometidas a extracción de ADN genómico, utilizando el kit Zymo biomics DNA Miniprep (Cat.N°D4300), siguiendo las especificaciones del fabricante.

- a) Se colectó 50 ml de muestra fresca de cada sitio muestreo

- b) Se centrifugo 2 veces a 5000 rpm.
- c) Se desechó el sobrenadante y el pellet fue conservado.
- d) Se agregó 250 mg de pellet de la muestra en el ZR Bashing Bead Lysis Tubes (0.1 0.5mm) Beads, luego se añadió 750 µl del Zymo biomics lysis solution y se cerró firmemente.
- e) Se colocó en el vortex por  $\geq 5$  minutos a velocidad máxima.
- f) Se centrifugó la muestra a 10 000 x g durante 1 minuto.
- g) Se transfirió 400 µl del sobrenadante dentro de los tubos de colección Zymo-Spin™ III-F Filter y se centrifugó a 8 000xg durante 1 minuto.
- h) Se descartó el filtro y se agregó 1 200 µl de Zymo biomics™ DNA Binding Buffer.
- i) Luego se transfirió 800 µl de la mezcla y del paso 5 dentro de la Zymo-Spin™ IICR
- j) Se colocó la columna en un microtubo de colección y se centrifugó a 10 000 x g durante 1 min.
- k) Se descartó el filtrado y se repitió el paso 9.
- l) Después se agregó 400 µl de DNA wash buffer 1 dentro de la Zymo-Spin™ IICR Column, en un nuevo microtubo de colección, seguido se centrifugó a 10 000 x g durante 1 min, y se descartó lo filtrado.
- m) Luego se agregó 700 µl DNA wash buffer 2, dentro de la columna y se centrifugó a 10 000 x g durante 1 minuto, se descartó lo filtrado.
- n) Se agregó 200 µl de DNA wash buffer 2 dentro de la columna y centrifugó 10 000 x g durante 1 min, se descartó lo filtrado.
- o) Se transfirió la Zymo-Spin™ IICR Column a un nuevo tubo de 1.5 ml y se agregó 100 µl de Zymo biomics™ DNase/RNase Free Water directamente a la columna matrix e incubar por 1 min.

- p) Luego se centrifugó a 10 000 x g durante 1 min para eluir el ADN (se descarta el filtro).
- q) Se colocó el Zymo-Spin™ III-HRC Filter en un nuevo microtubo de colección y se agregó 600 µl Zymo biomics™ HRC Prep Solution y se centrifugó a 8 000 x g durante 3 min, se descartó lo filtrado.
- r) Se transfirió el ADN eluído en el paso 14 dentro del Zymo-Spin™ III-HRC Filter (preparado anteriormente en el paso 15) en un nuevo microtubo de 1.5ml, se centrifugó a 16000xg por 3 min y se descartó el filtro.
- s) Se guardó el ADN metagenómico contenido en el tubo eppendorf a -20°C, hasta su uso.

### 3.9.2. Secuenciación de ADN metagenómico

Se tomó 20 µl del ADN procedente de las muestras extraídas y se enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen (EE. UU) para su procesamiento bajo la tecnología de Illumina.

Los datos obtenidos fueron analizados con el software libre del servidor utilizando el programa de bioinformática Mothur, para obtener los análisis de biodiversidad e identificación taxonómica.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Aclimatación de microalgas a baja salinidad

En la Figura 1 se observa que las microalgas *Navicula* sp (B4), *Thalassiosira pseudonana* (H11), *Gomphoneis minuta* var. *Cassieae* (S9), *Navicula glaciei* (D4), *Navicula* cf. *Perminuta* (D6), *Navicula cryptocephala* (S7), *Tetraselmis* sp (Te), *Navicula cryptocephala* (9B), *Navicula* sp (B9), *Chaetoceros gracilis* (Gra) y *Navicula* sp (F5); presentaron un crecimiento ascendente y progresivo, que fue favorecido por el cambio gradual de salinidad desde su cultivo en tubos de 15 ml con salinidad de 30‰ hasta los baldes de 10L a salinidad 0-5 ‰, lo cual evitó el estrés osmótico que puede conllevar a alterar las funciones vitales de las microalgas o causar la muerte (Coster et al.,1977).

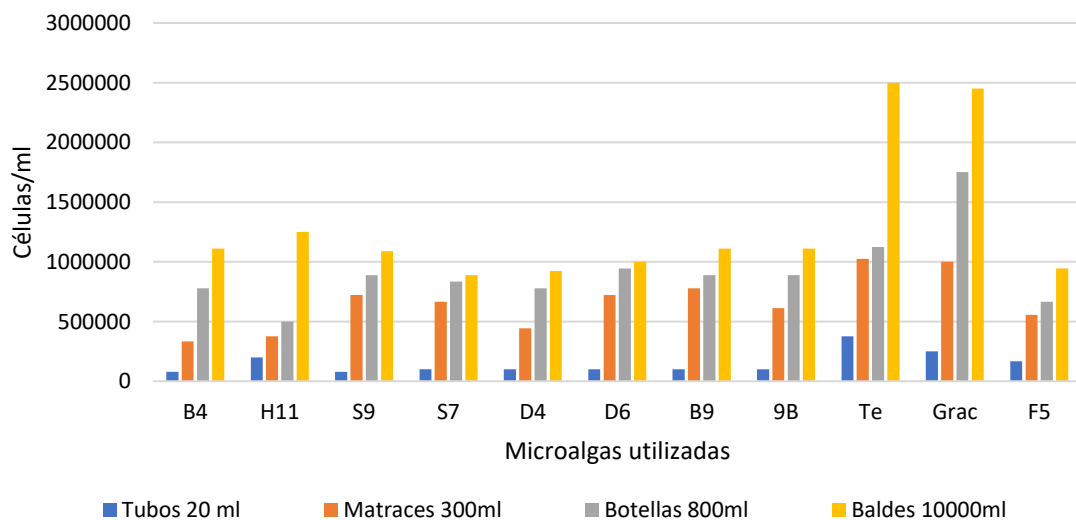


Figura 1. Crecimiento de microalgas por fase de cultivo

Por lo tanto fue posible su adaptación a bajas salinidades, coincidiendo con lo reportado por D'ors et al. (2016), quienes evaluaron la tolerancia de microalgas a salinidades de 5 – 35 ‰, refiriendo que la baja salinidad mejora la respiración de *Tetraselmis suecica*, y no afecta su crecimiento. De igual manera Leal et al. (2013) reportaron que, las microalgas *Navicula germanopolonica* y *Amphora* sp. son especies que toleran amplios rangos de salinidad, demostrando así la capacidad de adaptación de las microalgas tal como fue logrado en la presente investigación.

#### 4.2. Adaptación de bacterias a baja salinidad

De las 4 cepas bacterianas sometidas a adaptación de alta (30 ‰) a baja salinidad (0,5 ‰) en medios de cultivo TSA y TSB, sólo *Bacillus cereus* mostró crecimiento después de ocho horas de cultivo, demostrando así su capacidad de adaptación, coincidiendo con lo mencionado por Arokiyaraj et al. (2019) y Donio et al. (2016), quienes manifiestan que la bacteria *B. cereus* es un microorganismo tolerante a ambientes poco salinos.

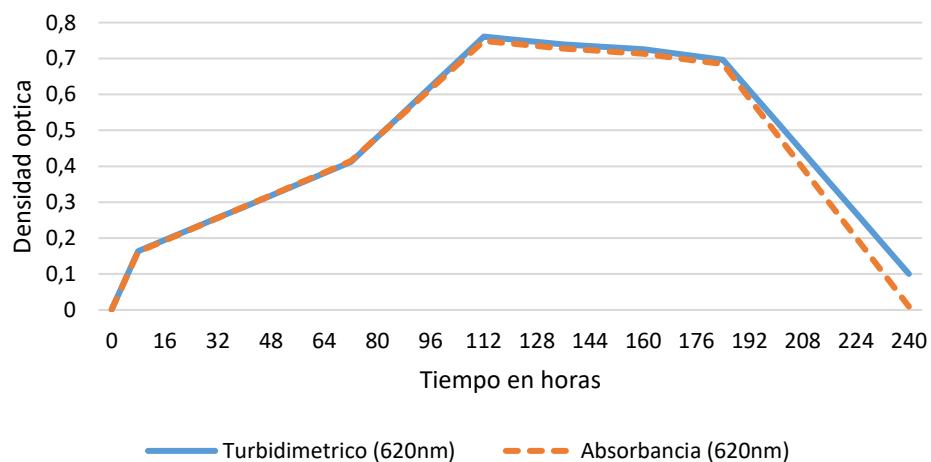


Figura 2. Curva de crecimiento de la bacteria *Bacillus cereus* en medio líquido TSB

En la Figura 2 se muestra la curva de crecimiento de *B. cereus*, durante un periodo de 10 días a intervalos de 8 horas, en medio líquido TSB. La cepa bacteriana presentó la fase exponencial hasta las 112 horas, luego permaneció en la fase estacionaria hasta las 184 horas y finalmente disminuyó su crecimiento hasta las 240 horas (fase de muerte celular).



Estos ensayos permiten deducir que *B. cereus* es un buen candidato para el uso en la constitución de biofloc en ambientes de baja salinidad (Anexo 8 y Anexo 9), así como de alta salinidad. Che Hashim et al. (2019) y Risco (Com.pers. 2019) manifiestan que *B. cereus* tiene la capacidad de excretar exopolisacáridos, los cuales ayudan a la formación de biofilm y flóculos. Además, indican que éstos deben mantenerse en una concentración de 13 mg/L, para estar disponibles como alimento permanente para langostinos u otros animales cultivados.

Así mismo, Alfiansah et al. (2018) declaran que *B. cereus*, posee actividades nitrificantes que contribuyen a la reducción de las concentraciones de nitrógeno total amoniacal, nitrito y nitrato, compuestos tóxicos para los animales acuáticos en cultivo. Según Barman et al. (2017) la remoción compuestos nitrogenados tóxicos por microorganismos heterotróficos, como *Bacillus cereus*, pueden realizar la oxidación de  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  a  $\text{NO}_2^- -\text{N}$  o  $\text{NO}_3^- -\text{N}$ , además de expresar enzimas en su periplasma como nitrato reductasa (nap), hidroxilamina oxidorreductasa (hao), y nitrito reductasa (nirS), las cuales le ayudan a realizar de manera simultánea la reducción de  $\text{NO}_2^- -\text{N}$  y  $\text{NO}_3^- -\text{N}$  a dos rutas óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) o nitrógeno molecular o atmosférico ( $\text{N}_2$ ), siendo así capaces de realizar una nitrificación heterotrófica y una desnitrificación aeróbica. Aunado a ello, Feliatra et al. (2019) reportan la capacidad antimicrobiana de *B. cereus*, debido a la producción de bacteriocininas, que son proteínas con actividad bactericida o bacteriostática contra otros microorganismos. Estas bacteriocinas pueden inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y competir por los recursos en el entorno, lo que ayuda a mantener un equilibrio microbiano saludable.

Por consiguiente, *B. cereus* en la constitución de biofloc, cumple un rol importante, no sólo como fuente de proteína de origen bacteriano sino también como productor de antimicrobianos, agente probiótico y regulador de la calidad de agua, lo cual brinda un excelente ambiente para el desarrollo del langostino a baja salinidad.

### 4.3. Evaluación de parámetros fisicoquímicos

En la Figura 3 se muestra el promedio de la medición del nitrógeno total (TAN) por día en cada tratamiento, en un periodo de 30 días. Se observa que los valores de los tratamientos control (C) y tratamiento 1 (T1) a los cuales no se les incorporó el biofloc, muestran valores hasta de 3 mg/L, mientras que los tratamientos T2 y T3, a los cuales se les adicionó el biofloc y azúcar como fuente de carbono, mostraron valores inferiores que rara vez sobrepasan el 1mg/L. Avnimelech (1999) expone la importancia del manejo de la relación de C:N, y menciona que la proporción de 20:1 ayuda a controlar los valores de TAN en el cultivo de tilapia y de langostinos. Así mismo, Emerenciano et al. (2017) cita que es necesario mantener la relación de C:N en proporción de 12-20:1 en la fase de establecimiento, ya que juega un rol clave en el inicio del cultivo y crecimiento de biofloc. Gracias a esta gran concentración de carbono el biofloc logra promover su crecimiento y estabilizar a las comunidades heterotróficas en él, mientras que en la fase de mantenimiento (6:1) la fuente de carbono sólo es empleada para estimular a las bacterias heterotróficas a realizar transformación del TAN a un compuesto menos tóxico para los animales acuáticos de cultivo; tal como en el presente estudio, se consideró la relación de 6:1 durante la fase de mantenimiento.

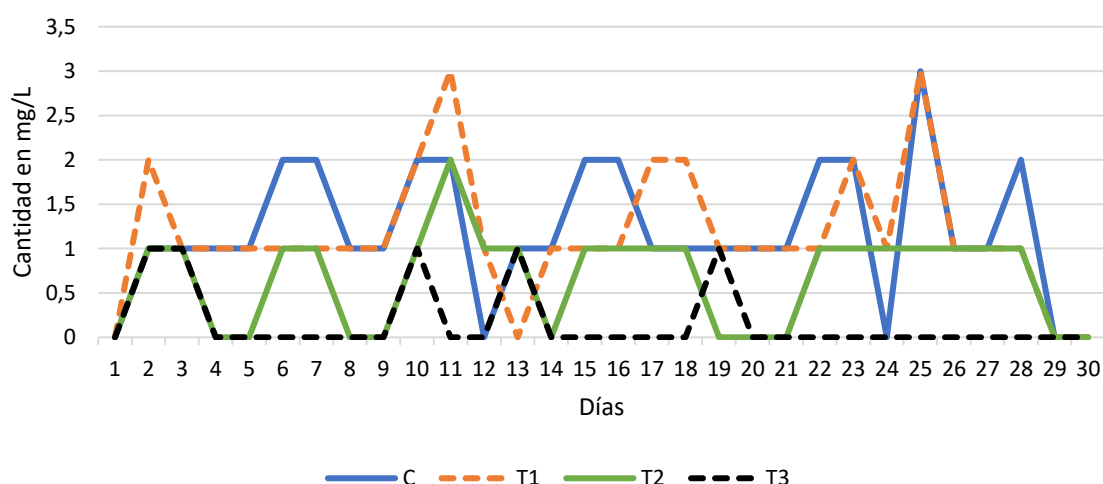


Figura 3. Valores de Nitrógeno Total Amoniacal (TAN) en los tratamientos a baja salinidad

El análisis de varianza con prueba de Bonferroni ( $p = 0.003$ ) demostró que los tratamientos C y T1 tuvieron una gran significancia estadística similar y mayor en comparación a los tratamientos T2 y T3. Los tratamientos C y T1 mostraron una media de 1,26194 mg/l y 1,23189 mg/l, respectivamente, indicando que estos tratamientos no poseen microorganismos agregados para transformar o reducir el TAN. Por otro lado, los tratamientos T2 y T3 contenían el biofloc y una menor acumulación de TAN, de acuerdo con su media (0,69 678mg/l y 0,345mg/l, respectivamente) (Figura 4).

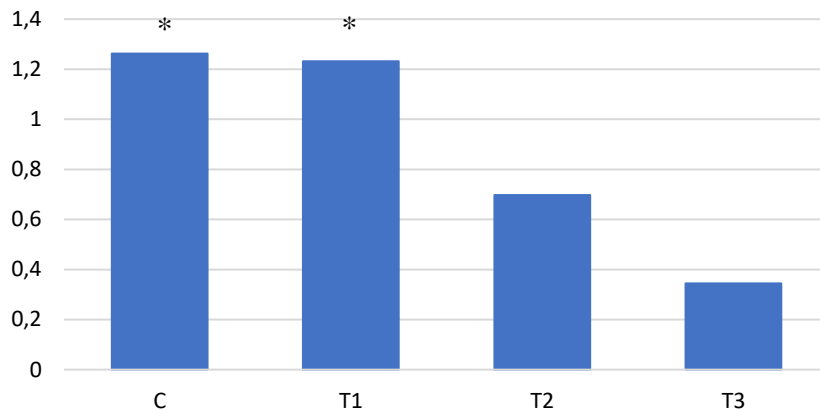


Figura 4. Análisis de varianza TAN

Con respecto al nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), en la Figura 5 se observa que en los tratamientos C1 y T1 (a los cuales no se les aplicó el biofloc) la concentración de nitrato fue nula debido a que la tasa de recambio (30%) evitó la conversión del TAN en  $\text{NO}_2^-$ . Dicho recambio conllevó al aumento de los costos de producción, a la disminución de microorganismos con la posible aparición de patógenos oportunistas, y a la contaminación del ambiente debido a las aguas cargadas de nitrógenos tóxicos (Hopkins et al., 1993). Sin embargo, en los tratamientos T2 y T3 (a los cuales se les aplicó el biofloc) el recambio fue menor (10%), y presentaron concentraciones de hasta 2 mg/L, demostrando que el biofloc logró mantener a niveles estables la concentración de  $\text{NO}_2^-$ , como elemento propio del ciclo de nitrógeno producido en los experimentos.

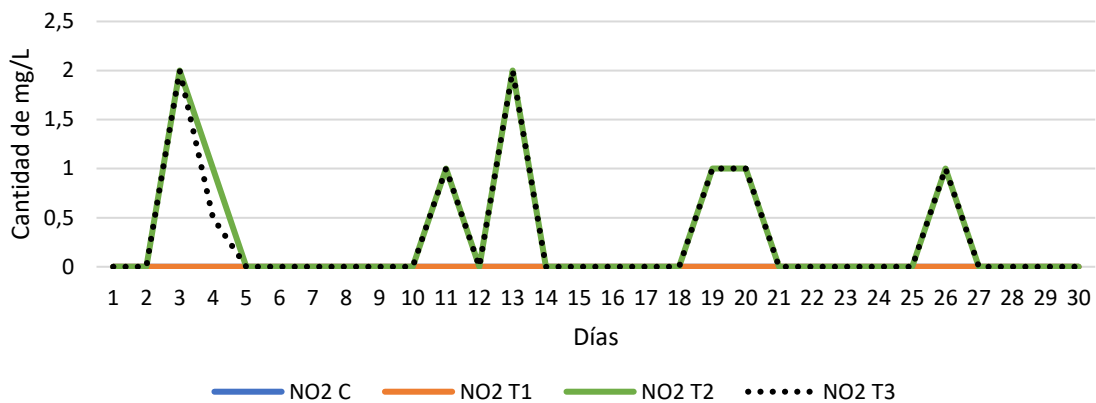


Figura 5. Nivel de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) en los tratamientos a baja salinidad

El análisis de varianza realizado al NO<sub>2</sub><sup>-</sup> mostró que los tratamientos T3 y T2 obtuvieron mayor acumulación de nitrito, con medias de 0,37222mg/l y 0,40667 mg/L, respectivamente, siendo significantes con mejores rendimientos. Los tratamientos C (0,09333 mg/l) y T1(0,07889 mg/l) tuvieron menos acumulación de nitrito así constando que el biofloc ayuda a la transformación del TAN a NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, por esta razón los tratamientos que no poseen biofloc poseen una cantidad mínima de nitrito, pues los microorganismos son los encargados de realizar esta función (Figura 6).

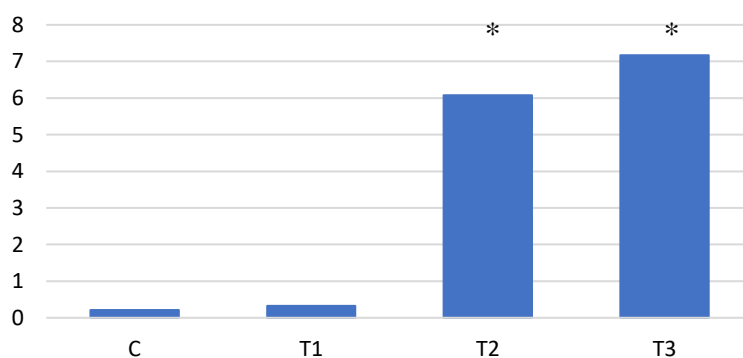


Figura 6. Análisis de varianza Nitrito NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

Por otro lado, con respecto a los niveles de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), en la Figura 7 se observa que los tratamientos T2 y T3 a los cuales se les aplicó el biofloc, presentaron niveles de nitrato de hasta 40 mg/L aproximadamente; deduciendo que el biofloc contribuyó a la conversión de TAN a NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, el cual es consumido

por el fitoplancton; de esta manera, los microorganismos que conforman el biofloc cumplen diferentes roles, tal como lo afirma Azam et al. (1983).

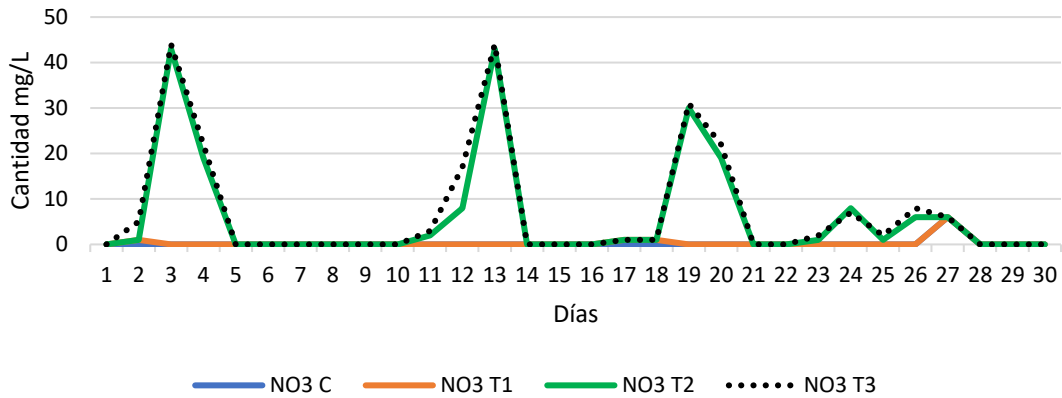


Figura 7. Concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en los tratamientos a baja salinidad

Al ser sometido al análisis de varianza los resultados del NO<sub>3</sub><sup>-</sup> demostraron que los tratamientos T2 y T3 poseen una mayor cantidad de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Las medias para T3 fue de 7,17222 mg/L mientras que T2 presentó una media de 6,075 mg/L. Estas cantidades de nitrato luego serán aprovechadas por las microalgas presentes en el biofloc. En tanto en los tanques C y T1, al no poseer microalgas ni microorganismos agregados, la presencia de nitrato es mínima (C = 0,32222 mg/L; T1 = 0,20667 mg/L) y es lavada al realizar el recambio de agua, dejando a estos tanques libres de nitrato.

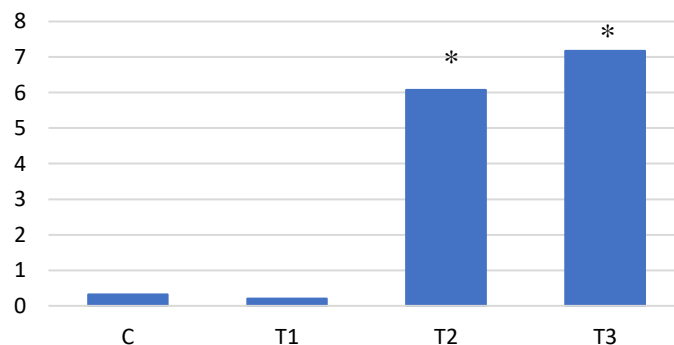


Figura 8. Análisis de varianza de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

Los parámetros de temperatura, oxígeno disuelto (OD) y pH se mantuvieron dentro de los límites en todos los tratamientos.

La temperatura promedio del experimento fluctuó entre 23-28 °C (Figura 9), la cual se encontraba bajo invernadero, obteniendo la temperatura más baja en la madrugada y la más alta al mediodía, siendo una temperatura óptima para el cultivo de langostino, coincidiendo con lo reportado por Araneda et al. (2020) quienes manifiestan que la mejor temperatura para la producción de cultivos intensivos (densidad de 90, 120, 180, 230, 280 y 330 ind/m<sup>2</sup>) de langostino se encuentra entre 22-26 °C; mientras que para cultivos convencionales se encuentra entre de 26-30 °C (Foes et al., 2021). Esto indica que la temperatura en el experimento mantiene un metabolismo apto para un buen desarrollo de crecimiento, pues a más temperatura se acelera el metabolismo es decir consumen más alimento y excretan más.

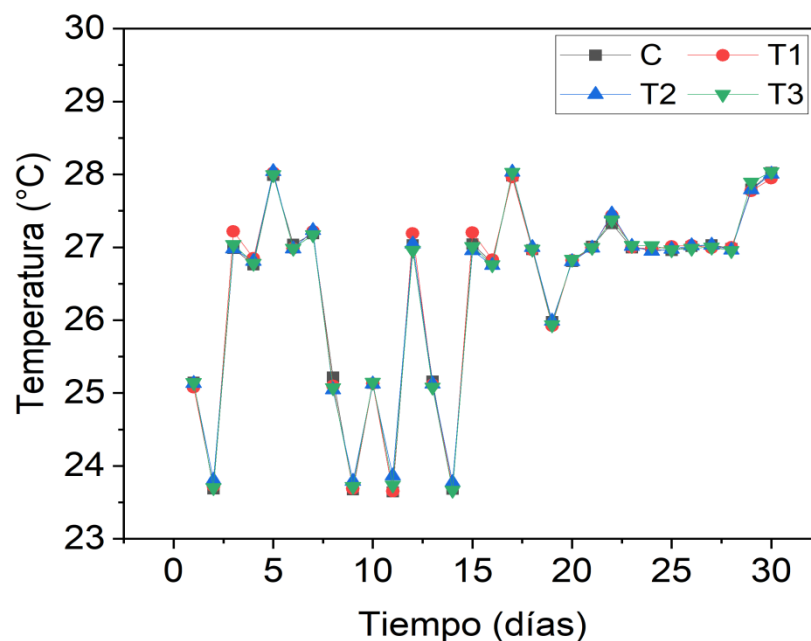


Figura 9. Temperatura en los tratamientos a baja salinidad

En el ANOVA se muestra que no hay diferencias significantes en los tratamientos, pues la temperatura en sus medias es relativamente igual en cada

uno de ellos, C (26, 40); T1 (26, 41); T2 (26, 41); T3 (26, 40) y la variación es mínima, lo cual fue confirmado con la prueba de Bonferroni donde la media de los tratamientos es igual.

Por otra parte, los valores de OD se mantuvieron entre 7 y 8 mg/L (Figura 10), encontrándose dentro de los valores recomendados por Rahman et al. (2020), quienes mencionan que los valores de OD óptimos en el cultivo de langostino deben ser superiores a 5 mg/L, pues los valores inferiores a 5 pueden causar estrés y muerte en caso de altas densidades. La prueba de ANOVA y Bonferroni no mostraron diferencia entre los tratamientos.

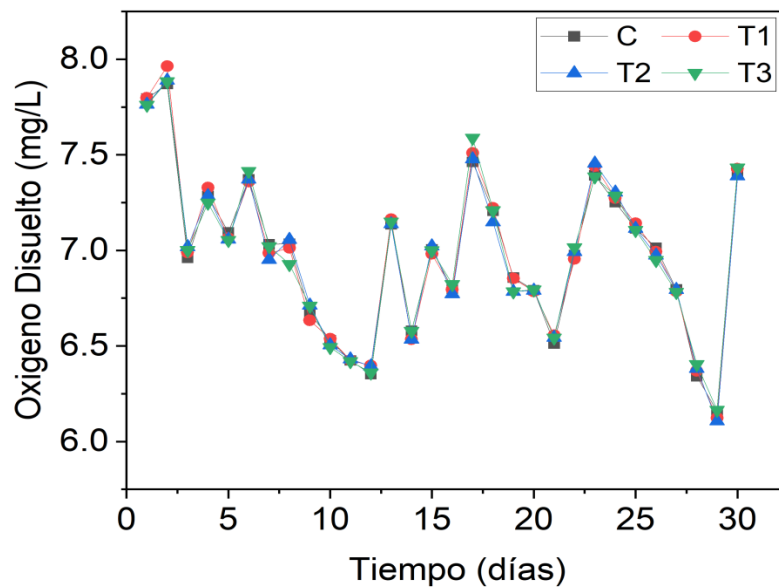


Figura 10. Oxígeno disuelto en los diferentes tratamientos a baja salinidad

Los valores de pH se mantuvieron entre el intervalo de 7.5 - 8.5 aproximadamente (Figura 11), siendo recomendado un pH de 7 (Araneda et al., 2020; Vega-Villasante et al.,(2011).

El análisis de varianza mostró diferencia entre las medias de los tratamientos. La prueba de Bonferroni demostró que hubo similitud entre las medias de los tratamientos T1 (7, 91769) y T2(7, 84128), siendo T1 el mejor. Entre tanto, C, T2 y T3 fueron similares, presentando medias para C de 7, 83041 y en T3 de 7, 82754.

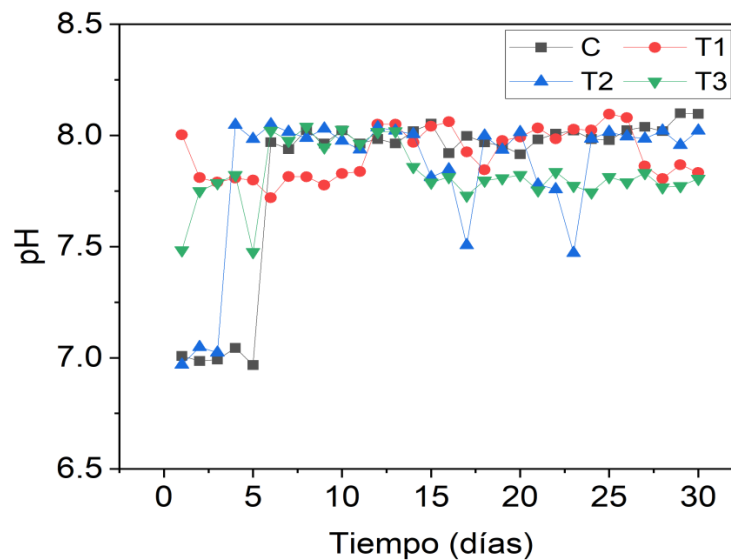


Figura 11. pH en los tratamientos del experimento a baja salinidad

#### 4.4. Medición de iones en las unidades de prueba.

Los iones fueron suplementados antes de la siembra, esto ayudó a que los langostinos tengan un buen desarrollo a baja salinidad, lo cual es una regla clave para evitar el recambio de más del 25 % en los cultivos de este tipo (Oliveira et al., 2022).

Los tratamientos que constan de agua de mar no se les realiza ionización alguna pues es el agua donde se encuentra un excelente balance iónico de manera natural, y posee todos los iones necesarios para el desarrollo de estos.

Suguna (2020) afirma que los iones  $K^{+1}$ :  $Mg^{+2}$ :  $Ca^{+2}$  son muy importantes para el buen desarrollo y crecimiento de *L. vannamei*, ya que al estar en baja salinidad se producen desequilibrios iónicos en el cultivo lo que causa palidez de cola, calambres y muerte. Teniendo en cuenta esto, cabe indicar que los iones menos abundantes en el agua de baja salinidad son:  $K^{+1}$ :  $Mg^{+2}$ . El potasio es el ion más importante para el cultivo del langostino ya que está relacionado directamente con el crecimiento y supervivencia, por lo cual su cantidad mínima debe ser 1 ppm. El magnesio es importante para el metabolismo de los langostinos y el calcio es absorbido cada vez que se realiza el proceso de muda pues *L. vannamei* no posee una reserva interna de calcio como los crustáceos de agua dulce según McWhinnie (1962), su cantidad no debe ser menor a



1ppm y además se debe realizar una mezcla de los iones más importantes para tener un buen cultivo de langostinos.

Según Oliveira et al. (2022) y Roy et al. (2007) La mejor relación de iones se encuentra en el agua de mar donde el potasio, magnesio y el calcio están en relación 1:3:1. Teniendo en cuenta este dato, en esta investigación se buscó mantener la relación de estos iones para intentar imitar lo que posee el agua de mar ( $K^{+1}:Mg^{+2}:Ca^{+2}$ , 1:3:1) y es lo que mejor funcionó en la experimentación.

En la Tabla 3, podemos observar el balance iónico que posee el agua, los iones del agua del reservorio y las cantidades con que se realizó la suplementación iónica del agua siguiendo la relación 1:3:1 en el agua de baja salinidad.

**Tabla 3**

*Medición de iones e ionización*

| Parámetros      | Agua de pozo | Agua para cultivo | Agua de mar |
|-----------------|--------------|-------------------|-------------|
| Salinidad (‰)   | 3            | 3                 | 33          |
| Magnesio (mg/L) | 35           | 240               | 1200        |
| Potasio (mg/L)  | 12           | 80                | 340         |
| Calcio (mg/L)   | 47           | 80                | 475         |

#### 4.5. Supervivencia y peso promedio

No se presentó mortalidad en ninguno de los tratamientos evaluados al finalizar el ensayo, como se puede observar en la Tabla 4.

**Tabla 4***Sobrevivencia y peso promedio por tratamiento*

| Tratamiento | Peso promedio (g) | Número de animales |
|-------------|-------------------|--------------------|
| C           | 0,9               | 27                 |
| T1          | 0,73              | 27                 |
| T2          | 0,87              | 27                 |
| T3          | 0,87              | 27                 |

Los individuos del tratamiento C, obtuvieron la mayor ganancia en peso que fue de 0,9 g, seguido de los tratamientos T2 y T3 que obtuvieron 0.87 g; y finalizando con T1 con 0,73 g. La prueba de Bonferroni no mostró diferencias entre los tratamientos.

La desviación estándar (Figura 12) obtenida en cada tratamiento según el peso fue de: C (0, 900);T2-T3(0, 8700); T1 ( 0, 73025), el análisis de varianza no demostró diferencias significativas.

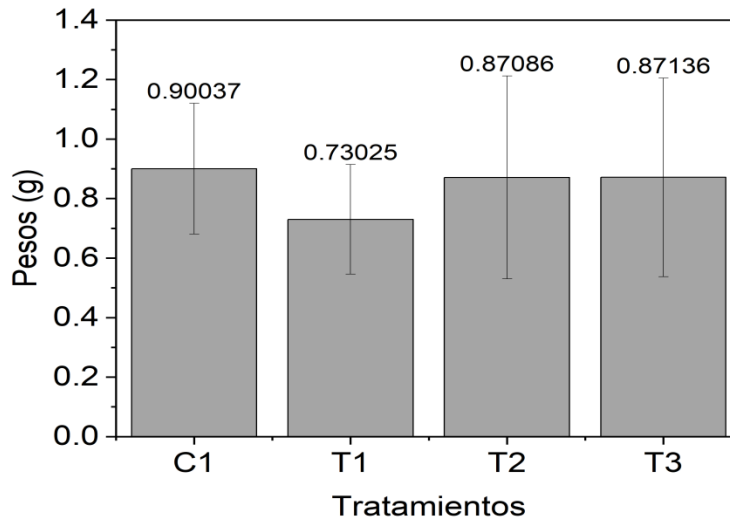


Figura 12. Desviación estándar de los pesos promedio

Valenzuela-Jiménez et al. (2021) en su estudio sobre el efecto del biofloc en agua clara y con biofloc en alta (35 ‰) y baja salinidad (5 ‰) en *Penaeus setiferus*, utilizaron una densidad 10 animales en tanques de 100 L, con un peso promedio inicial de 5,68 g por langostino teniendo cuatro unidades experimentales: Biofloc en agua de alta salinidad (hsBFT) , Biofloc en agua de baja salinidad (lsBFT) donde se aplicó un recambio del 2% para recuperar la perdida de agua por evaporación diaria. En el agua de mar clara con alta salinidad (hsCW) y Agua clara con baja salinidad (lsCW) se realizaron recambios del 35% diario. El crecimiento promedio y supervivencia en cada unidad experimental fue de hsCW (8,08 g; 60%), lsCW (4,5 g; 26,6%), hsBFT (9,28 g; 56,6%) y lsBFT(8.33; 40%) indicando un crecimiento similar en dos tratamientos hsCW y lsBFT.

Suguna (2020) en su estudio sobre el efecto de la composición iónica sobre el crecimiento y la supervivencia de camarón blanco *L. vannamei* en agua de pozo (0,5 ‰), el peso inicial fue de 0.012g con una densidad de 150 langostinos por m<sup>2</sup> en 133 días, realizó cuatro tratamientos en alta salinidad (35 ‰) Tm como control y cuatro a baja salinidad (1,2 ‰) con diferente relación de iones K<sup>+</sup> :Mg<sup>2+</sup>: Ca<sup>2+</sup> : Na<sup>+</sup> , relación utilizada para cada tratamiento T1 (1:3:12:30), T2 (1:20:29:7), T3 (1:52:44:162) T4 (1:25:41:76), Tm (1:3:1:28). El crecimiento y supervivencia de cada tratamiento fue el siguiente: Tm (13,3 g: 34,6 %), T1 (12,8 g: 78,4 %), T2 (11,6 g: 77,6 %), T3 (10,8 g: 78,6 %), T4 ( 11,2 g: 76,4 %),

y cada día se realizó un recambio del 10 % para mantener la calidad del agua. En consecuencia, se puede considerar que el establecimiento de biofloc en los sistemas de baja salinidad con baja tasa de recambio (10%) y una buena suplementación iónica permiten obtener ganancia de peso similares a lo que se obtiene en los cultivos a alta salinidad dando una buena supervivencia.

#### **4.6. Análisis metagenómicos de bacterias de los tanques de cultivo del módulo productivo Cebiomic's.**

Los datos obtenidos del secuenciamiento de bacterias mediante la tecnología de Illumina de las muestras P (prueba de baldes) y M (módulo productivo a baja salinidad fase de cría) generaron un total de 294 y 980 secuencias respectivamente, con una longitud de lectura promedio de 250 pb. No se consideraron secuencias con puntajes de calidad menores a 25 %, ni secuencias menores 150 pb y quimeras.

##### **4.6.1. Análisis bacterianos**

Luego de una purificación de las secuencias quedaron en ambas muestras 240 secuencias de alta calidad asignadas en OTUs (unidades taxonómicas operacionales) representativos mayores a 0.01% utilizando el programa de bioinformática MOTHURS. Cabe mencionar que el 85% de secuencias generadas por Illumina fueron filtradas a través de los procesos de alta calidad con un porcentaje del 95 %, indicando que no todas las secuencias generadas presentan buenos puntajes de calidad y podrían afectar el análisis de los datos.

Los resultados del análisis informático permitieron identificar 9 OTUs en P y 12 OTUs en M, de bacteria asociadas al agua de cultivo de langostinos super intensivo a baja salinidad, conociendo también que las muestras de agua de cultivo poseen una gran cantidad de inhibidores y contaminantes los cuales dificultan tener una mayor cantidad de secuencias.

### a) Curva de rarefacción

La rarefacción nos ayuda a medir la diversidad por cada muestra estudiada según el número de secuencias, como se evidencia en la Figura 13.

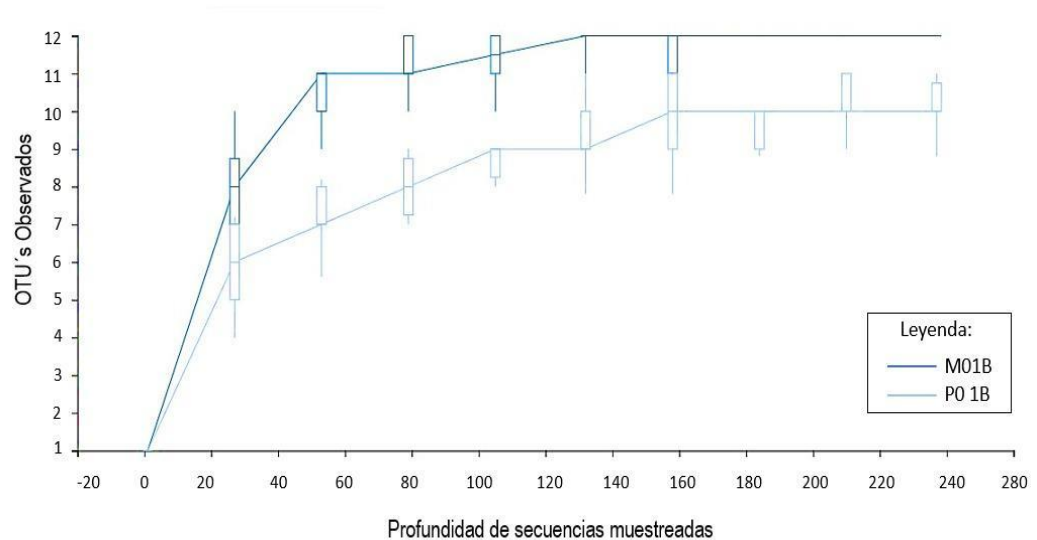


Figura 13. Curva de rarefacción de bacterias a baja salinidad

Los resultados obtenidos mostraron una curva de rarefacción de la medición de OTUs y biodiversidad en las muestras P y M, observándose una diversidad mayor en la muestra M con 12 OTUs, aunque difieren en varios grupos microbianos presentes en la muestra P con 9 OTUs, además al ver la forma de las curvas, de la secuencia 160 a 240 está casi horizontal. Javier-Intriago et al. (2018) señala que cuando las secuencias están horizontales indican que el número de OTUs no aumenta en relación a la cantidad de amplicones secuenciados, lo cual indica que la muestra M posee una mínima diversidad sobre P luego de haber realizado una lectura total de las secuencias que cumplen con el estándar previamente mencionado.

b) Abundancia de Filos bacterianos presentes en el biofloc

En la Figura 14, se observa que en la muestra M, destacaron los filos *Proteobacteria* con 53%, *Cyanobacteria* 22%, *Firmicutes* 14% y aquellos que no superaron el 2 % (*Bacteroidetes*, *Spirochaetae* y *Verrucomicrobia*). En la muestra P los filos en forma decreciente fueron: *Fusobacterias* 43%, *Firmicutes* 34%, *Actinobacteria* 12 %, *Proteobacterias* 8% y *Chloroflexi* 2%.

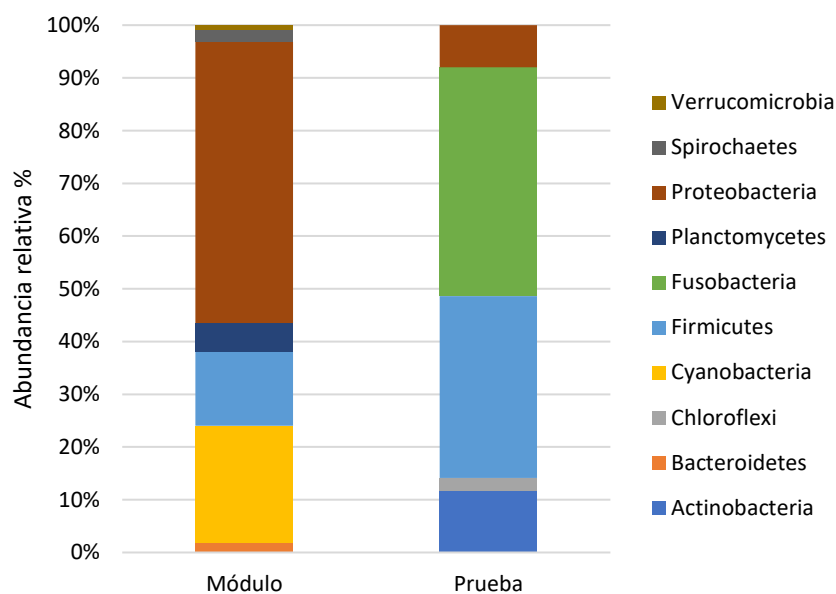


Figura 14. Abundancia de filos bacterianos en el biofloc de los tanques de cultivo

De los filos encontrados en la presente investigación, sólo 8 coinciden con los hallados por Deng et al. (2019), quienes reportan 16 filos a partir de la microbiota de agua e intestino de *L. vannamei* cultivados a densidades de 400-800 ind/m<sup>2</sup>; siendo los comunes *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, y *Verrucomicrobia*.

De la misma manera, Cienfuegos et al. (2018), durante un estudio aplicando 2 tipos de bacterias probióticas (*Bacillus subtilis*, *Rhodococcus* sp.) en el cultivo de tilapia (*Oreochromis niloticus*) y utilizando la

metagenómica para evaluar su efecto en la composición de la comunidad microbiana, obtuvieron 20 filos bacterianos de los cuales 10 concuerdan con los obtenidos en esta investigación. También, mencionan la importancia del filo *Firmicutes* debido a que albergan una gran cantidad de bacterias probióticas y controladoras de calidad del agua, entre ellas especies del género *Bacillus*. De esta manera se confirma la importancia de estos grupos bacterianos para mantener una buena calidad de agua además de causar un efecto benéfico sobre el sistema inmune de los cultivos acuícolas según (Barman et al., 2017), y se afirma que los individuos del género *Bacillus* pueden realizar una nitrificación heterotrófica. Además Hassan (2023) y Robles-Porchas et al. (2020) sostienen que estos microorganismos se encargan de generar polisacáridos extracelulares los cuales funcionan como probióticos y prebióticos, brindando mejora en la inmunidad innata lo cual ayuda a resistir de mejor manera a los patógenos.

c) Diagrama de Venn para filos

En la Figura 15 se observa que la muestra M y P presentan dos filos comunes, siendo éstos Firmicutes y Proteobacteria. Los filos exclusivos de la muestra M fueron: *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Planctomycetes*, *Spirochaetes* y *Verrucomicrobia*, mientras que los filos exclusivos de la muestra P fueron: *Chloroflexi*, *Actinobacteria* y *Fusobacteria*.

Cabe indicar que la presencia del filo *Cyanobacteria* es común en los cultivos con tecnología biofloc, sin embargo se debe prestar especial atención ya pueden desarrollarse de una manera descontrolada al tener altas concentraciones de nutrientes y óptimas condiciones de luz, pudiendo llegar al extremo de dominar el cultivo, tal como lo afirman Emerenciano et al. (2017) y Monroy et al. (2013) mencionando que los afloramientos de cianobacterias y microalgas verdes deben ser controlados, pues alteran el sabor del camarón al consumirlo y pueden causar mortalidad, por tal razón se deben aplicar mecanismos de control para el biofloc.

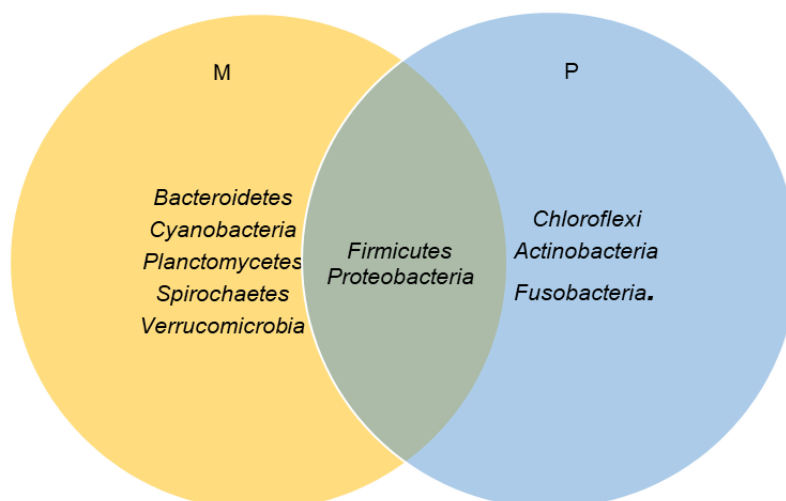


Figura 15. Filos bacterianos exclusivos y compartidos por las muestras Módulo y Prueba

d) Abundancia de géneros bacterianos presentes en el biofloc

Las comunidades de bacterias asociadas al biofloc del cultivo de *L. vannamei* en las muestras del módulo estuvieron conformadas por 17 géneros bacterianos.

La abundancia por género se reporta en la Figura 16, observando que la muestra M estuvo representada por *Lawsonia* 25% seguido de *Cyanobacteria* 22%, *Pseudomonas* 19 %, *Bacillus* 14%, *Planctomycetes* 5% y *Rhodobacteria* 10%; siendo de menor porcentaje *Brevinema* 2%, *Hymenobacter* 2%, *Luteolibacter* 1%. Para la muestra P los géneros más abundantes estuvieron representados por *Cetobacterium* 44%, *Mycobacterium* 12%, *Bacillus* 10%, *Clostridium* 10%, *Peptostreptococcus* 9%, *Methylosinus* 6% y los de menor abundancia fueron *Caldilinea* 2%, *Rhizobium* 2%, *Epulopiscium* 2%.



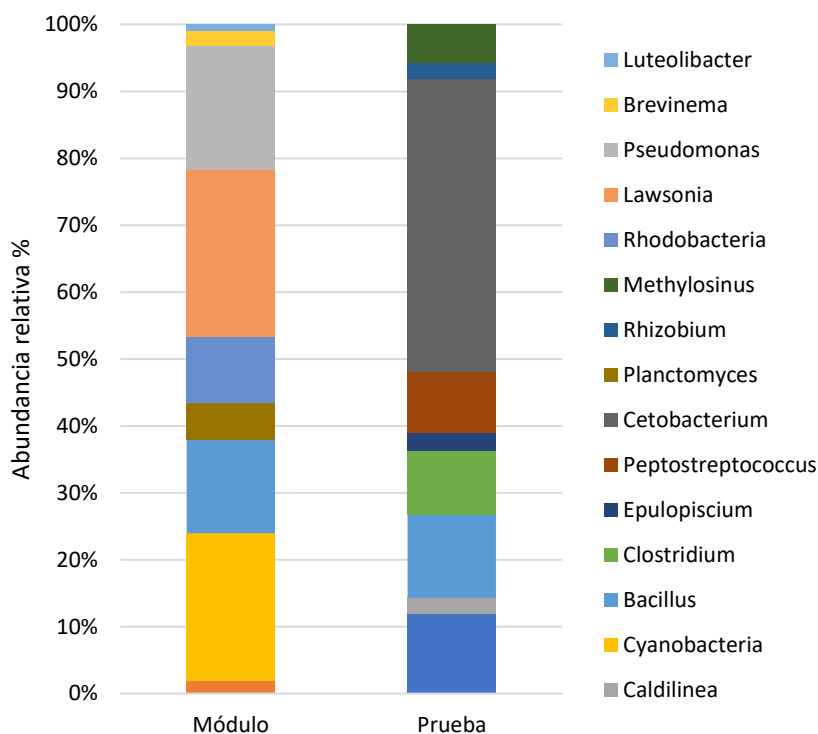


Figura 16. Géneros bacterianos en la muestra Módulo y Prueba del cultivo de *L. vannamei*.

En las muestras de biofloc se evidenció la ausencia de género *Vibrio*, siendo éste un patógeno oportunista dentro del cultivo de *L. vannamei* con alta salinidad, no fue encontrado en los análisis metagenómicos realizados por Risco (Com. Pers. 2019) en muestras de perifitón y en biofloc espontáneo.

Así mismo se pudo apreciar la prevalencia de ciertos géneros que se caracterizan por presentar a especies probióticas que ayudan a tener un mejor control del biofloc, evitando la presencia o proliferación de bacterias patógenas a través del desarrollo del quorum-sensing (Ahmad et al., (2017), ayudando a mantener el sistema inmune y mantienen una buena calidad de agua para el desarrollo del langostino en cultivo.

e) Diagrama de Venn para géneros bacterianos.

En la Figura 17, se observa que las muestras M y P presentaron en común el género *Bacillus*, siendo exclusivos para M, los géneros *Lawsonia*, *Cyanobacteria*, *Pseudomonas*, *Planctomycetes*, *Rhodobacteria*, *Brevinema*, *Hymenobacter* y *Luteolibacter*, mientras que los géneros exclusivos de P fueron *Cetobacterium*, *Mycobacterium*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Methylosinus*, *Caldilinea*, *Rhizobium* y *Epulopiscium*.

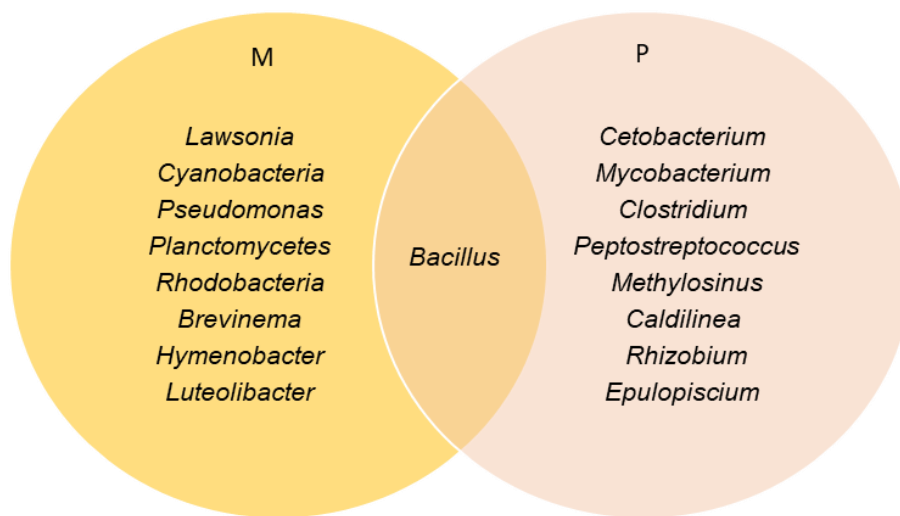


Figura 17. Diagrama de Venn de los géneros exclusivos y compartidos por las muestras Módulo y Prueba

#### 4.7. Análisis metagenómicos de microalgas en el cultivo experimental

Los resultados del análisis informático permitieron identificar en las muestras M y en P 25 000 secuencias de OTUs de bacteria asociadas al agua de cultivo de langostinos super- intensivo a baja salinidad.

a) Curva de rarefacción de microalgas

La Figura 18 presenta una curva de rarefacción de la medición de OTUs y biodiversidad en las muestras P y M, presentando 90 OTUs cada uno.

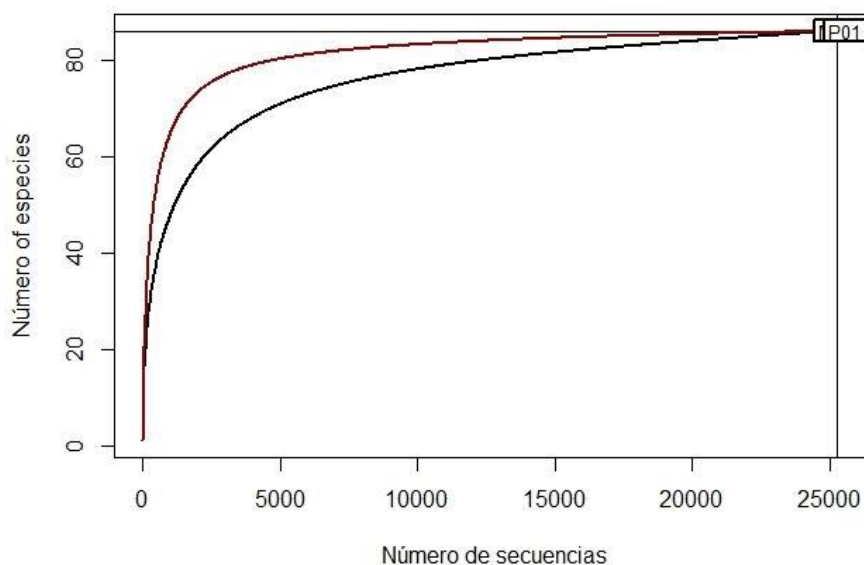


Figura 18. Curva de rarefacción muestra que no hay diferencias entre las muestras a nivel de riqueza y población.

b) Abundancia de Phylum de microalgas presentes en el biofloc

En la Figura 19 se puede observar a las comunidades de microalgas asociadas al agua de cultivo super-intensivo de *L. vannamei*, las cuales estuvieron representadas por 6 filos. Entre los filos más abundantes en la muestra M tenemos a *Bacillariophyta* con 51%; *Eukaryota* 29%; *Chlorophyta* 17% y aquellas que no superan el 2 %; *Streptophyta*, *Apicomplexa* y *Phaeophyceae*. Para P en forma descendente de abundancia estuvieron los filos *Ciliophota* 61%, *Bacillariophyta* 29%, *Streptophyta* 7%, *Chlorophyta* 2%, *Apicomplexa* y *Phaeophyceae* menores al 1%.

Los filos obtenidos en la presente investigación concuerdan con descrito por Sanli et al. (2015), quienes en el perifiton de ambientes naturales encontraron los filos *Bacillariophyta*, *Streptophyta* y *Chlorophyta*.

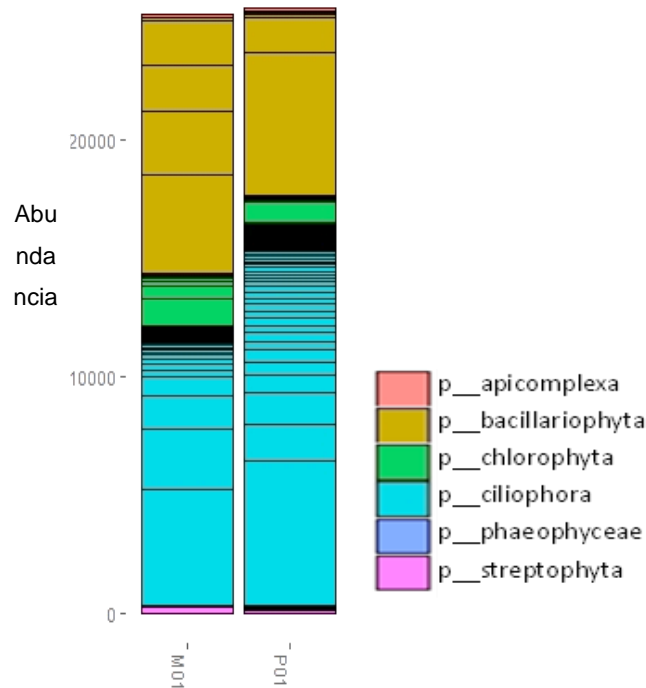


Figura 19. Abundancia de fillos de microalgas del biofloc en los tanques de cultivo Módulo y Prueba

c) Abundancia de géneros presentes en el biofloc

La abundancia y diversidad de los géneros en P y M, muestran a en la Figura 19. En M los géneros más abundantes fueron *Cyclotella* 20%, *Synedra* 16%, *Desmodesmus* 10%, *Paramecium* 10%, *Vorticella* 7%, *Nitzschia* 5%, *Scenedesmus* 4% y *Amphora* 3%.

Para la muestra P los géneros fueron *Fottea* 24%, *Paramecium* 23%, *Ephelota* 5%, *Euplotes* 5%, *Spumella* 5%, *Vorticella* 5%, *Rhodomonas* 4% y *Amphora* 2%.

Las muestras de biofloc demuestran la presencia a nivel de género de *Synedra* y *Amphora*, pertenecientes a las navículas; así como el género *Cyclotella* que según lo expresado por Alverson et al. (2011) pertenece a un ancestro de agua dulce de la *Thalassiosira pseudonana* la cual fue una de las microalgas utilizadas.

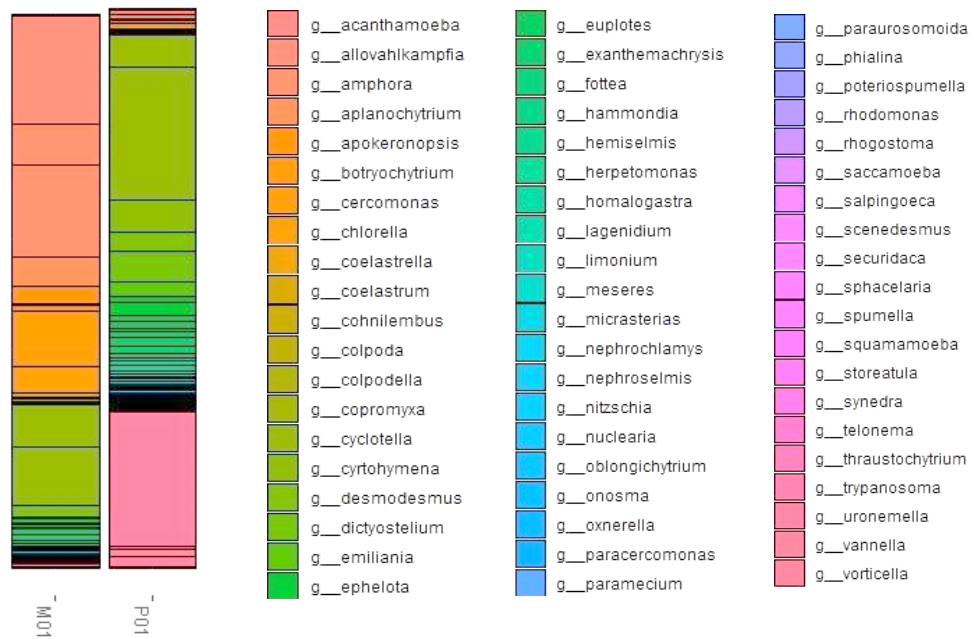


Figura 20. Géneros de microorganismos (microalgas y protozoos) en las muestras Módulo y Prueba.

Ademas, se encontraron microorganismos protozoarios como el *Paramecium*, el cual también fue reportado por Monroy et al., (2013) quienes lo asocian a sistemas de biofloc; y por Castro et al. (2014), quienes a través de un estudio sobre la abundancia de microorganismos al usar diferentes tipos de carbono, reportaron a los microorganismos *Vorticelas*, *Paramecium*, *Navicula*, *Chlorella* y *Scenedesmus*, estos estudios ayudan a comprender la importancia y eficacia de la metagenómica para la evaluación de biofloc.

## V. CONCLUSIONES

- 1) Las microalgas se adaptaron a baja salinidad logrando sobrevivir en ambientes poco salinos, estableciéndose un protocolo de adaptación continua de microalgas de alta a baja salinidad, manteniendo un crecimiento estable, lográndose identificar mediante análisis metagenómico a los microorganismos presentes en el biofloc: 17 géneros bacterianos y 24 géneros eucarióticos permitiéndonos tener un panorama más amplio sobre la calidad del agua en el cultivo de langostino.
- 2) El uso del consorcio de microorganismos (Bacterias: *Bacillus cereus*; y Microalgas: *Thalassiosira pseudonana*, *Tetraselmis* sp, *Pavlova* sp, *Navicula cryptocephala*, *Navicula* sp, *Navicula glaciei*, *Navicula cf. perminuta*, *Navicula* sp, *Navicula cryptocephala*, y *Gomphoneis minuta* var. *Cassieae*), aclimatados a baja salinidad tuvo un impacto positivo en el crecimiento y supervivencia del langostino.
- 3) En esta investigación, se mantuvo un nivel de flóculo en un rango de 12-15 ml/L, asegurando que los parámetros del agua, como TAN, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, estuvieran en niveles óptimos para el desarrollo del cultivo de langostino.
- 4) El efecto del consorcio de microorganismos aclimatados a baja salinidad en el cultivo de langostinos mostró un impacto positivo en el crecimiento en comparación con el grupo de control. Los langostinos en los tratamientos (T2 y T3) con el consorcio alcanzaron un peso promedio de 0,87 g., manteniendo un buen balance iónico en relación 1:3:1 de K<sup>+1</sup>: Mg<sup>+2</sup>: Ca<sup>+2</sup> para promover la supervivencia del *Litopenaeus vannamei*.
- 5) El análisis metagenómico ofreció información esencial sobre la diversidad microbiana y el uso eficaz del biofloc en la acuicultura. Esta técnica se presenta como un elemento clave para mejorar significativamente la eficiencia y la sostenibilidad en la producción acuícola.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- 1) Realizar estudios de aislamiento de microorganismos bacterianos y microalgales con potencial floculante, los cuales deben ayudar a mejorar la nutrición por su alto contenido proteico y lipídico en cultivos de baja salinidad.
- 2) Realizar análisis meta-proteómicos en cultivos de langostino a baja salinidad con biofloc, para monitorear como afecta la suplementación con biofloc a nivel de proteínas dentro en el langostino.
- 3) Optimizar protocolos para la maduración del biofloc en cultivos de baja salinidad.
- 4) Aislar bacterias nitrificantes para integrarlas al biofloc, con la finalidad de mejorar la calidad del agua en los cultivos de baja salinidad.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aalimahmoudi, M., Azarm, H. M., & Mohamadi, Y. (2017). *Biofloc new technology and shrimp disease in super-intensive aquaculture*. 2(2), 17–21.
- Ahmad, I., Babitha Rani, A. M., Verma, A. K., & Maqsood, M. (2017). Biofloc technology: an emerging avenue in aquatic animal healthcare and nutrition. *Aquaculture International*, 25(3), 1215–1226. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-0108-8>
- Alverson, A. J., Beszteri, B., Julius, M. L., & Theriot, E. C. (2011). The model marine diatom *Thalassiosira pseudonana* likely descended from a freshwater ancestor in the genus *Cyclotella*. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-125>
- Araneda, M., Gasca-Leyva, E., Vela, M. A., & Domínguez-May, R. (2020). Effects of temperature and stocking density on intensive culture of Pacific white shrimp in freshwater. In *Journal of Thermal Biology* (Vol. 94). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102756>
- Arokiyaraj, S., Varghese, R., Ali Ahmed, B., Duraipandiyan, V., & Al-Dhabi, N. A. (2019). Optimizing the fermentation conditions and enhanced production of keratinase from *Bacillus cereus* isolated from halophilic environment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(2), 378–381. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.10.011>
- Avnimelech, Y. (1990). Biofloc technology Important fact to remember. *Manual*, 42. <https://doi.org/10.1016/j.anrea.2017.08.009>
- Avnimelech, Y. (1999). Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 176(3–4), 227–235. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00085-X)
- Avnimelech, Y., Troeger, B. W., & Reed, L. W. (1982). Mutual flocculation of algae and clay: Evidence and implications. *Science*, 216(4541), 63–65.



<https://doi.org/10.1126/science.216.4541.63>

- Azam, F., Fenchel, T., Field, J., Gray, J., Meyer-Reil, L., & Thingstad, F. (1983). The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 10, 257–263. <https://doi.org/10.3354/meps010257>
- Barman, P., Kati, A., Mandal, A. K., Bandyopadhyay, P., & Mohapatra, P. K. Das. (2017). Biopotentiality of *Bacillus cereus* PB45 for nitrogenous waste detoxification in ex situ model. *Aquaculture International*, 25(3), 1167–1183. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-0105-y>
- Beardsley, C., Moss, S., Malfatti, F., & Azam, F. (2011). Quantitative role of shrimp fecal bacteria in organicmatter fluxes in a recirculating shrimp aquaculture system. *FEMS Microbiology Ecology*, 77(1), 134–145. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01094.x>
- Bexfield, N., & Kellam, P. (2011). Metagenomics and the molecular identification of novel viruses. *Veterinary Journal*, 190(2), 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.10.014>
- Bossier, P., & Ekasari, J. (2017). Biofloc technology application in aquaculture to support sustainable development goals. *Microbial Biotechnology*, 10(5), 1012–1016. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12836>
- Boyd, C. E., Davis, R. P., Wilson, A. G., Marcillo, F., Brian, S., & McNevin, A. A. (2021). Resource use in whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* farming in Ecuador. *Journal of the World Aquaculture Society*, 52(4), 772–788. <https://doi.org/10.1111/jwas.12818>
- Brown, M. N., Briones, A., Diana, J., & Raskin, L. (2013). Ammonia-oxidizing archaea and nitrite-oxidizing nitrospiras in the biofilter of a shrimp recirculating aquaculture system. *FEMS Microbiology Ecology*, 83(1), 17–25. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01448.x>
- Burford, M. A., Thompson, P. J., McIntosh, R. P., Bauman, R. H., & Pearson, D. C.

- (2003). Nutrient and microbial dynamics in high-intensity , zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Elsevier Science B.V*, 219, 393–411.
- Castro, G., Dosta, M. del C., & Castro, J. (2014). Presencia y abundancia de fitoplancton y zooplancton en un sistema de producción de Biofloc utilizando dos aportes de carbono: 1) Melaza y 2) Melaza + pulido de arroz cultivando al pez *Oreochromis niloticus*. *Revista Digital Del Departamento El Hombre y Su Ambiente*, 1(13), 33–42.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.025><http://dx.doi.org/10.1038/nature10402><http://dx.doi.org/10.1038/nature21059><http://journal.stainkudus.ac.id/index.php/equilibrium/article/view/1268/1127><http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2577>
- Central Institute of Brackishwater Aquaculture. (2016). Application of minerals in shrimp culture systems. In *CIBA* (Issue 32).  
[http://www.ciba.res.in/Books/Brochure 4.pdf](http://www.ciba.res.in/Books/Brochure%204.pdf)
- Che Hashim, N. F., Ghazali, N. A., Amin, N. M., Ismail, N., & Kasan, N. A. (2019). Characterization of Marine Biofloculant-producing Bacteria Isolated from Biofloc of Pacific Whiteleg Shrimp, *Litopenaeus vannamei* Culture Ponds. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 246(1).  
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/246/1/012007>
- Chim, L., Cardona, E., Lorgeoux, B., Gueguen, Y., Saulnier, D., Goguenheim, J., Wantiez, L., & Cahu, C. (2014). Biofloc technology applied to rear shrimp *Litopenaeus Stylirostris* broodstock: An integrated and development research project in New Caledonia and French Polynesia. *Europe Aquaculture Symposium, October 14-17, San Sebastian, Spain, December 2015*, 75.
- Chung, Y. C., Huang, C., & Ping, C. (2008). Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology Microbial oxidation of hydrogen sulfide with biofilter. *Journal of Environmental Science and Health* ., January 2013, 1263–1278.
- Cienfuegos, K., Monroy, M. del C., Hamdan, A., Castro, J., Aguirre, J., & Bustos, J. (2018). Effect of two probiotics on bacterial community composition from biofloc

system and their impact on survival and growth of tilapia (*Oreochromis niloticus*) Epidemiological studies on respiratory adenovirus. View project Functional foods (prebiotic, probiot. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 6(2), 525–533. <https://www.researchgate.net/publication/326019551>

Collazos, L., & Arias., J. (2015). Fundamentals of bioflocs technology ( BFT ). An alternative for fish farming in Colombia . A review . *Orinquia*, 19, 77–86.

Collins, A., Russell, B., Walls, A., & Hoang, T. (2005). Inland Prawn Farming: Studies into the Potential for Inland Marine Prawn Farming in Queensland. *Queensland the Smart State*. [http://era.daf.qld.gov.au/id/eprint/5756/1/Inland\\_prawn\\_farming\\_studies\\_into\\_the\\_potential\\_for\\_inland\\_marine\\_prawn\\_farming\\_in\\_Queensland\\_QI05051\\_2005\\_collins.pdf](http://era.daf.qld.gov.au/id/eprint/5756/1/Inland_prawn_farming_studies_into_the_potential_for_inland_marine_prawn_farming_in_Queensland_QI05051_2005_collins.pdf)

Coster, H. G. L., Steudle, E., & Zimmermann, U. (1977). Turgor Pressure Sensing in Plant Cell Membranes. *Plant Physiology*, 58(5), 636–643. <https://doi.org/10.1104/pp.58.5.636>

D'ors, A., Bartolomé, M. C., & Sánchez-Fortún, S. (2016). Repercussions of salinity changes and osmotic stress in marine phytoplankton species. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 175, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2016.04.004>

Dauda, A. B., Romano, N., Ebrahimi, M., Karim, M., Natrah, I., Kamarudin, M. S., & Ekasari, J. (2017). Different carbon sources affects biofloc volume, water quality and the survival and physiology of African catfish *Clarias gariepinus* fingerlings reared in an intensive biofloc technology system. *Fisheries Science*, 83(6), 1037–1048. <https://doi.org/10.1007/s12562-017-1144-7>

Deng, Y., Xu, X., Yin, X., Lu, H., Chen, G., Yu, J., & Ruan, Y. (2019). Effect of stock density on the microbial community in biofloc water and Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) gut microbiota. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(10), 4241–4252. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09773-4>

Donio, M., Viji, V., Jenifer, J., Velmurugan, S., Raman, K., Babu, M., & Citarasu, T.

- (2016). Antagonistic *Bacillus cereus* TC-1 Isolated from Solar Salt Work in Southern India. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 29(1), 27–31. <https://doi.org/10.3329/bjm.v29i1.28431>
- Effendy, I., Al Deen, S., & Chithambaran, S. (2016). Semi Intensive and Semi Biofloc Methods for the Culture of Indian White Prawn, *Fenneropenaeus indicus* in High-density Polyethylene Liner Ponds. *HAYATI Journal of Biosciences*, 23(3), 106–110. <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2016.06.004>
- Ekasari, J., Hanif Azhar, M., Surawidjaja, E. H., Nuryati, S., De Schryver, P., & Bossier, P. (2014). Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. *Fish and Shellfish Immunology*, 41(2), 332–339. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.09.004>
- El-Husseiny, O. M., Goda, A. M. A. E., Mabroke, R. S., & Soaudy, M. (2018). Complexity of carbon sources and the impact on biofloc integrity and quality in tilapia (*Oreochromis niloticus*) tanks. *AACL Bioflux*, 11(3), 846–855.
- Emerenciano, M. G., Martínez, L., Martínez, M., & Miranda, A. (2017). Biofloc Technology (BFT): A Tool for Water Quality Management in Aquaculture. In *Water Quality*. <https://doi.org/10.5772/66416>
- Emerenciano, Mauricio, Martínez, L., Martínez, M., & Miranda, A. (2017). Biofloc Technology (BFT): A Tool for Water Quality Management in Aquaculture. *Water Quality*. <https://doi.org/10.5772/66416>
- Emerenciano, Maurício, Gaxiola, G., & Cuzon, G. (2013). Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. *Intech*, i, 301–328. <https://doi.org/10.5772/53902>
- FAO. (2018). *Estado mundial de la pesca y la acuicultura*. 2018. <http://www.fao.org/3/i9540es/I9540ES.pdf>
- Feliatra, F., Hamdani, R., Lukystyowati, I., & Nurachmi, I. (2019). Sensitivity of heterotrophic bacteria in the low-salinity water areas and estuary in siak district toward pathogenic bacteria in fish. *International Journal of Microbiology*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7456410>

- Flaherty, M., & Vandergeest, P. (1998). "Low-salt" shrimp aquaculture in Thailand: Goodbye coastline, Hello Khon Kaen! *Environmental Management*, 22(6), 817–830. <https://doi.org/10.1007/s002679900150>
- Foes, G., Marchetti, I., & Rosas, V. (2021). *Assessing the effect of temperature on FCR in Pacific white shrimp cultured in biofloc systems*. September, 1–6.
- Gomes, F., Schweitzer, R., Da Fonseca, R., Do Nascimento, F., Manoel do Espírito Santo, C., & Quadros, W. (2016). Strategies for water preparation in a biofloc system: Effects of carbon source and fertilization dose on water quality and shrimp performance. *Aquacultural Engineering*, 74, 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2016.06.002>
- Guo, H., Huang, L., Hu, S., Chen, C., Huang, X., Liu, W., Wang, S., Zhu, Y., Zhao, Y., & Zhang, D. (2020). Effects of Carbon/Nitrogen Ratio on Growth, Intestinal Microbiota and Metabolome of Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Frontiers in Microbiology*, 11(April), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00652>
- Hargreaves, J. a. (2013). Biofloc Production Systems for Aquaculture. *Souther Regional Aquaculture Center*, 4503, 1–12. <https://srac.tamu.edu/>
- Hassan, M. (2023). *Effects of probiotics on ammonia degradation in vitro and in Pacific white shrimp ponds*. <https://www.globalseafood.org/advocate/effects-of-probiotics-on-ammonia-degradation-in-vitro-and-in-pacific-white-shrimp-ponds/>
- Hernandez, J. P., de-Bashan, L. E., Rodriguez, D. J., Rodriguez, Y., & Bashan, Y. (2009). Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. *European Journal of Soil Biology*, 45(1), 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.08.004>
- Hernandez, M., & Perez, C. (2012). Advances in Domestication and Culture Techniques for Crayfish *Procambarus acanthophorus*. In Z. Muchlisin (Ed.), *Aquaculture* (Zainak Muc, Issue April, pp. 217–240). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/28173>

- Hernández, M. (2014). Biofloc, a Technical Alternative for Culturing Malaysian Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Sustainable Aquaculture Techniques*. <https://doi.org/10.5772/57501>
- Ho, J. (2011). Multiphase modeling study for storm water solids treatment in experimental storm water settling chamber. *Water Science and Technology*, 63(12), 3020–3026. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.638>
- Hopkins, J. S., Hamilton, R. D., Sandier, P. A., Browdy, C. L., & Stokes, A. D. (1993). Effect of Water Exchange Rate on Production, Water Quality, Effluent Characteristics and Nitrogen Budgets of Intensive Shrimp Ponds. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24(3), 304–320. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1993.tb00162.x>
- Javier-Intriago, A. J., Quimi-Mujica, J. G., Risco-Cunayque, J. M., Lopez-Parra, J. J., Yalta-Mera, J. E., Bermudez-Basan, M. E., Lindo-Seminario, E. D., Lajones-Ruano, G. V., Sernaque de la Cruz, V. I., Dominguez-Mendoza, L. F., Martinez-Virnes, Z. E., Motte-Darricau, E., Cedeño-Escobar, V. A., & Mialhe-Matonnier, E. L. (2018). Metagenómica de la microbiota de juveniles del *Litopenaeus vannamei* inoculados con bacterias probióticas y patógenas Introducción El cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* , es una actividad de gran afectados por el síndrome EMS / AHPND , se carac. *Revista AquaTIC*, 51(1578–4541), 16–29.  
<http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/346>
- Kasan, N. A., Ghazali, N. A., Ikhwanuddin, M., & Ibrahim, Z. (2017). Isolation of potential bacteria as inoculum for biofloc formation in pacific whiteleg shrimp, *litopenaeus vannamei* culture ponds. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 20(6), 306–313. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2017.306.313>
- Khatoon, H., Banerjee, S., Guan Yuan, G. T., Haris, N., Ikhwanuddin, M., Ambak, M. A., & Endut, A. (2016). Biofloc as a potential natural feed for shrimp postlarvae. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 113, 304–309. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.04.006>
- Leal, S., Alejandra-medina, M., Alejandro-guerrero, M., Piña, P., & Nieves, M.

- (2013). *CONCENTRACIÓN Y COMPOSICIONES ORGÁNICA Y PROXIMAL DE DOS ESPECIES DE DIATOMEAS BENTÓNICAS A DIFERENTES SALINIDADES Concentration and organic and proximate compositions of two benthic diatoms species at different salinities*. 29(1), 45–52.
- Luna, A., AvilaLeal, J., Fierro, J., Alvarez, P., Esparza, H., Escamilla, R., Flores, M., Montiel, J., & Lopez, E. (2017). Effects of bacilli, molasses, and reducing feeding rate on biofloc formation, growth, and gene expression in *Litopenaeus vannamei* cultured with zero water exchange. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45(5), 900–907. <https://doi.org/10.3856/vol45-issue5-fulltext-4>
- Luo, G., Wang, J., Ma, N., Liu, Z., & Tan, H. (2016). Effects of inoculated *Bacillus subtilis* on geosmin and 2-methylisoborneol removal in suspended growth reactors using aquacultural waste for biofloc production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(8), 1420–1427. <https://doi.org/10.4014/jmb.1603.03043>
- Luo, L., Zhao, Z., Huang, X., Du, X., Wang, C., Li, J., Wang, L., & Xu, Q. (2016). Isolation, Identification, and Optimization of Culture Conditions of a Bioflocculant-Producing Bacterium *Bacillus megaterium* SP1 and Its Application in Aquaculture Wastewater Treatment. *BioMed Research International*, 2016, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/2758168>
- Ma, B., Wang, Y., Ye, S., Liu, S., Stirling, E., Gilbert, J. A., Faust, K., Knight, R., Jansson, J. K., Cardona, C., Röttjers, L., & Xu, J. (2020). *Earth microbial co-occurrence network reveals interconnection pattern across microbiomes*. 1–12.
- Maier, R. M. (2009). Bacterial Growth. In *Environmental Microbiology* (pp. 37–54). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.00003-1>
- Martinez, L., Martinez, M., Lopez, J., Campaña, A., Miranda, A., Ballester, E., & Porchas, M. (2010). Alimento natural en acuicultura: una revisión actualizada. In *Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México*.
- Martínez, M., & Vargas, F. (2017). Microbial metagenomics in aquaculture: a potential tool for a deeper insight into the activity. *Reviews in Aquaculture*, 9(1), 42–56. <https://doi.org/10.1111/raq.12102>

- Martínez, M., & Vargas, F. (2017). Microbial metagenomics in aquaculture: a potential tool for a deeper insight into the activity. In *Reviews in Aquaculture* (Vol. 9, Issue 1, pp. 42–56). <https://doi.org/10.1111/raq.12102>
- Mavingui, P., Combes, C., Normand, P., & Steinberg, C. (2015). *Microorganisms and Biotic Interactions*. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-9118-2>
- Megahed, M. E., & Mohamed, K. (2014a). Sustainable Growth of Shrimp Aquaculture Through Biofloc Production as Alternative to Fishmeal in Shrimp Feeds. *Journal of Agricultural Science*, 6(6). <https://doi.org/10.5539/jas.v6n6p176>
- Megahed, M. E., & Mohamed, K. (2014b). Sustainable Growth of Shrimp Aquaculture Through Biofloc Production as Alternative to Fishmeal in Shrimp Feeds. *Journal of Agricultural Science*, 6(6), 176–188. <https://doi.org/10.5539/jas.v6n6p176>
- Merchan, L., & Monserrate, M. (2014). *Dinámica del biofloc en cultivo intensivo de post-larva del camarón blanco Litopenaeus vannamei en sistemas de raceways*. [UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA]. [https://repositorio.upse.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/46000/1872/LILIANA\\_ANGELITA\\_MERCHÁN\\_PÉREZ.pdf](https://repositorio.upse.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/46000/1872/LILIANA_ANGELITA_MERCHÁN_PÉREZ.pdf)
- Mincomercioexterior. (2019). *Ecuador es el segundo exportador de camarón en el mundo*. 30419. <https://www.comercioexterior.gob.ec/ecuador-es-el-primer-exportador-de-balsa-y-segundo-exportador-de-camaron-en-el-mundo/>
- Mohd Yunos, F. H., Nasir, N. M., Wan Jusoh, H. H., Khatoon, H., Lam, S. S., & Jusoh, A. (2017). Harvesting of microalgae (*Chlorella* sp.) from aquaculture bioflocs using an environmental-friendly chitosan-based bio-coagulant. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 124, 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.07.016>
- Monroy-Dosta, M. del C., de Lara, R. A., Castro-Mejía, J., Castro-Mejía, G., & Coelho-Emerenciano, M. G. (2013). Microbiology community composition and abundance associated to biofloc in tilapia aquaculture. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 48(3), 511–520. <https://doi.org/10.4067/s0718->



19572013000300009

- Monroy, M. del carmen, De Lara, R., Castro, J., Castro, G., & Coelho, M. (2013). Composición y abundancia de comunidades microbianas asociados al biofloc en un cultivo de tilapia. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 48(3), 511–520. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572013000300009>
- Naylor, R. L., Goldberg, R. J., Mooney, H., Beveridge, M., Clay, J., Folke, C., Kautsky, N., Lubchenco, J., Primavera, J., & Williams, M. (1998). Nature's subsidies to shrimp and salmon farming. *Science*, 282(5390), 883–884. <https://doi.org/10.1126/science.282.5390.883>
- Nunes, A., & Fonseca, L. (2012). Settling Chambers Remove Suspended Solids , But Limit Biofloc In Shrimp System Prepared f resh at your kitchen by the farm . *Global Aquaculture Advocate*, October, 28–30. <https://www.globalseafood.org/advocate/settling-chambers-remove-suspended-solids-but-limit-biofloc-in-shrimp-system/>
- Oliveira, V., Pimentel, O. A., Oliveira, C., Santos, E., Pereira, A., Galvez, A., & Brito, L. (2022). Effect of ionic adjustment frequency in low-salinity water on zootechnical performance, water quality and mineral composition of *Litopenaeus vannamei* in a synbiotic nursery system. *Aquaculture*, 561, 738632. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738632>
- Otoshi, C. A., Rodriguez, N., & Moss, S. M. (2011). Establishing Nitrifying Bacteria In Super-Intensive Biofloc Shrimp Production. *Global Aquaculture Advocate*, June, 24–26. <http://pdf.gaalliance.org/pdf/GAA-Otoshi-May11.pdf>
- Panigrahi, A., Esakkiraj, P., Das, R. R., Saranya, C., Vinay, T. N., Otta, S. K., & Shekhar, M. S. (2021). Bioaugmentation of biofloc system with enzymatic bacterial strains for high health and production performance of *Penaeus indicus*. *Scientific Reports*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93065-3>
- Panigrahi, A., Saranya, C., Sundaram, M., Vinoth Kannan, S. R., Das, R. R., Satish Kumar, R., Rajesh, P., & Otta, S. K. (2018). Carbon: Nitrogen (C:N) ratio level variation influences microbial community of the system and growth as well as

- immunity of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in biofloc based culture system. *Fish and Shellfish Immunology*, 81(June), 329–337. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.07.035>
- Poli, M., Legarda, E., De Lorenzo, M., Martins, M., & do Nascimento Vieira, F. (2019). Pacific white shrimp and Nile tilapia integrated in a biofloc system under different fish-stocking densities. *Aquaculture*, 498, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.045>
- Prehn, J., Waul, C. K., Pedersen, L. F., & Arvin, E. (2012). Impact of water boundary layer diffusion on the nitrification rate of submerged biofilter elements from a recirculating aquaculture system. *Water Research*, 46(11), 3516–3524. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.03.053>
- Quimi, J. (2010). UTILIZACIÓN DE BACTERIAS ASOCIADAS AL PERIFITÓN DE SUBSTRATOS ARTIFICIALES EN EL SISTEMA DE CULTIVO DE CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*)". *UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA FACULTAD*, 1–23. [https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/845/1/QUIMI\\_MUJICA\\_JUAN-2010.pdf](https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/845/1/QUIMI_MUJICA_JUAN-2010.pdf)
- Rahman, A., Dabrowski, J., & McCulloch, J. (2020). Dissolved oxygen prediction in prawn ponds from a group of one step predictors. *Information Processing in Agriculture*, 7(2), 307–317. <https://doi.org/10.1016/j.inpa.2019.08.002>
- Ray, A. J., Lewis, B. L., Browdy, C. L., & Leffler, J. W. (2010). Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. *Aquaculture*, 299(1–4), 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.021>
- Ray, A. J., & Lotz, J. M. (2016). Estudiando el crecimiento de camarón en diferentes sistemas de biofloc. *Global Aquaculture Advocate*, 63(August 18), 1–5.
- Risco, J. (2019). Biotecnología aplicada a la domesticación de perifiton y biofloc nativo para el mejoramiento del cultivo de langostino, *Litopenaeus vannamei*. *Universidad Nacional de Tumbes*.

- Robles-Porchas, G. R., Gollas-Galván, T., Martínez-Porchas, M., Martínez-Cordova, L. R., Miranda-Baeza, A., & Vargas-Albores, F. (2020). The nitrification process for nitrogen removal in biofloc system aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 12(4), 2228–2249. <https://doi.org/10.1111/raq.12431>
- Rodríguez-núñez, K., Toledo, P., & Arias, S. (2015). *Aislamiento de dos especies de diatomeas con potencial acuícola ( Bacillariophyceae ) en el Pacífico de Costa Rica*. 8(1), 93–98.
- Roman, S., Tonolla, M., Storelli, N., Jacquet, S., & Zdobnov, E. M. (2021). *Microbial loop of a Proterozoic ocean analogue*.
- Roy, L. A., Davis, D. A., Saoud, I. P., & Henry, R. P. (2007). Supplementation of potassium, magnesium and sodium chloride in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in low salinity waters. *Aquaculture Nutrition*, 13(2), 104–113. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00460.x>
- Sakkaravarthi, K. (2015). Determination of Effective Microbial Community for Biofloc Shrimp Culture System. *Journal of Biological Sciences*, 3(1), 276–281. <https://doi.org/10.3923/jbs.2015.144.149>
- Sakkaravarthi, K., & Sankar, G. (2015). Identification of effective organic carbon for biofloc shrimp culture system. *Journal of Biological Sciences*, 15(3), 144–149. <https://doi.org/10.3923/jbs.2015.144.149>
- Salama, E., Kurade, M. B., Abou-shanab, R. A. I., & El-dalatony, M. M. (2017). Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79(May), 1189–1211. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.091>
- SALDARRIAGA, D. (1995). Acondicionamiento y manejo de estanques de langostino. In *Universidad Nacional de Tumbes*.
- Sanli, K., Bengtsson-Palme, J., Henrik Nilsson, R., Kristiansson, E., Rosenblad, M. A., Blanck, H., & Eriksson, K. M. (2015). Metagenomic sequencing of marine periphyton: Taxonomic and functional insights into biofilm communities. *Frontiers in Microbiology*, 6(OCT), 1–14.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01192>

- Sarker, M., Das, S. K., & Mondal, B. (2019). Comparative efficiency of biofloc and feed based culture of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Indian Journal of Animal Health*, 58(02), 203. <https://doi.org/10.36062/ijah.58.2.2019.203-212>
- Schveitzer, R., Arantes, R., Costódio, P. F. S., do Espírito Santo, C. M., Arana, L. V., Seiffert, W. Q., & Andreatta, E. R. (2013). Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. *Aquacultural Engineering*, 56, 59–70. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2013.04.006>
- Shan, H., & Obbard, J. P. (2001). Ammonia removal from prawn aquaculture water using immobilized nitrifying bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(5–6), 791–798. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0835-1>
- Suantika, G., Situmorang, M., Aditiawati, P., & Astuti, D. I. (2018). Development of a Zero Water Discharge (ZWD) – Recirculating Aquaculture System (RAS) Hybrid System for Super Intensive White Shrimp ( *Litopenaeus vannamei* ) Culture under Low Salinity Conditions and Its Industrial Trial in Commercial Shrimp Urban Farming . *Aquacultural Engineering*, 82(May), 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.04.002>
- Suguna, T. (2020). Application of Minerals in Low Saline Water Culture Systems of *L. vannamei*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9(9), 516–521. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.909.065>
- Tepaamorndech, S., Nookaew, I., Higdon, S. M., Santiyanont, P., Phromson, M., Chantarasakha, K., Mhuantong, W., Plengvidhya, V., & Visessanguan, W. (2020). Metagenomics in bioflocs and their effects on gut microbiome and immune responses in Pacific white shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 106(August), 733–741. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.08.042>
- Tierney, T. W., & Ray, A. J. (2018). Comparing biofloc, clear-water, and hybrid nursery systems (Part I): Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production, water quality, and stable isotope dynamics. *Aquacultural Engineering*, 82(June), 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.06.002>

- Trombetta, T., Vidussi, F., Roques, C., & Scotti, M. (2020). Marine Microbial Food Web Networks During Phytoplankton Bloom and Non-bloom Periods : Warming Favors Smaller Organism Interactions and Intensifies Trophic Cascade. *Frontiers in Microbiology*, 11(October), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.502336>
- Trung, T. S., Huyen, N. T. K., Minh, N. C., Le Trang, T. T., & Han, N. T. (2016). Optimization of harvesting of microalgal *Thalassiosira pseudonana* biomass using chitosan prepared from shrimp shell waste. *Asian Journal of Agricultural Research*, 10(5), 162–174. <https://doi.org/10.3923/ajar.2016.162.174>
- Valenzuela-Jiménez, M., Aguilera-Rivera, D., Wasielesky, W., Hernández-López, I., Rodríguez-Fuentes, G., Durruty-Lagunes, C., Cuzon, G., & Gaxiola, G. (2021). The effect of biofloc and clear water at low and high salinity concentration on growth performance and antioxidant response of wild juveniles of atlantic white shrimp *penaeus setiferus*. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 49(3), 451–464. <https://doi.org/10.3856/vol49-issue3-fulltext-2513>
- Valenzuela-Madrigal, I. E., Valenzuela-Quiñónez, W., Esparza-Leal, H. M., Rodríguez-Quiroz, G., & Aragón-Noriega, E. A. (2017). Efecto de la composición iónica sobre el crecimiento y la supervivencia de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* cultivado en agua de pozo de baja salinidad. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 52(1), 103–112. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572017000100008>
- Vásquez N, C. M. (2019). Universidad Nacional De Tumbes Facultad De Ciencias Sociales. *Universidad Nacional de Tumbes*, 1–40. <http://repositorio.untumbes.edu.pe/handle/UNITUMBES/1486>
- Vega-Villasante, F., Martínez-López, E. A., Espinosa-Chaurand, L. D., Cortés-Lara, M. C., & Nolasco-Soria, H. (2011). Crecimiento y supervivencia del langostino (*macrobrachium tenellum*) en cultivos experimentales de verano y otoño en la costa tropical del pacífico mexicano. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14(2), 581–588.
- Windows, M., Os, M., When, C. P., Wei, Y., Yildirim, P., den Bulte, C., Dellarocas,

C., Weekly, T., Weekly, I. C. T. I., W. E. Henley, Vyas, S. D., Uk, T., Trend, S., Trend, F. S., Technology, B., Insights, F., Longtop, A., Technologies, F., Tan, A., ... Accenture. (2014). No Title No Title. *Uma Ética Para Quantos?*, XXXIII(2), 81–87. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

## VIII. ANEXOS

### Anexo 1. Siembra de bacteria

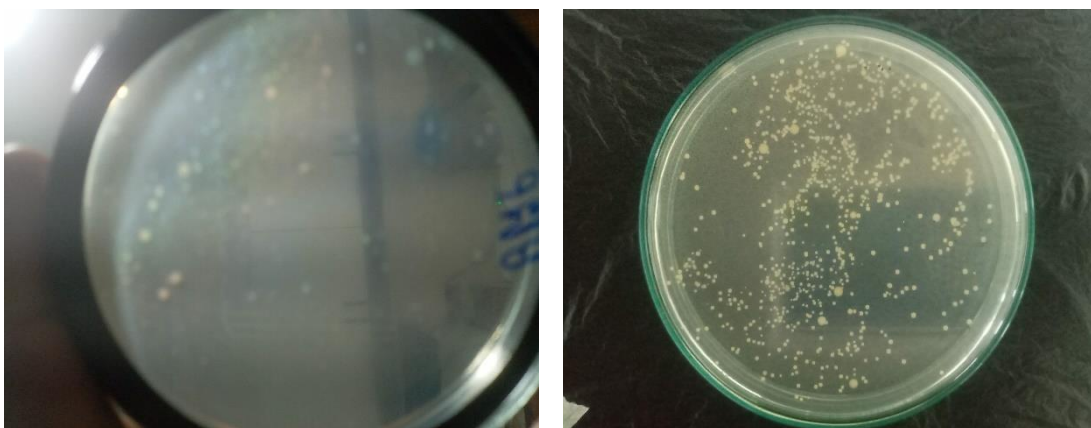


## Anexo 2. Aclimatación de microalgas en Laboratorio

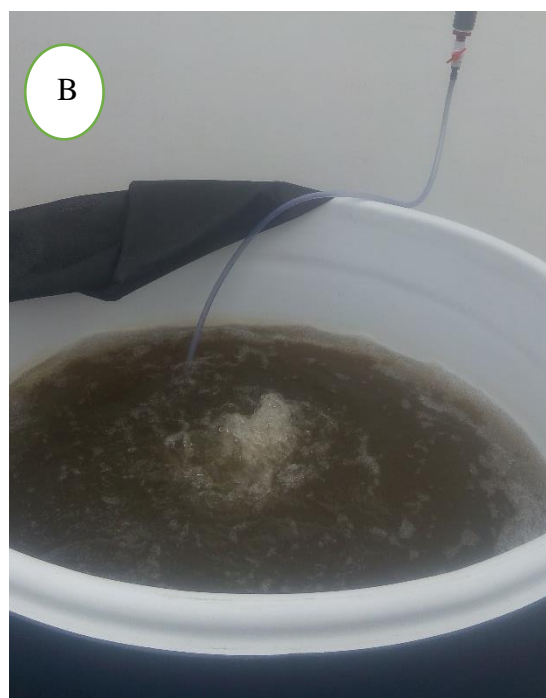




Anexo 3. Placas de *Bacillus cereus* con crecimiento a las 8 horas y a las 100 horas.



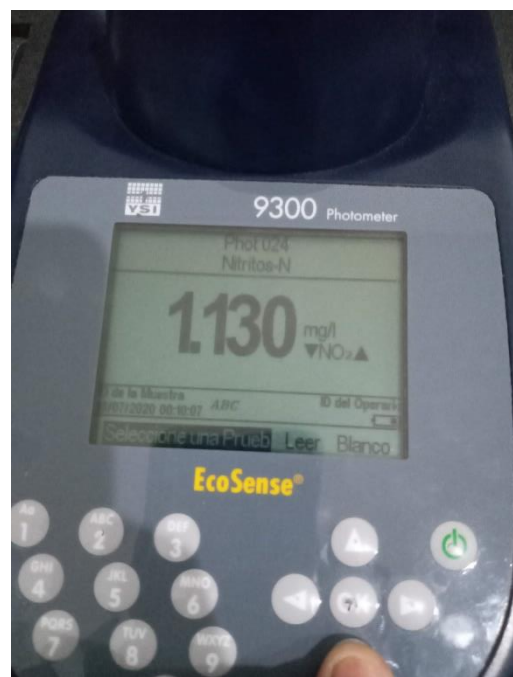
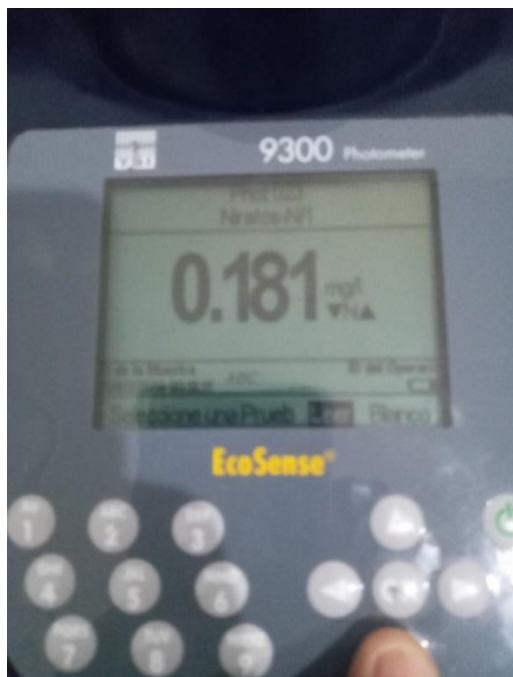
Anexo 4. A) Biofloc recién sembrado B) Biofloc madurado por 6 días.



Anexo 5. A ) Langostinos antes de la siembra, B) Langostinos a los 8 días de sembrados, C) Langostinos de 15 días de sembrado.



Anexo 6. Medición de nitrógenos en el fotómetro YSI 9300.



## Anexo 7. Procesamiento de muestras para metagenómica



## Anexo 8. Flóculo en conos de Inhoff



Anexo 9. Campos del microscopio observando flóculos a los 10 X de aumento

