

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO

**MAESTRIA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
MOLECULAR**



**Análisis metagenómico de la abundancia y persistencia de
bacterias y microalgas probióticas inoculadas en un cultivo RAS-
BIOFLOC a baja salinidad, en agua e intestino de *Litopenaeus
vannamei***

TESIS

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

Autora: Elsie Ela Arroyo Landazuri

Tumbes, 2024

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRIA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR



Análisis metagenómico de la abundancia y persistencia de bacterias y microalgas probióticas inoculadas en un cultivo RAS-BIOFLOC a baja salinidad, en agua e intestino de *Litopenaeus vannamei*

Tesis aprobada en forma y estilo por:

Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila (presidente)

Mg. Paul Ricardo Noblecilla Retamozo (secretario)

Ph. D. Benoit Mathieu Diringer (vocal)

Tumbes, 2024

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRIA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR



Análisis metagenómico de la abundancia y persistencia de bacterias y microalgas probióticas inoculadas en un cultivo RAS-BIOFLOC a baja salinidad, en agua e intestino de *Litopenaeus vannamei*

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

Br. Elsie Ela Arroyo Landazuri (autora)

Ph.D. Virna Cedeño Escobar (asesora)

M.Sc. Dámaris Esquén Bayona (co-asesora)

Tumbes, 2024

ACTA DE SUSTENTACIÓN



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

Año del Bicentenario, de la consolidación de nuestra Independencia, y de la conmemoración de las Heroicas Batallas de Junín y Ayacucho

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

En Tumbes, a los veintiséis días del mes de enero del dos mil veinticuatro, siendo las diez horas y cinco minutos, en la modalidad virtual (link, <https://meet.google.com/quq-obqz-sfe>) se reunieron el jurado calificador de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes designado con 155-2022/UNTUMBES-EPG-D (25 de marzo de 2022), Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila (presidente), Mtro. Paul Ricardo Noblecilla Retamozo (secretario), y el Ph.D. Benoit Mathieu Diringer (vocal), se procedió a evaluar, calificar y deliberar la sustentación de tesis titulada: **ANÁLISIS METAGENÓMICO DE LA ABUNDANCIA Y PERSISTENCIA DE BACTERIAS Y MICROALGAS PROBIÓTICAS INOCULADAS EN UN CULTIVO RAS-BIOFLOC A BAJA SALINIDAD, EN AGUA E INTESTINO DE *Litopenaeus vannamei***, para optar el grado académico de **MAESTRO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**, presentado por la :

Maestranda: ELSIE ELA ARROYO LANDAZURI

Concluida la sustentación y absueltas las preguntas, por parte la 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 (la): Maestranda **ELSIE ELA ARROYO LANDAZURI**, aprobada con calificativo de **MUY BUENA**

En consecuencia, queda apta, 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 TUO del estatuto, Reglamento General, Reglamento General de Grados Títulos y Reglamento de Tesis de la Universidad Nacional de Tumbes.

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

Tumbes, 26 de enero de 2024

Dr. DAVID EDILBERTO SALDARRIAGA YACILA
DNI N°: 00320699
ORCID N° 0000-0001-8870-2020
Presidente

Mtro. PAUL RICARDO NOBLECILLA RETAMOZO
DNI N° 00113722
ORCID N° 0000-0003-1901-7462
Secretario

Ph.D. BENOIT MATHIEU DIRINGER
C.E. N°: 000727051
ORCID N° 0000-0001-6129-1751
Vocal

INFORME TURNITIN

Análisis metagenómico de la abundancia y persistencia de bacterias y microalgas probióticas inoculadas en un cultivo RAS-BIOFLOC a baja salinidad, en agua e intestino de *Litopenaeus vannamei*

por Elsie Ela ARROYO LANDAZURI

Fecha de entrega: 11-oct-2023 08:56a.m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega: 2192457744
Nombre del archivo: ELITA_ARROYO_TESIS.docx (4.32M)
Total de palabras: 17786
Total de caracteres: 100522



Ph.D. Virna Cedeño Escobar
Asesora del Proyecto de Tesis

Análisis metagenómico de la abundancia y persistencia de bacterias y microalgas probióticas inoculadas en un cultivo RAS-BIOFLOC a baja salinidad, en agua e intestino de *Litopenaeus vannamei*

INFORME DE ORIGINALIDAD

10% INDICE DE SIMILITUD	9% FUENTES DE INTERNET	3% PUBLICACIONES	2% TRABAJOS DEL ESTUDIANTE
-----------------------------------	----------------------------------	----------------------------	--------------------------------------

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
2	agrotendencia.tv Fuente de Internet	1%
3	repositorio.untumbes.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	docplayer.es Fuente de Internet	<1%
5	cienciaspecuarias.inifap.gob.mx Fuente de Internet	<1%
6	posgrado.bdelrio.tecnm.mx Fuente de Internet	<1%
7	biblioteca.itson.mx Fuente de Internet	<1%
8	repositorio.espe.edu.ec Fuente de Internet	<1%



9	cibnor.repositorioinstitucional.mx Fuente de Internet	<1 %
10	acervodigital.ufpr.br Fuente de Internet	<1 %
11	real-j.mtak.hu Fuente de Internet	<1 %
12	www.globalseafood.org Fuente de Internet	<1 %
13	www.scielo.org.pe Fuente de Internet	<1 %
14	repositorio.concytec.gob.pe Fuente de Internet	<1 %
15	repositorio.xoc.uam.mx Fuente de Internet	<1 %
16	revistaaquatic.com Fuente de Internet	<1 %
17	revistabiociencias.uan.edu.mx Fuente de Internet	<1 %
18	www.scielo.org.mx Fuente de Internet	<1 %
19	Submitted to Universidad Catolica de Oriente Trabajo del estudiante	<1 %
20	sedici.unlp.edu.ar Fuente de Internet	<1 %



A handwritten signature in blue ink is written over a circular stamp. The stamp contains the text 'F.C.D.' in a stylized font.

21	www.dspace.espol.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
22	www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar Fuente de Internet	<1 %
23	CARLOS MAGNO DA COSTA, Fernanda Cavalcante. "DIAGNÓSTICO DA QUALIDADE DA ÁGUA UTILIZADA PARA O CONSUMO HUMANO NA CIDADE DE AREIA BRANCA/RN", Editora Cientifica Digital, 2022 Publicación	<1 %
24	repositorio.unal.edu.co Fuente de Internet	<1 %
25	Submitted to BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA BIBLIOTECA Trabajo del estudiante	<1 %
26	colposdigital.colpos.mx:8080 Fuente de Internet	<1 %
27	es.scribd.com Fuente de Internet	<1 %
28	investigacionyposgrado.ues.mx Fuente de Internet	<1 %
29	patents.google.com Fuente de Internet	<1 %
30	repositorio.upse.edu.ec Fuente de Internet	<1 %

31	www.jove.com Fuente de Internet	<1 %
32	www.slideshare.net Fuente de Internet	<1 %
33	repositorio.unp.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
34	repositoriotec.tec.ac.cr Fuente de Internet	<1 %
35	Submitted to Universidad Nacional de Tumbes Trabajo del estudiante	<1 %
36	digibuo.uniovi.es Fuente de Internet	<1 %
37	ipicyt.repositorioinstitucional.mx Fuente de Internet	<1 %
38	oa.upm.es Fuente de Internet	<1 %
39	repositorio.uwiener.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
40	worldwidescience.org Fuente de Internet	<1 %
41	biblioteca.usac.edu.gt Fuente de Internet	<1 %



ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUCCIÓN.....	17
2. REVISIÓN DE LITERATURA	20
2.1. Bases teóricas.....	20
2.1.1. Descripción de la especie <i>L. vannamei</i>	20
2.1.2. Sistema súper intensivo híbrido RAS – BIOFLOC	20
2.2. Antecedentes	23
2.3. Términos básicos.....	25
2.3.1. Sistema de cultivo extensivo	25
2.3.2. Sistema de cultivo semi-intensivo.....	25
2.3.3. Sistema de cultivo intensivo.....	26
2.3.4. Sistema de cultivo super-intensivo	26
2.3.5. Bacterias heterotróficas.....	26
2.3.6. Bacterias autotróficas	26
2.3.7. Zooplancton.....	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. Lugar y período de investigación	28
3.2. Modulo escala sistema híbrido RAS - BIOFLOC.....	29
3.3. Detección de genes antimicrobianos en las cepas bacterianas <i>Bacillus</i>	30
3.4. Establecimiento de biofloc madre	31
3.5. Medición de parámetros físico-químicos.....	32
3.6. Siembra e inoculación de biofloc madre en el agua de cultivo RAS-BIOFLOC ..	32
3.7. Siembra de postlarvas y fases de cultivo	32
3.8. Análisis metagenómico de las poblaciones bacterianas y microalgales	33
3.8.1. Recolección de muestras	33
3.8.2. Extracción de ADN	33
3.8.3. PCR dirigidas a genes ARNr 16S y 23S.....	34
3.8.4. Secuenciación NGS por tecnología nanoporos MinION	35
3.8.5. Análisis bioinformáticos	37
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
4.1. Identificación de genes de biosíntesis de péptidos antimicrobianos.....	39
4.2. Parámetros físico - químicos	40
4.3. Maduración de biofloc y fases de cultivo	42

4.3.1.	Fase de cría (primer mes de cultivo)	42
4.3.2.	Fase de levante (segundo mes de cultivo).....	42
4.3.3.	Fase de engorde (tercer mes de cultivo)	43
4.4.	Análisis metagenómico de las poblaciones bacterianas de agua e intestino.	44
4.4.1.	Diversidad alfa en muestras de agua e intestino.....	49
4.5.	Análisis metagenómico de las poblaciones microalgales de agua e intestino. ...	50
4.6.	Efecto del ambiente de crianza sobre la microbiota intestinal del camarón	56
5.	CONCLUSIONES.....	61
6.	RECOMENDACIONES.....	63
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
	ANEXOS	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Prueba de PCR para genes antimicrobianos: Bacilisina (<i>bacA</i>), Subtilina (<i>spaS</i>) y Surfactina (<i>srfAA</i>) y Lactonasa (<i>aiiA</i>).....	40
Tabla 2: Índices de diversidad alfa Shannon y Simpson en muestras de agua e intestino.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de ubicación del área de ensayo.	28
Figura 2. Esquema representativo del sistema híbrido RAS - BIOFLOC a modulo escala.	29
Figura 3: Parámetros físico-químicos del agua durante el ciclo de cultivo en el sistema superintensivo RAS-biofloc de <i>L. vannamei</i> a baja salinidad.....	41
Figura 4: Coloración del agua y niveles de floculación durante fases de cultivo en el sistema superintensivo RAS-Biofloc.	43
Figura 5: Diversidad bacteriana a nivel de Filo en muestras de agua e intestinos de <i>L. vannamei</i> en el sistema RAS-Biofloc	45
Figura 6: Diversidad bacteriana a nivel de género en muestras de agua e intestinos de <i>L. vannamei</i> en el sistema RAS-Biofloc	47
Figura 7: Diversidad bacteriana a nivel de especie en muestras de agua e intestinos de <i>L. vannamei</i> en el sistema RAS-Biofloc	49
Figura 8: Diversidad microalgal a nivel de género en muestras de agua e intestinos de <i>L. vannamei</i> en el sistema RAS-Biofloc	54
Figura 9: Diversidad microalgal a nivel de especie en muestras de agua e intestinos de <i>L. vannamei</i> en el sistema RAS-Biofloc	56
Figura 10: Análisis de componente principal (PCA) de comunidades bacterianas en agua e intestinos de <i>L. vannamei</i> de un sistema RAS-Biofloc	58
Figura 11: Análisis de componente principal (PCA) de comunidades microalgales en agua e intestinos de <i>L. vannamei</i> de un sistema RAS-Biofloc.....	60

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Modulo escala sistema súper intensivo hibrido RAS – BIOFLOC a baja salinidad. Laboratorio Centro De Biotecnología Acuícola Sostenible (CBAS).	79
Anexo 4: Producción de microalgas en el laboratorio Centro De Biotecnologías Omicas (CEBIOMICS).....	80
Anexo 5: Inoculación de Biofloc madre.....	81
Anexo 6: Inoculación de Biofloc madre en el agua de cultivo Ras-Biofloc y siembra de larvas.....	81
Anexo 7: Recolección y procesamiento de muestras.....	82
Anexo 8: Extracción y migración de ADN de las muestras de agua de cultivo e intestinos de <i>L. vannamei</i>	82
Anexo 9: Preparación de librerías y secuenciación por nanoporos.	83

RESUMEN

La intensificación del cultivo de *Litopenaeus vannamei* es posible integrando sistemas de recirculación de agua (RAS) con biofloc para mejorar la calidad del agua y aportar valor nutricional. Sin embargo, la proliferación aleatoria de microorganismos no garantiza resultados reproducibles. Este trabajo tuvo como objetivo analizar por metagenómica la abundancia y persistencia de bacterias probióticas y microalgas inoculadas en un cultivo RAS-BIOFLOC a baja salinidad con fases Cría (fC), Levante (fL) y Engorde (fE). El biofloc fue formulado con seis bacterias (*Bacillus subtilis*, *B. subsps. subtilis*, *B. subsps. inaquosorum*, *B. cereus*, *B. cereus* ATCC14579 y *B. lincheniformis*) y diez microalgas (*Thalassiosira weissflogii*, *T. pseudonana*, *Chaetoceros gracilis*, *C. calcitrans*, *Navicula cryptocephala*, *N. glaciei*, *N. Perminuta*, *Ghomphoneis minuta*, *Isochrysis galbana* y *Pavlova gryans*). Se muestrearon intestinos y agua antes de la siembra de larvas (aS) y al final de cada fase. Las bacterias y microalgas inoculadas persistieron, en agua e intestino durante el cultivo. Los intestinos aS revelaron un 1,5% de las bacterias inoculadas y un predominio de las microalgas *C. calcitrans* (55,2%), *T. weissflogii* (15,9%), *C. gracilis* (13%) y *T. pseudonana* (10,7%). *B. subtilis* mostró la abundancia relativa más alta en agua (aS: 6,6%; fL: 11,6%; fE: 14,2%) e intestino (fC 12%; fL: 14,3% y fE: 15,3%) seguida por *B. subs. subtilis*, (5,8±0,8% y 7,9 ±0,5%) las restantes cepas por debajo del 4%, excepto fC donde predominaron especies nitrificantes *Pseudomonas* (28,8%). Las microalgas más abundantes en agua fueron *G. minuta* (41,5±3,1%), *N. perminuta* (27±2%) y *T. weissflogii* (11,8±2,9%) y en intestinos *N. perminuta* (36,1±9,4%), *I. galbana* (21,4±3,5%), *G. minuta* (19,3±8,3%) y las restantes especies por debajo del 6%. Los resultados sugieren que las bacterias *B. subtilis*, *B. subsps. Subtilis* y las microalgas *G. minuta*, *N. perminuta*, *T. weissflogii* e *I. galbana* son buenas candidatas para inoculaciones de sistemas RAS-BIOFLOC a baja salinidad.

PALABRAS CLAVE: Bacterias probióticas, *Litopenaeus vannamei*, metagenómica, microalgas, nanoporo, RAS-BIOFLOC.

ABSTRACT

Intensification of *Litopenaeus vannamei* cultivation is possible by integrating water recirculation systems (RAS) with biofloc to improve water quality and provide nutritional value. However, random proliferation of microorganisms does not guarantee reproducible results. This work aimed to analyze by metagenomics the abundance and persistence of probiotic bacteria and microalgae inoculated in a RAS-BIOFLOC culture at low salinity with Breeding (fC), Lifting (fL) and Fattening (fE) phases. The biofloc was formulated with six bacteria (*Bacillus subtilis*, *B. subsps. subtilis*, *B. subsps. inaquosorum*, *B. cereus*, *B. cereus* ATCC14579 and *B. licheniformis*) and ten microalgae (*Thalassiosira weissflogii*, *T. pseudonana*, *Chaetoceros gracilis*, *C. calcitrans*, *Navicula cryptocephala*, *N. glaciei*, *N. Perminuta*, *Ghomphoneis minuta*, *Isochrysis galbana* and *Pavlova gryans*). Intestines and water were sampled before larval sowing (aS) and at the end of each phase. The inoculated bacteria and microalgae persisted in water and intestine during culture. The aS intestines revealed 1,5% of the inoculated bacteria and a predominance of the microalgae *C. calcitrans* (55,2%), *T. weissflogii* (15,9%), *C. gracilis* (13%) and *T. pseudonana* (10,7%). *B. subtilis* showed the highest relative abundance in water (aS: 6,6%; fL: 11,6%; fE; 14,2%) and intestine (fC 12%; fL; 14,3% and fE; 15,3%) followed by *B. subs. subtilis*, ($5,8 \pm 0,8\%$ and $7,9 \pm 0,5\%$) the remaining strains below 4%, except fC where *Pseudomonas* nitrifying species predominated (28,8%). The most abundant microalgae in water were *G. minuta* ($41,5 \pm 3,1\%$), *N. perminuta* ($27 \pm 2\%$) and *T. weissflogii* ($11,8 \pm 2,9\%$) and in intestines *N. perminuta* ($36,1 \pm 9,4\%$), *I. galbana* ($21,4 \pm 3,5\%$), *G. minuta* ($19,3 \pm 8,3\%$) and the remaining species below 6%. The results suggest that the bacteria *B. subtilis*, *B. subsps. subtilis* and the microalgae *G. minuta*, *N. perminuta*, *T. weissflogii* and *I. galbana* are good candidates for inoculations of RAS-BIOFLOC systems at low salinity.

KEY WORDS: *Litopenaeus vannamei*, metagenomics, microalgae, nanopore, probiotic bacteria, RAS-BIOFLOC.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarón blanco *L. vannamei* es un recurso acuícola de gran importancia económica a nivel mundial. Su producción se basa en cultivos extensivos (5 a 10 camarones/m²), semi – intensivos (10-30 camarones/m²) e intensivos (30 a 60 camarones/m²) (Aguilar, 2018), mayoritariamente en agua de alta salinidad, requiriendo grandes superficies cercanas al mar con impactos ambientales negativos debido a la descarga de efluentes (Maicá *et al.*, 2014).

Sistemas super intensivos (300 a 500 camarones/m³) que integran la recirculación del agua (RAS) con la tecnología biofloc, que promueve la formación de conglomerados de microorganismos y materia orgánica (flóculos), han surgido como una alternativa para cultivos en alta y baja salinidad (Suantikaa *et al.*, 2018 y Emerenciano *et al.*, 2013). Este sistema híbrido, RAS-BIOFLOC, conduce a cultivos ecoamigables al reducir el impacto ambiental, mejorar la eficiencia del uso de tierra, reducir o anular el recambio de agua y potenciar la productividad y la bioseguridad (Zafar y Rana, 2022).

En los flóculos las poblaciones bacterianas y microalgales representan los grupos más determinantes aportando proteína, como fuente de vitamina y fósforo, a más de mejorar la calidad del agua e inmovilizar nitrógeno tóxico (Ferreira *et al.*, 2015 y Garibay *et al.*, 2019). Sin embargo, un inconveniente que enfrenta el biofloc es la dificultad para hacer proliferar la comunidad microbiana de manera predecible y reducir así los riesgos de aparición de patógenos por la proliferación espontánea (Cardona *et al.*, 2016).

En este sentido, un paso crucial en la estabilización del sistema es la domesticación de los microorganismos que integran los flóculos para potenciar la colonización del agua e intestinos de los animales cultivados con bacterias probióticas y microalgas

de alto valor nutricional y capaces de inducir la formación de flóculos (Jiménez *et al.*, 2021).

Dentro de los grupos bacterianos, varias especies del género *Bacillus*, que incluyen a *B. subtilis*, *B. lincheniformis* y *B. cereus*, presentan genes claves para la biosíntesis de péptidos antimicrobianos (AMP por sus siglas en inglés) que incluyen a *spaS* (prepéptido de subtilina), *bacA* (proteína de biosíntesis de bacilisina), *srfAA* (subunidad 1 de surfactina) y *aiiA* (N-acil homoserina lactonasa) (Sumi *et al.*, 2015; Intriago *et al.*, 2018; Mora *et al.*, 2011 y Feria *et al.*, 2004); Por otra parte, algunas microalgas, como las diatomeas *Isochrysis* y *Pavlova*, tienen la capacidad de sintetizar exopolisacáridos (EPS) lo que les confiere una propiedad de adherencia a las superficies de las células permitiendo la unión entre microalgas, bacterias y otras partículas (Thornton, 2002; Sanka *et al.*, 2017; Daglio *et al.*, 2018).

A más de esta característica aglutinante varias especies de microalgas son altamente benéficas por su elevado contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos, proveyendo un aporte nutricional suplementario que repercute en la reducción de las raciones de piensos comerciales (Jiménez *et al.*, 2021). Cabe resaltar que varias de estas especies bacterianas y microalgales participan en los procesos de nitrificación contribuyendo a mantener concentraciones adecuadas de compuestos nitrogenados en la columna de agua (Roy y Pal, 2015; Quijano *et al.*, 2017; Xu y Pan, 2013).

El establecimiento y mantenimiento de un biofloc domesticado, a través de la inoculación de cepas bacterianas probióticas y microalgas benéficas, requieren una evaluación de las dinámicas de microorganismos presentes en el sistema de producción. Los enfoques que dependen de cultivo presentan limitaciones para caracterizar la población microbiana completa, estimándose que revelan únicamente cerca del 0,1% (Zhou *et al.*, 2019).

Por el contrario, los genes de ARN ribosomal microbiano, ARNr 16S y 23S, pueden ser detectados y secuenciados directamente del agua o del biofloc sin necesidad del cultivo utilizando la metagenómica basada en la secuenciación de próxima generación (NGS) superando así, las limitaciones de las técnicas dependientes de cultivo (Siew *et al.*, 2023; Hatfiel *et al.*, 2020).

En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo analizar por metagenómica dirigida a los genes de ARNr 16S y 23S, con secuenciación de nanoporos, la abundancia y persistencia de bacterias y microalgas de un biofloc domesticado utilizado en un sistema trifásico intensivo híbrido RAS-BIOFLOC de *L. vannamei*, a baja salinidad, a partir de una colección de bacterias y microalgas previamente aisladas, caracterizadas y seleccionadas por sus características probióticas, nutricionales y aglutinantes.

CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Bases teóricas

2.1.1. Descripción de la especie *L. vannamei*.

L. vannamei es un artrópodo perteneciente a la clase crustácea, es un organismo mandibulado con apéndices articulados, con dos pares de antenas, branquias, caparazón y posee un gran potencial reproductivo, pudiendo llegar a desovar las hembras hasta un millón de huevos (Baley-Brock y Moss, 1992). Esta especie de camarón es nativo de la costa oriental del Océano Pacífico, se encuentra en hábitats marinos tropicales, es una especie que tolera una temperatura de 28 a 34 °C y niveles de oxígeno de 5 a 7 mg/l, una salinidad optima entre 15 a 25 ppm y el pH adecuado es de 7.5 a 8.5 (Dugassa y Gaetan, 2018).

2.1.2. Sistema súper intensivo híbrido RAS – BIOFLOC

El sistema híbrido RAS - BIOFLOC consiste en la combinación del sistema de recirculación de agua (RAS) y el sistema de descarga de agua cero o Biofloc (TBF) (Suantikaa *et al.*, 2018 y Thornber *et al.*, 2020). Los RAS, son sistemas de producción súper intensiva, generalmente basados en tanques interiores con un ambiente "controlado", que logran altas tasas de reutilización del agua mediante filtración biológica, mecánica y otros pasos de tratamiento (Holan y Powell, 2020).

Por otro lado, la tecnología de BIOFLOC es un sistema de producción súper intensivo con bajo o nulo recambio de agua (Azim y Little, 2008). Esta tecnología conlleva la mezcla de algas, bacterias (heterótrofas y autótrofas), protozoos, zooplancton, nematodos y materia orgánica particulada (heces y alimentos no consumidos). Todos estos microorganismos juntos forman un ecosistema integrado llamado floculo el cual es consumido por los animales (Wei *et al.*, 2020). Aunque el costo operativo para mantener la calidad del agua en un sistema biofloc es relativamente bajo comparado con RAS, la capacidad de carga de materia orgánica en el sistema no es lo suficientemente tolerante como para soportar un largo

período de cultivo super intensivo de camarón sin recambios; es por ello, que la utilización de ambos sistemas utilizando una tecnología híbrida que permita complementar las ventajas de cada sistema es mucho más viable (Suantika *et al.*, 2018).

a) Función de microorganismos en la tecnología RAS – BIOFLOC

Los microorganismos juegan un papel importante en este sistema ya que son los encargados de reciclar y convertir los desechos y nutrientes que se acumulan en el tanque en una rica fuente natural de proteína-lípido disponible todo el día, los microbios comunes asociados con los flóculos son bacterias heterotróficas, autotróficas, microalgas, protozoos, etc. Estos contribuyen de tres formas principales: 1) nutrición, 2) control de patógenos, y 3) mejora de la calidad del agua mediante la remoción de compuestos nitrogenados (De Schryver *et al.*, 2008).

Las bacterias son fundamentales en la formación de los flóculos al ser capaces de unirse a un sustrato diminuto que puede ser el esqueleto de una diatomea o trozo de heces y segregar un exopolisacárido pegajoso donde se une el fitoplancton; luego se adhieren a esta superficie protozoos como vorticelas, rotíferos, etc. Finalmente, el pequeño grumo se ha convertido en un flóculo altamente nutritivo el cual puede ser ingerido por los camarones (Bioaquafloc, 2018).

b) Bacterias probióticas

Las bacterias probióticas son microorganismos vivos que cuando son ingeridos en la dieta y administrados en las cantidades adecuadas confieren beneficios para la salud del consumidor, las bacterias probióticas conocidas en su mayoría son pertenecientes al grupo *Bacillus sp* (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, etc). Estas bacterias básicamente contienen su potencial probiótico en su genoma, donde codifican genes específicos que las hacen particulares para algunas funciones (Durango, 2017). Entre los genes con potencial probiótico más conocidos se pueden mencionar *spaS* (pre péptido de subtilina), *bacA* (proteína de biosíntesis de bacilisina), *srfAA* (subunidad 1 de

surfactina) y *aiiA* (N-acil homoserina lactonasa) (Sumi *et al.*, 2015; Intriago *et al.*, 2018; Mora *et al.*, 2011 y Feria *et al.*, 2004).

c) Microalgas

Las microalgas son organismos unicelulares, eucariotas, fotoautótrofos (obtienen la energía de la luz proveniente del sol) y se desarrollan a partir de materia inorgánica. Juegan un papel fundamental en la cadena alimentaria acuática y se utilizan comúnmente en la cría de animales acuáticos como moluscos, camarones y peces en diferentes etapas de crecimiento; son necesarios para la nutrición de las larvas durante un breve período del ciclo de vida y se utilizan para el consumo directa o indirectamente como alimento, ya que varias microalgas contienen alto contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos (Roy y Pal, 2015).

Renaud *et al.*, 1994 reportó el contenido de carbohidratos de doce especies de microalgas perteneciente a *Bacillariophyceae*, *Chlorophyceae*, *Grammatophora sp.* y *Navicula sp.*, mostrando el gran potencial nutricional de estos microorganismos para su utilización en la acuicultura; Mayers *et al.*, 2018 indicó que *Chlorella salina* mostró gran productividad de biomasa y carbohidratos; por otro lado Ohse *et al.*, 2015 mostró que la especie *Thalassiosira pseudonana* exhibió un alto contenido de lípidos, altos niveles de ácidos grasos monoinsaturados y bajos niveles de ácidos grasos poliinsaturados.

d) Metagenómica

La metagenómica surge como una herramienta potente para el análisis independiente de cultivos basados en la secuencia de los metagenomas de una amplia gama de hábitats, cataloga exhaustivamente todos los microorganismos presentes (no cultivables y cultivables, conocidos y desconocidos) en muestras ambientales complejas. En general la metagenómica utiliza técnicas de biología molecular para analizar la diversidad de los genomas microbianos mediante marcadores moleculares para clasificar tanto organismos procariontes como eucariotas en grupos a nivel de filogenético (Cortés - López *et al.*, 2019).

e) Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son fragmentos de ADN que corresponden a un gen o regiones no codificantes del genoma, estos segmentos de ADN permiten identificar diferentes variantes (alelos) y se localizan en un sitio determinado en los cromosomas (locus) (Cortés - López *et al.*, 2019). Hasta la fecha, los estudios moleculares se han basado en datos de secuencias de aminoácidos o ADN para genes altamente conservados, particularmente los genes ribosomales estructurales 16S / 18S / 5S / 28S/ 23S (Amit Roy, 2014).

El gen marcador más utilizado en procariontes es el 16S ARNr el cual consta de 1500 pb aproximadamente, se compone de diez zonas altamente conservadas que reflejan las relaciones genéticas entre especies y nueve regiones variables V1-V9 que reflejan las diferencias entre especies (Cortés - López *et al.*, 2019). El gen marcador más comúnmente utilizado para estudios de comunidades microalgales es el gen 23S ARNr el cual consta de una longitud de 2904 nucleótidos y corresponde al homólogo del 16S en procariontes (Cortés - López *et al.*, 2019 y Qiao *et al.*, 2020).

2.2. Antecedentes

Le *et al.*, (2019) y colaboradores, realizaron una investigación sobre la **Caracterización de la comunidad bacteriana en el intestino de *Penaeus monodon* y su agua de cultivo en estanques de camarones**; donde examinaron mediante secuenciación de nueva generación ilumina dirigido al 16S ARNr para evaluar la comparación de la microbiota bacteriana tanto en agua como intestino de camarones con síntomas patológicos y camarones asintomáticos. Encontrando como resultados una alta similitud entre la comunidad bacteriana del agua y el intestino de los camarones asintomáticos dominados principalmente por Proteobacterias (79,12%), Actinobacterias (8,95%), Bacteroidetes (6,08%), Cianobacterias (3,17%) y Crenarchaeota (1,33%); Interesantemente, la abundancia relativa de bacterias del género *Shewanella* el cual es conocido como probióticos potenciales contra bacterias patógenas fue significativamente más alta en muestras asintomáticas que sintomáticas. Estos resultados sugieren que la dominancia del intestino de camarón con bacterias probióticas puede generar grandes beneficios

sobre la salud de estos debido a su potencial antagonista contra bacterias patógenas.

Tepaamorndech *et al.*, (2020) y colaboradores, en su trabajo de investigación: **Metagenómica en biofloc y sus efectos sobre el microbioma intestinal y las respuestas inmunes en el camarón blanco del Pacífico**, cuyo objetivo fue un análisis metagenómico de amplicones basada en 16S ARNr para caracterizar los miembros bacterianos en los biofloculos y tracto digestivo del camarón. Los resultados obtenidos determinaron que el tracto digestivo en camarones cultivados con biofloc y el control (agua clara) mantuvieron de forma similar la presencia de bacterias, incluidas *Vibrio*, *Photobacterium*, *Shewanella*, *Granulosicoccus* y *Ruegeria*. También encontraron que los genes relacionados con la inmunidad que codifican para la serina proteinasa y la profenoloxidasa fueron sobre expresados en los camarones cultivados en bioflocs. Estos resultados indican que el cambio en la composición de la microbiota intestinal puede ser responsable de la regulación positiva de la expresión de genes relacionados con la inmunidad en los órganos digestivos.

He *et al.*, (2020) y colaboradores en su trabajo de investigación, **Comparación metagenómica de la estructura y función de la comunidad microbiana entre el agua, el efluente y el intestino en estanques de camarón *L. vannamei***, hicieron uso de la secuenciación dirigida al gen ARNr 16S dirigiéndose a regiones hipervariables V4 y V5 mediante la plataforma Illumina HiSeq250, compararon las composiciones y funciones microbianas del agua, el efluente y el intestino en estanques de *L. vannamei*. Obteniendo como resultados datos metagenómicos que mostraron que la microbiota intestinal del camarón tuvo una estrecha correlación con la microbiota presente en el agua. Estos resultados demuestran de manera integral las características y funciones de la microbiota en estanques de camarones, proporcionando así información básica sobre la importancia del desarrollo de estrategias de manejo de toda la microbiota para mantener la salud del camarón.

Jiménez *et al.*, (2021) y colaboradores realizaron una investigación sobre; **la utilización de microalgas y bacterias probióticas como inductores de biofloc en un cultivo hiperintensivo de camarón blanco del Pacífico**, donde establecieron tres tratamientos: 1) con *Grammatophora sp.* y *Navicula sp.* (BFD1), 2) con *Navicula sp.* Y *Schizochytrium sp.* (BFD2), y 3) *Schizochytrium sp.* y *Schizochytrium sp.* (BFS), todos los tratamientos fueron inoculados con la bacteria *Lactobacillus fermentum*. Los resultados obtenidos mostraron que con la adición de estas microalgas y bacterias probióticas al sistema de cultivo se logró mantener una buena calidad de agua principalmente contribuyendo en la transformación del amonio en nitratos, evitando niveles tóxicos para los camarones. Los autores sugieren que la inoculación con las microalgas *Grammatophora sp.*, *Navicula sp.* y *Schizochytrium sp.* y la bacteria probiótica *L. plantarum* TD19 son una buena alternativa para la inducción de biofloculos altamente nutritivos en sistemas acuícolas cerrados.

2.3. Términos básicos

2.3.1. Sistema de cultivo extensivo

Este tipo de área de producción se lleva a cabo en grandes extensiones o piscinas hechas en tierra (variando desde algunas decenas de hectáreas hasta más de 100) se aplican bajo o casi nulo recambio de agua, se siembran en bajas densidades (<5 ind/m²); no se aplica aireación artificial, y se aplica muy poca fertilización y alimentación suplementaria. Este tipo de sistema tiende a producir bajos rendimientos de producción (<500 kg/ha) (Aguilar, 2018).

2.3.2. Sistema de cultivo semi-intensivo

Este sistema de producción se identifica porque tolera sembrar poblaciones superiores al sistema extensivo, los recambios de agua son superiores, es necesario fertilizar el agua, aplicar alimento balanceado de alto contenido de proteínico, por motivos de que la producción primaria de plancton es limitada y la competencia se incrementa dado la densidad poblacional sembrada, y que se proyecta entre 10 a 20 camarones/m³ (Aguilar, 2018).

2.3.3. Sistema de cultivo intensivo

La infraestructura se construye en espacios reducidos, con un flujo elevado de agua y tasas de siembra superiores a los 20 org/m², El cultivo está basado principalmente en la alimentación artificial, mediante dietas comerciales, con un alto contenido de proteína. La tasa de recambio de agua es superior al 20%/día y se requiere de aireación, la cual es suministrada por bombas aireadoras o blowers. En estos sistemas de cultivo se obtiene una producción anual de 5000 a 20 000 kg/ha/año (Parker *et al.*, 2009).

2.3.4. Sistema de cultivo super-intensivo

El sistema de producción de camarón súper intensivo se basa en un manejo preciso de bioseguridad para estimular un crecimiento sobresaliente y alta biomasa, donde las densidades de siembra están entre 300 a 500 PL / m³ y rinden típicamente de 3 a 6 kg/m³, con este sistema se puede llegar a producir en una sola hectárea lo que usualmente se produce en 15 a 25 hectáreas de cultivo semi-intensivo; el período de crecimiento es de tres meses lo que permite casi cuatro cosechas por año (Higgins, 2014).

2.3.5. Bacterias heterotróficas

Las bacterias heterótrofas, también llamadas organotrofas, son microorganismos que sintetizan sus propias biomoléculas utilizando los compuestos orgánicos como fuente de carbono para su crecimiento, convirtiendo los metabolitos nitrogenados directamente en biomasa (El-Sayed, 2021).

2.3.6. Bacterias autotróficas

Las bacterias autotróficas ayudan al mantenimiento de la calidad del agua, ya que están directamente relacionadas con el ciclo del nitrógeno, las cuales convierten el amonio tóxico en nitrato menos tóxico. Esta biotransformación es realizada en un primer paso por bacterias oxidantes de amoníaco (BOA) las cuales oxidan el amoníaco en nitritos (Abakari y Kombat, 2020). Y en un segundo paso las bacterias oxidantes de nitritos (BON) que oxidan el nitrito a nitrato y finalmente el nitrato puede ser tanto transformado a N₂ gaseoso por bacterias desnitrificantes o aprovechado como nutriente por microalgas (Chen *et al.*, 2017).

2.3.7. Zooplancton

El zooplancton o plancton animal son aquellos organismos pertenecientes al reino animal que flotan de forma errante dentro de los ecosistemas acuáticos. Constituyen un importante eslabón en la cadena trófica por su posición intermedia entre el fitoplancton y niveles tróficos entre los que destacan muchas especies de protozoos, copépodos, rotíferos, ostrácodos, crustáceos, etc. (Roldán, 2020).

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar y período de investigación

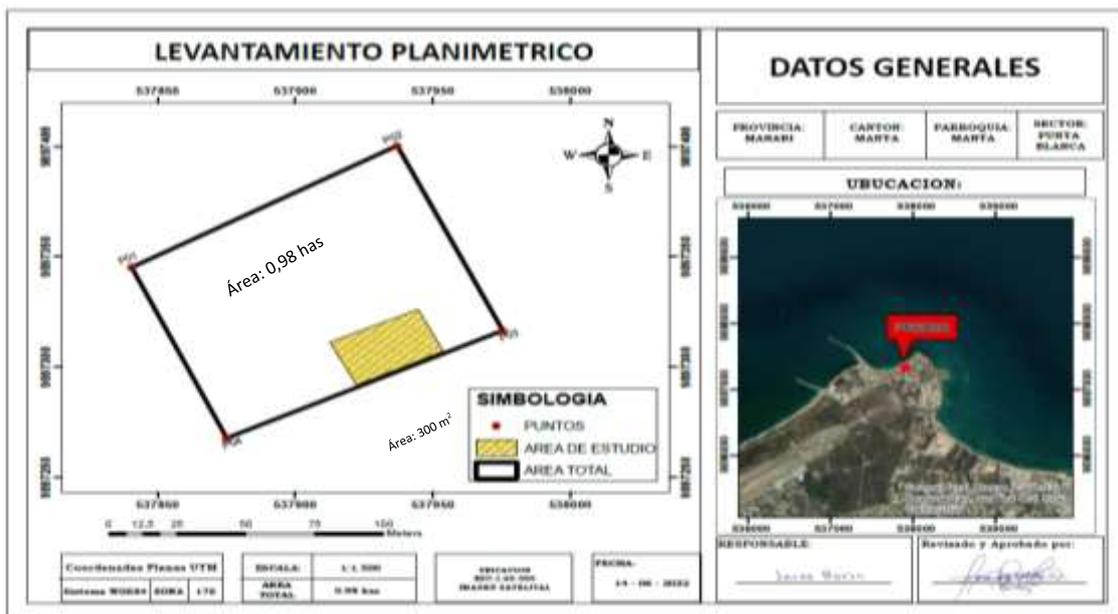
Esta investigación se llevó a cabo en un periodo de 120 días a nivel de módulo escala en las instalaciones del Centro De Biotecnología Acuícola Sostenible (CBAS) ubicado en Punta blanca, Manta – Ecuador (Fig. 1).

a) Coordenadas geográficas en el sistema UTM:

- P01: 537 956,574 m E, 9 897 384,814 m N
- P02: 537 975.504 m E, 9 897 315,486 m N
- P03: 537 876.143 m E, 9 897 275,45 m N
- P04: 537 858.079 m E, 9 897 329,369 m N

Figura 1.

Mapa de ubicación del área de ensayo



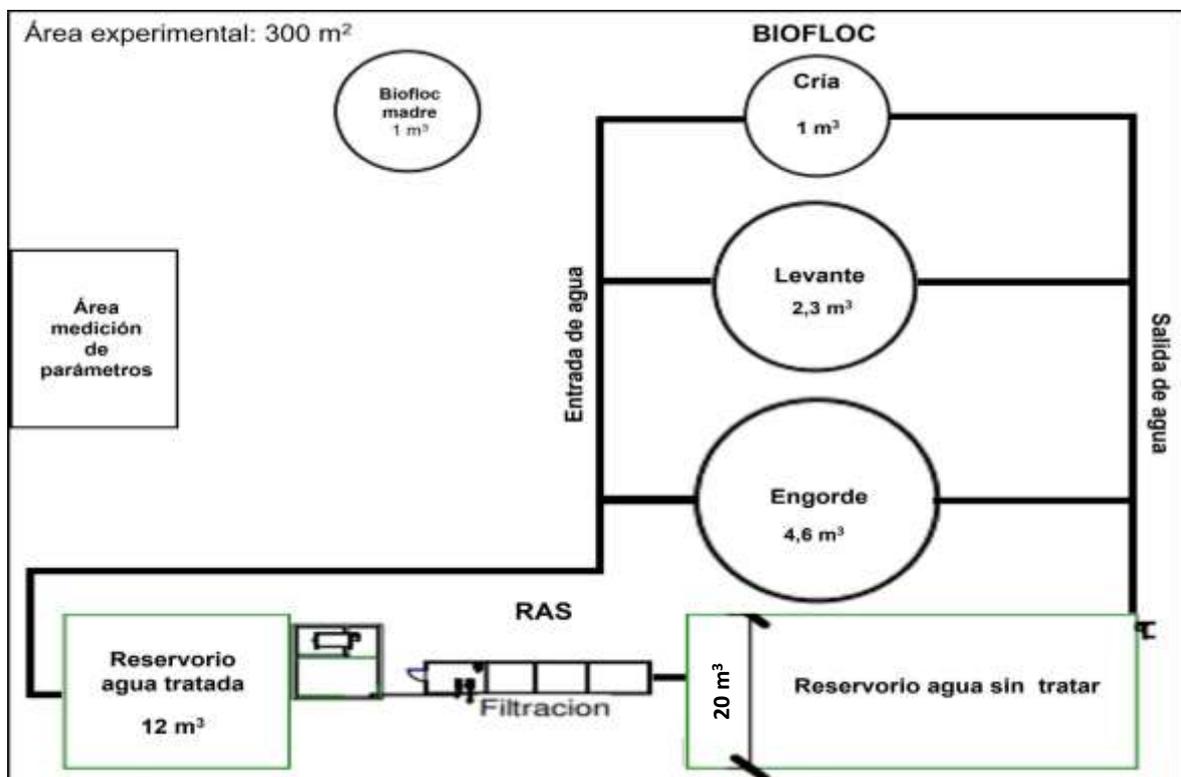
3.2. Módulo escala sistema híbrido RAS - BIOFLOC

El módulo escala utilizado para esta investigación fue prestado por el laboratorio CBAS durante el periodo de ejecución. El experimento constó de un sistema trifásico donde se establecieron tres etapas; cría (postlarvas) de 0,003 a 1 gr, levante (juveniles) de 1 a 6 gr y engorde (juveniles) de 6 a 12 gr. Cada etapa conlleva un mes de cultivo con un área experimental de 300 m² el cual consta de 3 tanques redondos de material pvc, liner y fibra. Los tanques utilizados en este experimento cuentan con las siguientes dimensiones:

- a) **Cría:** 1.36 m de diámetro y 0.7 m de altura con una capacidad de 1 m³.
- b) **Levante:** 2,34 m de diámetro y 0.55 m de altura con una capacidad de 2,3 m³.
- c) **Engorde:** 3,70 m de diámetro y 0.43m de altura con una capacidad de 4.6 m³.

Figura 2.

Esquema representativo del sistema híbrido RAS - BIOFLOC a modulo escala.



3.3. Detección de genes antimicrobianos en las cepas bacterianas

Bacillus.

Las seis cepas bacterianas *B. subtilis*, *B. subsps subtilis*, *B. subsps. inaquosorum*, *B. cereus*, *B. cereus ATCC14579* y *B. licheniformis* fueron cultivadas en caldo de soya tripticaseína (TSB) durante 24 horas a 30 °C. Posteriormente se hizo la extracción de ADN con el método de bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB) modificado (Rogers y Bendich,1994). La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue utilizada para la detección de genes claves para la biosíntesis de péptidos antimicrobianos (surfactina, bacilisina, lactonasa y subtilina), las secuencias elegidas correspondieron a *spaS* (prepéptido de subtilina), *bacA* (proteína de biosíntesis de bacilisina), *srfAA* (subunidad 1 de surfactina) y *aiiA* (N-acil homoserina lactonasa) (Sumi *et al.*, 2015; Intriago *et al.*, 2018; Mora *et al.*, 2011 y Feria *et al.*, 2004);

Los juegos de cebadores utilizados fueron SRFA-F (TCGGGACAGGAAGACATCAT) SRFA- SRFA-R (CCACTCAAACGGATAATCCTGA); BAC-F (CAGCTCATGGGAATGCTTTT) - BAC-R (CTCGGTCCTGAAGGGACAAG); aiiAfw3 (GTDTGGTGTATCTTYTGGAGAC); aiiArev1 (TTCCTCCTGCATGATCAAAAAT); SPAS-F (GGTTTGGTGGATGGAGCTGT) SPAS-R (GCAAGGAGTCAGAGCAAGGT). La reacción se llevó a cabo en un tampón de amplificación que consta de un volumen total de 25 ul conteniendo 9,5 ul de agua ultrapura, 12,5 ul de GoTaq Green Máster mix REF.M7123 (taq polimerasa; tris TRIS HCL; MgCl₂; dNTPs; Taq polimerasa), 1 uL de cada cebador y 1 µL de ADN en suspensión. El proceso de amplificación de los genes *spaS*, *aiiA*, *bacA* y *srfAA* constó de una (desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, luego se llevaron a cabo 35 ciclos de amplificación, (desnaturalización; 95°C/ por 30 s, hibridación: 55 °C por 40 s; polimerización: 72 °C por 45 s), con una extensión final a 72 °C por 5 min (Mora *et al.*, 2011).

3.4. Establecimiento de biofloc madre

El biofloc madre fue establecido en un tanque de polipropileno de 1 m³ ocho días antes de la siembra del cultivo con las siguientes condiciones:

Se llenó un tanque con capacidad de 1 m³ hasta 883 L con agua de baja salinidad (4 ppt) previamente clorada con 200 ppm de hipoclorito de sodio (NaClO) y declorada con tiosulfato de sodio en una relación de 5 partes por cada 4 partes de cloro aplicado. Luego se inocularon 10 L de cada una de las microalgas *Thalassiosira weissflogii*, *T. pseudonana* Pavlova *gryans*, *Chaetoceros gracilis*, *C. calcitrans*, *Navicula cryptocephala*, *N. glaciei*, *N. cf. Perminuta*, *Gomphoneis minuta*, *Isochrysis galbana* con una concentración de 350 000 cel/ml de cada cepa.

Posteriormente se sembró 1 L de cada una de las cepas probióticas *Bacillus subtilis*, *B. subsps. subtilis*, *B. subsps. inaquosorum*, *B. cereus*, *B. cereus* ATCC14579 y *B. licheniformis*; cada una de las cepas fue regulada a una concentración de 1.86×10^8 UFC/mL antes de la siembra; asimismo, se realizaron estudios previos de pruebas de PCR (Polimerase Chain Reaction) con primers específicos para genes biosintéticos de péptidos antimicrobianos (AMP) como *spaS* (prepéptido de subtilina), *bacA* (proteína de biosíntesis de bacilisina), *srfAA* (subunidad 1 de surfactina) y *aiiA* (N-acil homoserina lactonasa) (Sumi *et al.*, 2015; Intriago *et al.*, 2018; Mora *et al.*, 2011 y Feria *et al.*, 2004).

El tanque fue nutrido diariamente durante el periodo de maduración del biofloc madre con 20 g de nitrato de sodio, 15 g de tripolifosfato, 15 g de metasilicato y 112 g de salvado de arroz como fuente de carbono. Las condiciones del tanque se mantuvieron constantes durante todo el proceso de maduración con oxígeno disuelto entre 6 y 7 mg/L, temperatura de 26 - 30 °C y pH en un rango de 7 - 8. Se realizaron mediciones diarias de los niveles de flóculos en el agua, utilizando un cono imhoff, donde se tomó 1 L del biofloc y se dejó sedimentar por 15 minutos. Se dejó madurar por 5 días hasta alcanzar un volumen de floculación de 40 ml/L.

3.5. Medición de parámetros fisico-químicos

Todos los parámetros fueron monitoreados cada 24 horas durante todo el ciclo del cultivo. Los parámetros TAN mg/L, Nitrito mg/L y Nitrato mg/L se midieron haciendo uso del kit colorimétrico API, para la medición de pH se utilizó el equipo ORION 3 STAR; Para la temperatura y oxígeno disuelto se usó el equipo YSI 550A.

3.6. Siembra e inoculación de biofloc madre en el agua de cultivo RAS-BIOFLOC

El agua fue clorada a 50 ppm de cloruro de calcio $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, se dejó actuar por 4 horas y se decloró con tiosulfato de sodio con una relación de 5 partes por cada 4 partes de cloro aplicado. Luego se realizó la medición de los parámetros TAN mg/L, Nitrito mg/L, Nitrato mg/L, Potasio mg/L, Magnesio mg/L, Calcio mg/L, Fosfato mg/L, Sulfato mg/L, Alcalinidad mg/L, dureza al agua de siembra haciendo uso de un fotómetro (YSI 9300). La temperatura y pH fueron medidos y posteriormente el biofloc maduro se transfirió al agua de cultivo en una relación 1:10 (biofloc: agua) y se dejó madurar por 4 días antes de sembrar las postlarvas.

3.7. Siembra de postlarvas y fases de cultivo

Aproximadamente 1500 postlarvas sanas de *L. vannamei* fueron cedidas por el laboratorio CBAS; las postlarvas entraron a la fase de cría con densidades de siembra de 1500 animales/m³ con un peso promedio de 0,003 g/individuo. Luego de un mes de cultivo los camarones fueron trasladados a la fase de levante la cual constó de un tanque de mayor dimensión donde se manejaron densidades de siembra de 600 individuos/m³. Concluido el mes en la etapa de levante los camarones fueron transferidos a la etapa de engorde en un tanque de mayor superficie donde se manejaron densidades de siembra de 280 individuos/m³. Finalmente, los camarones fueron cosechados al tercer mes.

3.8. Análisis metagenómico de las poblaciones bacterianas y microalgales

3.8.1. Recolección de muestras

Se tomaron muestras mensualmente de agua de cultivo (50 ml) y tracto digestivo de 10 animales seleccionados al azar dejando dos réplicas por muestreo. Las muestras de agua de cultivo fueron centrifugadas a 3600 rpm por 10 min en una centrifuga refrigerada (SORVALL RT 6000D). Luego se descartó el sobrenadante y el pellet restante fue recolectado en un tubo eppendorf de 1.5 ml esterilizado; donde se realizaron múltiples centrifugaciones a 5000 rpm por 5 min en una microcentrífuga (Fisher Scientific Marathon 16Km) hasta alcanzar un volumen de 100 mg. Las muestras de postlarvas se diseccionaron asépticamente en cámara de flujo utilizando hojas de bisturí estériles para la recolección de intestino los cuales fueron depositados directamente en tubos eppendorf de 1,5 ml estériles hasta alcanzar un volumen de 100 mg. Todas las muestras se almacenaron a -20 °C, hasta su tratamiento.

3.8.2. Extracción de ADN

Para la extracción del ADN metagenómico se utilizó el método CTAB X2 modificado (Rogers y Bendich,1994). A los 100 mg de muestras recolectada se le añadió 200 µL de Tris-HCl a 100 mM y se dejó congelar a -20 °C por 5 minutos; posteriormente se incubo a 90 °C en un termobloque. Seguido se agregó 600 µL de Buffer CTAB 2X pre calentado a 60 °C más 10 µL de β-mercaptoetanol (≥99%) y 3.5 µL de proteinasa K (20 mg/ml) inmediatamente se incubó en un termobloque a 60 °C por 1 hora mezclando cada 5 min e invirtiendo suavemente el microtubo.

A continuación, se agregó 600 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se vortexeo durante 10 segundos paso seguido se centrifugó a 13000 rpm por 10 min, se recuperó el sobrenadante a un nuevo microtubo y se añadió 0,18 volúmenes de acetato de sodio 3M frío e isopropanol (2/3 del volumen recuperado). Se mezcló suavemente por inversión y se dejó incubando a -20 °C toda la noche.

Al día siguiente se centrifugó a 13000 rpm por 10 min. Se descartó el sobrenadante y se añadió 500 µL de etanol frío al 75%. Nuevamente se centrifugó a 13000 rpm por 5 min, se descartó todo el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente por 10 min. Se resuspendió el pellet en 40 µL de Buffer T.E pH 8.0 pre calentado a 60°C, se añadió 1.5 µL de RNase (10mg/mL) y se incubó por 30 min a 65 °C. Finalmente, se cuantificó 1 µL de la elución utilizando el nanofotómetro™ N60 para determinar la cantidad y pureza del ADN extraído.

3.8.3. PCR dirigidas a genes ARNr 16S y 23S

La técnica de PCR fue utilizada para la verificación de la presencia de genes 16S y 23S ARNr, para lo cual se utilizaron los juegos de cebadores 27F* (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) - 1492R*(ACGGCTACCTTGTTACGACTT) y p23SrV-r1: 5- TCA GCC TGT TAT CCC TAG AG – 3p23SrV-f1: 5- GGA CAG AAA GAC CCT ATG AA -3; respectivamente (Weisburg *et al.*, 1993; Sherwood y Presting, 2007). La reacción se llevó a cabo en un tampón de amplificación que consta de un volumen total de 25 ul conteniendo 9,5 ul de agua ultrapura, 12,5 ul de GoTaq Green Máster mix REF.M7123 (taq polimerasa; tris TRIS HCL; MgCl₂; dNTPs; Taq polimerasa), 1 uL de cada cebador y 1 µL de ADN en suspensión.

El proceso de amplificación del gen ARNr 16S constó de una (desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, luego se llevaron a cabo 35 ciclos de amplificación, (desnaturalización; 95 °C por 30 s, hibridación: 58 °C por 30 s; polimerización: 72 °C por 1 min), con una extensión final a 72 °C por 5 min. Mientras que para la amplificación del gen ARNr 23S las condiciones fueron de 94 °C por 3 min para la desnaturalización inicial, luego se llevaron a cabo 35 ciclos (desnaturalización: 95 °C por 30 s; hibridación: 55 °C por 40 s; polimerización: 72 °C por 40 s), con una extensión final a 72 °C por 5 min. La calidad de los productos de PCR fueron verificados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

3.8.4. Secuenciación NGS por tecnología nanoporos MinION

Las muestras de ADN fueron secuenciadas en el laboratorio INCABIOTEC (Perú) mediante la tecnología de secuenciación por nanoporos MinION donde se realizó el siguiente flujo de trabajo:

a) Preparación de librerías ARNr 16S.

Para la preparación de librerías ARNr 16S se hizo uso del kit de código de barras (SQK-16S024) siguiendo las instrucciones del fabricante para ello se utilizó ADN metagenómico de alto peso molecular y postratamientos que conllevan la purificación, ligación de adaptadores y unión de barcodes antes de iniciar el proceso de secuenciación (Oxford, N. 2019).

- Purificación

El ADN metagenómico obtenido mediante el proceso de extracción fue transferido a un tubo Eppendorf DNA LoBind de 1,5 ml y resuspendido con 30 µl de perlas AMPure XP, luego se incubó en un agitador rotatorio (Multi Bio RS-24) durante 5 minutos a temperatura ambiente, se colocó sobre el rack magnético donde se descartó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con etanol al 70%. El ADN puro fue resuspendido en 10 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8,0 con NaCl 50 Mm.

- Unión de barcodes

El ADN metagenómico puro de todas las muestras fue ajustado a 10 ng en un volumen de 10 µl. Para cada muestra a analizar, se preparó por separado el mix de PCR conteniendo 10 µl de ADN de entrada (10 ng), 5 µl de agua libre de nucleasas, 25 µl de LongAmp Hot Start Taq 2X Master Mix y 10 µl de barcode 16S SQK-16S024. El gen ARNr 16S fue amplificado y barcodeado mediante PCR con las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial a 95 °C por 1 min; seguido de 25 ciclos (desnaturalización: 95 °C por 20 seg; hibridación: 55 °C por 30 seg; polimerización: 65 °C por 2 min) y una extensión final a 65 °C por 5 min.

- **Ligación de adaptadores**

Se preparó un pool de todas las bibliotecas barcodeadas en un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril utilizando 12.5 fmoles por muestra alcanzando un total de 100 fmoles en 10 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8,0 con NaCl 50 mM y se agregó 1 µl de adaptador rápido (RAP) dejando incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.

- **Secuenciación**

75 µl de la biblioteca preparada con barcodes y adaptadores se adicionaron gota a gota a través del puerto spoton y se secuenciaron en la celda de flujo FLO-MIN106 (R9.4.1) en el dispositivo MinION (Oxford Nanopore Technologies) por un periodo de 48 h haciendo uso del software minknow.

b) Preparación de librerías amplicones ARNr 23S

Para la preparación de librerías ARNr 23S se utilizó el kit código de barras nativo (SQK-LSK109) siguiendo las instrucciones del fabricante (Ravi, K, 2020). Se realizó una PCR dirigida al gen 23S donde se utilizó el juego de primers p23SrV-r1: 5- TCA GCC TGT TAT CCC TAG AG – 3p23SrV-f1: 5-GGA CAG AAA GAC CCT ATG AA -3 (Sherwood y Presting, 2007). Las condiciones de reacción fueron una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min; seguido de 35 ciclos (desnaturalización; 95 °C por 30 seg; hibridación: 55 °C por 40 seg; polimerización: 72 °C por 40 seg) y una extensión final a 72 °C por 5 min. El fragmento de 410 pb obtenido fue purificado con 30 µl de perlas AMPure XP en el rack magnético y se cuantificó en Qubit 4 invitrogen.

- **Adición de DA-TAILING**

En este paso los amplicones purificados fueron sometidos a incubación con el objetivo de adicionar una adenina al extremo 3' de cada fragmento; todas las muestras por separado fueron ajustadas a 200 fmoles en un volumen final de 48 µl con agua libre de nucleasas y se adicionó 3,5 µl de tampón de reparación de ADN NEBNext FFPE, 2 µl de mix de reparación de ADN NEBNext FFPE, 3,5 µl de tampón de

reacción Ultra II End-prep y 3 μl del mix de enzimas Ultra II End-prep alcanzando un volumen final de 60 μl . En un termociclador, se incubó a 20 °C por 5 min y a 65 °C por 5 min.

- **Unión de barcodes**

El ADN metagenómico puro de todas las muestras fue ajustado por separado a 200 fmoles en un volumen de 22.5 μl con agua libre de nucleasas, se adicionó 2,5 μl de código de barras nativo y 25 μl de mix ligasa Blunt/TA alcanzando un volumen final de 50 μl . Se dejó incubar 10 minutos a temperatura ambiente, se purificó con 50 μl de perlas AMPure XP en el rack magnético y se cuantificó en Qubit.

- **Ligación de adaptadores**

El ADN barcodeado de todas las muestras fue mezclado en un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril utilizando 25 fmoles por muestra alcanzando un total de 200 fmoles en 65 μl de agua libre de nucleasas, se adicionó 5 μl de adaptador Mix II (AMII), 20 μl de tampón de reacción de ligadura rápida NEBNext (5X) y 10 μl Quick T4 ADN ligasa alcanzando un volumen final de 100 μl . Se dejó incubar 10 minutos a temperatura ambiente, se purificó con 50 μl de perlas AMPure XP en el rack magnético y se cuantificó en Qubit.

- **Secuenciación**

75 μl de la biblioteca preparada con barcodes y adaptadores se adicionaron gota a gota a través del puerto spoton y se secuenciaron en la celda de flujo FLO-MIN106 (R9.4.1) en el dispositivo MinION (Oxford Nanopore Technologies) por un periodo de 36 h haciendo uso del software minknow.

3.8.5. Análisis bioinformáticos

a) Análisis de datos ARNr 16S

El control del dispositivo de secuenciación, la adquisición de datos y la llamada de base se llevaron a cabo mediante el software MinKNOW. La demultiplexación, eliminación de adaptadores y alineación fueron

realizadas en tiempo real mediante el software Guppy integrado en el MinKNOW. Los datos de secuenciación fueron obtenidos como archivos fastq.

La asignación taxonómica fue obtenida mediante el mapeo de las lecturas fastq contra la base de datos de referencia SILVA LSU v128 mediante el programa QIIME2 v2022.2, vsearch. Los análisis estadísticos se realizaron mediante Rstudio. Una gráfica de barras apiladas fue generada para determinar la abundancia de géneros y especies bacterianas de cada muestra.

b) Análisis de datos ARNR 23S

El control del dispositivo de secuenciación, la adquisición de datos y la llamada de base se llevaron a cabo mediante el software MinKNOW. Una base de datos de referencia fue creada mediante la selección de secuencias del gen ARNr 23S de 100 especies microalgales a partir de la base de datos NCBI (Base_datos_microalgas_23s_Ela.FASTA). Las secuencias descargadas fueron alineadas utilizando la herramienta Clustalw en el software BioEdit versión 7.2.5.0. y el archivo Fasta obtenido se cargó en el software EPI2ME a través del flujo de trabajo Fasta reference upload.

La asignación taxonómica de los datos de secuenciación fue llevada a cabo haciendo uso del flujo de trabajo de análisis custom utilizando la lista de referencia cargada, con base en un umbral del 95 % de identidad. Los análisis estadísticos se realizaron mediante Rstudio. Una gráfica de barras apiladas fue generada para determinar la abundancia de géneros y especies microalgales de cada muestra.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Identificación de genes de biosíntesis de péptidos antimicrobianos.

Previo el establecimiento del biofloc madre (mat y met) se verificó por PCR de punto final la presencia de los genes codificantes de los péptidos antimicrobianos Subtilina (*spaS*), Bacilisina (*bacA*), Lactonasa (*aiiA*) y Surfactina (*srfAA*) en las seis cepas seleccionadas *Bacillus subtilis*, *B. subsps. subtilis*, *B. subsps. inaquosorum*, *B. cereus*, *B. cereus ATCC14579* y *B. lincheniformis*. Se obtuvieron los amplicones de los tamaños esperados para *spaS* (375 bp), *bacA* (498 bp), *aiiA* (235 bp) y *srfAA* (200 pb). La cepa *B. cereus* mostró presencia de los cuatro genes; *B. subtilis* y *B. subtilis inaquosorum* condujeron a amplicones de *srfAA*, *spaS* y *bacA*; *B. subsps subtilis* de *srfAA* y *bacA*; *B. lincheniformis* de *aiiA* y *bacA* mientras que *B. cereus ATCC14579* amplificó únicamente *aiiA* (Tabla 1).

Estos resultados demuestran que las cepas utilizadas efectivamente portan secuencias que les permitirían sintetizar enzimas extracelulares con actividades antagonistas a patógenos del camarón. En efecto, la surfactina es un biosurfactante vinculado al sistema de quorum sensing inhibiendo la motilidad de ciertas subpoblaciones celulares (Rahman *et al.*, 2021), en el caso de Bacilisina, es un antibiótico dipéptido que afecta a un amplio rango de microorganismos actuando como una molécula señal pleiotrópica que afecta diferentes actividades celulares (Islam *et al.*, 2022), la subtilina, por su parte, es un antibiótico peptídico (lantibiótico) que actúa predominantemente contra bacterias Gram-positivas, inhibiendo el crecimiento por permeabilización de la membrana plasmática lo que desencadena lisis celular (Zhang *et al.*, 2022).

Las lactonas forman parte del grupo de enzimas responsables de degradar las N-acyl homoserine lactonas, las moléculas más reconocidas por su rol en el quorum sensing bacteriano, siendo involucradas en la prevención de las infecciones bacterias y de la formación de biofilm (Noor *et al.*, 2022).

Tabla 1.

Prueba de PCR para genes antimicrobianos: Bacilisinina (bacA), Subtilina (spaS) y Sufactina (srfAA) y Lactonasa (aiiA).

Muestra	spaS	aiiA	srfAA	bacA
<i>B. subtilis</i>	+		+	+
<i>B. subsps. subtilis</i>			+	+
<i>B. subsps. inaquosorum</i>	+		+	+
<i>B. lincheniformis</i>		+		+
<i>B. cereus</i>	+	+	+	+
<i>B. cereus ATCC14579</i>		+		

4.2. Parámetros físico - químicos

Durante todo el ciclo de cultivo, la temperatura, oxígeno disuelto (OD) y pH fueron monitoreados diariamente oscilando en rangos de OD entre 6,3 y 7,2 mg/L, temperatura entre 27,4 y 29,3 °C y el pH entre 7,2 y 8,2; se notó un cambio del pH al final de la fase de cría donde se presentaron los valores más elevados (8 - 8,2) lo cual estaría relacionado con el incremento gradual del fitoplancton y la actividad fotosintética (Kubitza, 2017). Después de este periodo durante las fases de levante y engorde los niveles de pH se mantuvieron entre 7 y 7,9 (Fig. 3A). Los valores óptimos recomendados para el cultivo de *L. vannamei* en sistemas con tecnología Biofloc están en rangos de temperatura entre 27 y 32°C, OD superior a 5 mg/L y pH entre 7 y 9 (Jiménez *et al.*, 2021 y Miranda-Baeza *et al.*, 2020). En esta investigación se mantuvieron las condiciones óptimas recomendadas para asegurar un buen desarrollo del camarón en el sistema RAS-BIOFLOC.

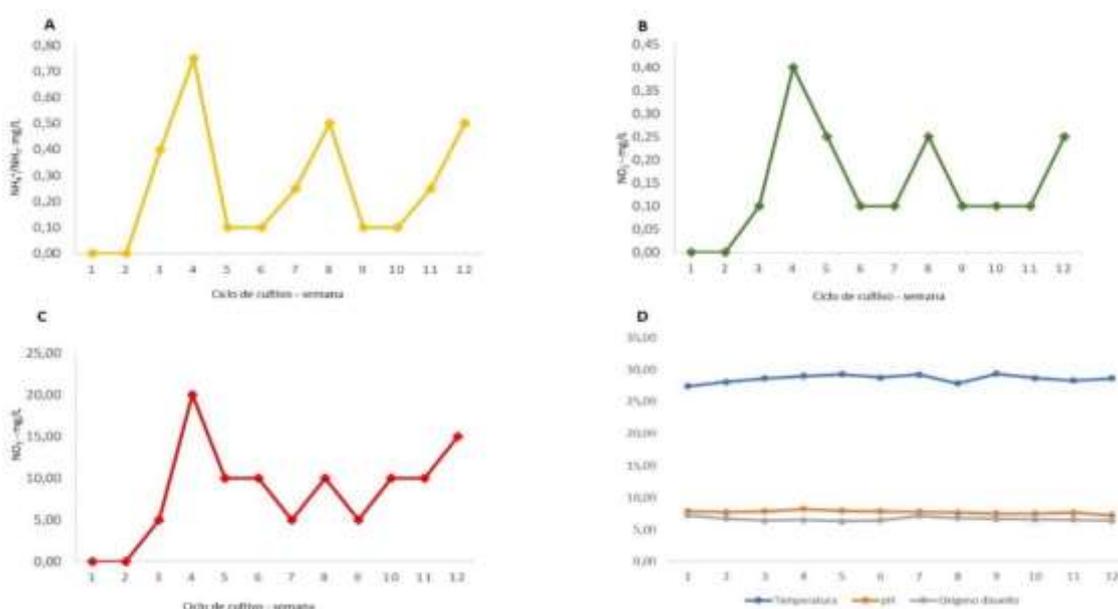
Otro parámetro fundamental para el cultivo de *L. vannamei* en sistemas super intensivos es la concentración de compuestos nitrogenados. En este estudio, las concentraciones de nitrógenos se mantuvieron en rangos de nitrógeno amoniacal total (NAT), que incluye a la forma ionizada (NH₄⁺) y no ionizada (NH₃), entre 0,10 y 0,75 mg/L; NO₂ entre 0,10 y 0,40 mg/L y NO₃ entre 5 y 20

mg/L (Fig. 3). La susceptibilidad del camarón especialmente a NH_3 y NO_2 aumenta drásticamente en aguas de baja salinidad.

En aguas con salinidades por debajo de 5 ppt, tanto el NH_3 como el NO_2 deberían ser inferiores a 1 mg/L (Samocha y Prangnell, 2019). El NO_3 por su parte presenta menor toxicidad sobre los animales cultivados, sin embargo, en altas concentraciones y dependiendo de la salinidad puede ser letal. Es recomendado mantenerlo en agua de baja salinidad (5 ppt) en niveles inferiores a 60 mg/L, valores superiores pueden ocasionar la muerte del camarón (Alves Neto *et al.*, 2019). Los valores promedios de los compuestos nitrogenados en este trabajo se mantuvieron por debajo de los niveles tóxicos durante el ciclo del cultivo presentando los valores más elevados en la fase de cría a los 30 días de cultivo donde se encontró NAT en 0,75 mg/L, NO_2 en 0,40 mg/L y NO_3 en 20 mg/L; después de este periodo en las fases levante y engorde los valores fueron inferiores hasta el final del ciclo de producción manteniéndose dentro de los rangos recomendados.

Figura 3.

Parámetros físico-químicos del agua durante el ciclo de cultivo en el sistema superintensivo RAS-BIOFLOC de L. vannamei a baja salinidad. A) Nitrógeno amoniacal total ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$). B) Nitrito (NO_2^-). C) Nitrato (NO_3^-). D) Temperatura, pH y oxígeno disuelto.



4.3. Maduración de biofloc y fases de cultivo

4.3.1. Fase de cría (primer mes de cultivo)

Después de la inoculación del biofloc madre al tanque de cría (mat y met) los niveles de floculación fueron monitoreados durante todo el ciclo de cultivo (Fig. 4A). Se sembraron las postlarvas (PL15) a una densidad de 1500 ind/m³. Durante los primeros 15 días el agua del tanque presentó una coloración amarillenta y bioflóculos en un nivel de 4 ml/L con predominancia de diatomeas a revisión microscópica (Fig. 4B). Entre los días 15 y 30 el color del agua se tornó verdosa con un incremento gradual del fitoplancton alcanzando un nivel de floculación de 8 ml/L al final de la fase de cría donde los camarones alcanzaron un peso promedio de 0,92 g (Fig. 4C).

Como se indicó anteriormente, en este periodo se produjo un aumento en el pH y en la concentración de NAT a 0,75 mg/L. Este bajo nivel de floculación, el aumento en el pH y el incremento de NAT durante esta fase puede ser debido a que en este punto la comunidad bacteriana aún no estaba bien establecida en el tanque (Van y Yan, 2019). La adición de azúcar como fuente de carbono en una relación C/N de 15:1 cuando hubo presencia de nitrógenos elevados ayudó a potenciar el crecimiento y desarrollo de las bacterias heterotróficas (Romano *et al.*, 2018).

4.3.2. Fase de levante (segundo mes de cultivo)

Al final de los primeros treinta días el agua del tanque de cría con su biofloc y los camarones fueron transferidos al tanque de la fase de levante (600 ind/m³) alcanzando niveles de floculación de 10 ml/L después de 8 días. En este periodo el NAT y NO₂ disminuyeron a niveles entre 0,10 - 0,25 mg/L, presentado un pico de NAT de 0,50 mg/L al final de esta fase mientras que el NO₃ se mantuvo entre 5 - 10 mg/L empezando a establecerse un color marrón y un aumento de los niveles de floculación en la columna de agua los cuales fueron mantenidos entre 10 y 15 ml/L hasta el final de esta fase donde los animales cultivados alcanzaron un peso promedio de 5,4 g. Es recomendado mantener los niveles de floculación entre 10 y 15 ml/L debido a que una concentración excesiva en la columna de agua es contraproducente ya que puede llegar a obstruir las branquias ocasionando hipoxia y la muerte de los camarones (Hargreaves, 2013).

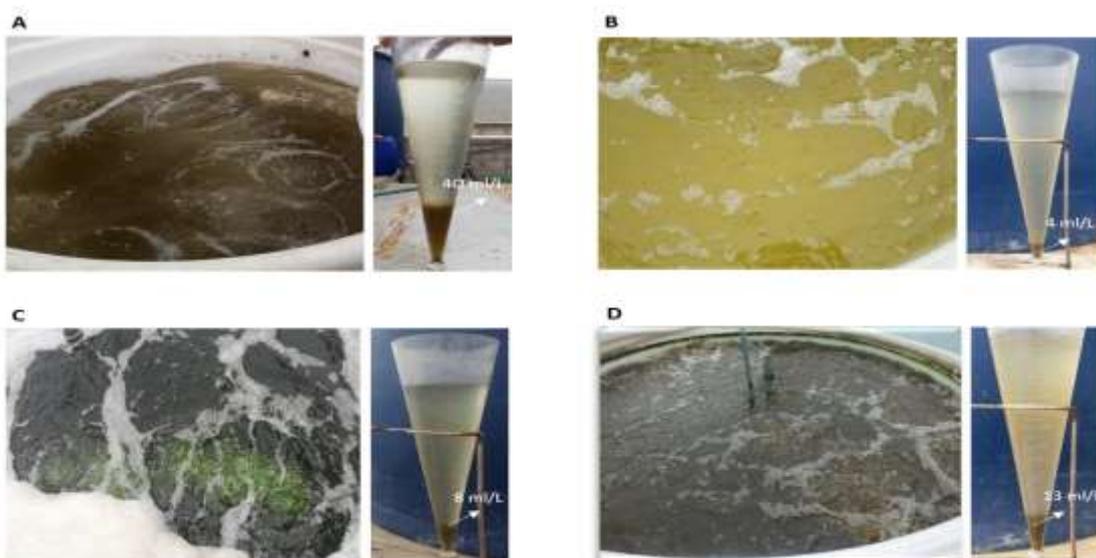
4.3.3. Fase de engorde (tercer mes de cultivo)

Después del segundo mes de cultivo los animales y el biofloc maduro fueron transferidos al tanque de engorde (280 ind/m²), los niveles de flóculos fueron mantenidos entre 10 y 15 ml/L hasta la cosecha presentando una coloración marrón acentuada del agua y niveles de NAT: 0.25 mg/L, NO₂: 0.10 mg/L y NO₃: 10 mg/L por debajo de los niveles tóxicos (Fig. 4D). Los camarones fueron cosechados al finalizar la fase de engorde con un peso promedio de 12,2 g con una sobrevivencia del 85%.

Las características del agua observadas durante la maduración del biofloc en el presente trabajo tienen relación con lo reportado previamente por Hargreaves, (2013) y Pimentel *et al.*, (2023) quienes indicaron que el biofloc durante su transición de desarrollo pasa de una coloración amarillenta a verdosa cuando se presenta un pico de amonio para luego finalizar con una coloración marrón acentuada la cual está dada por la relación algas/bacterias en cada etapa con el color marrón acentuado reflejando el dominio de la comunidad bacteriana.

Figura 4.

Coloración del agua y niveles de floculación durante fases de cultivo en el sistema superintensivo RAS-BIOFLOC. A) Biofloc madre a los 5 días de maduración. B) antes de siembra (aS). C) Fase final de cría (fC) y D) Fases final de levante (fL) y final de engorde (fE).



4.4. Análisis metagenómico de las poblaciones bacterianas de agua e intestino.

Se llevó a cabo la secuenciación del gen ARNr 16S de 4 muestras de agua y 4 de intestinos tomadas antes de la siembra de larvas (aS), final de cría (fC), final de levante (fL) y final de engorde (fE). Los resultados revelaron que *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* fueron los tres filos más abundantes, tanto en agua como en intestinos, durante todo el ciclo de cultivo (Fig. 5). Estos filos han sido previamente reportados por dominar la microbiota en agua e intestinos de camarones, incluyendo *L. vannamei* y *P. monodon* (Intriago *et al.*, 2018 y Rungrassamee *et al.*, 2013).

Proteobacteria fue el filo más abundante, su abundancia relativa en agua en las fases aS, fC, fL y fE fue de 61.5, 48.6, 56.4 y 46.1% mientras que en intestino correspondieron a 73.5, 46.6, 46.2 y 35.9%, respectivamente. Este filo está ampliamente disperso en ambientes acuáticos, generalmente domina en sistemas con tecnología biofloc y juega un rol importante en el proceso del ciclo de nutrientes y la mineralización de compuestos orgánicos (Cardona, 2016). Además, se ha encontrado que el perfil bacteriano intestinal en camarones sanos consiste principalmente en *Proteobacteria* (Califano *et al.*, 2017).

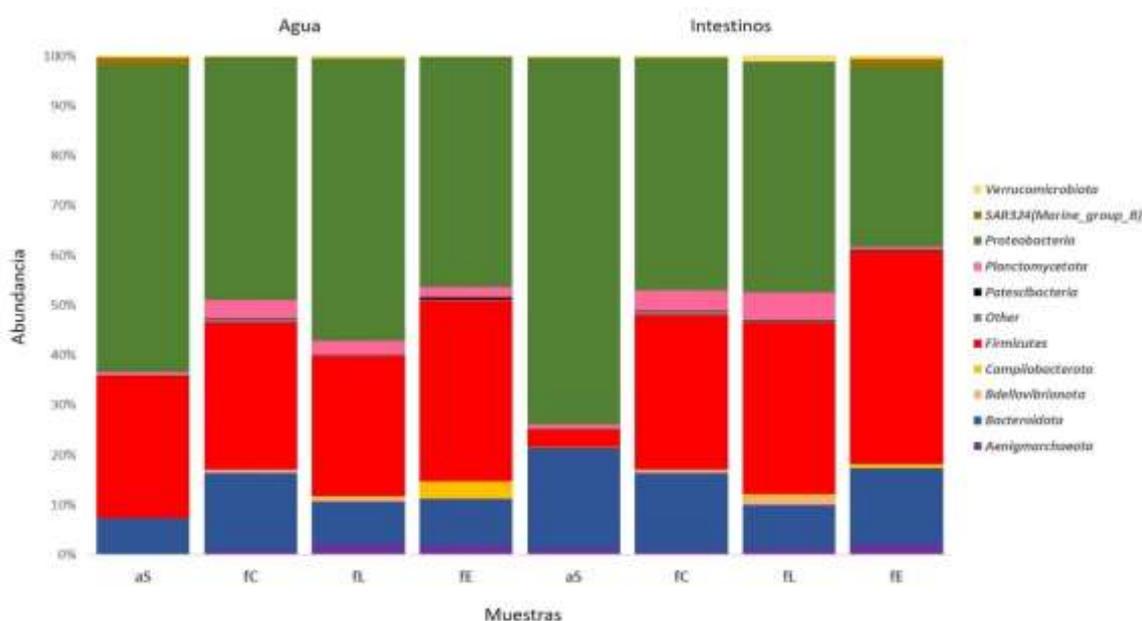
El filo *Firmicutes*, al cual pertenecen las bacterias inoculadas en el biofloc domesticado (*Bacillus*), fue el segundo filo más abundante en el agua: aS (28.4%), fC (29.4%), fL (27.9%) y fE (36.1%), e intestinos: aS (35.8%), fC (30.9%), fL (34.5%) y fE (42.5%). Los *Firmicutes* son bacterias típicamente dominantes en agua de cultivo y tracto digestivo de animales sanos, agrupando muchas especies con potencial probiótico que ayudan al mantenimiento de la salud del camarón destacando el género *Bacillus* (Vargas-Albores *et al.*, 2016).

Finalmente, *Bacteroidetes* fue el tercer filo más abundante en agua: aS (7.18%), fC (15.6%), fL (8.5%) y fE (9.4%), mientras que en intestino correspondieron a aS (20.3%), fC (15.7%), fL(8.8%) y fE (15.3%); este filo es un miembro dominante del bacterioplancton heterótrofo marino y se encuentra frecuentemente colonizando partículas macroscópicas de materia orgánica y es generalmente encontrado en altos niveles de abundancia en sistemas biofloc (Woebken *et al.*, 2007). En conjunto, *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* representaron

más del 90% del total de bacterias en agua e intestinos en todas las fases de cultivo.

Figura 5.

Diversidad bacteriana a nivel de Filo en muestras de agua e intestinos de L. vannamei en el sistema RAS-BIOFLOC, correspondiente a las diferentes fases de cultivo, antes de siembra de larvas (aS), final de cría (fC), final de levante (fL) y final de engorde (fE).



A nivel de género durante todo el ciclo se encontró que en muestras de agua e intestinos los cinco géneros más abundantes fueron *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Porphyrobacter*, *Marinobacter* y *Lysobacter* (Fig.6). En muestras de agua *Bacillus* presentó el mayor nivel de abundancia relativa en todas las fases (aS: 25,5%; fL: 27,8%; fE: 29,8%), exceptuando fC que corresponde a los 30 días de cultivo donde el género *Pseudomonas* fue el más abundante con 32,1% frente al 13,8% del género *Bacillus*. La predominancia del género *Pseudomonas* podría relacionarse con el pico de amonio registrado (0.75 mg/L) considerando que *Pseudomonas stutzeri*, *P. baleárica* y *P. nitritireducens* han sido reportadas como nitrificantes heterotróficas (Gao *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2012 y Carneiro *et al.*, 2019). Cabe resaltar que este género fue el segundo más abundante en agua durante todas las fases de cultivo (aS: 17,8%; fL: 16,4%; fE: 8.7%).

Esto coincide con lo reportado por Trung Tran *et al.*, (2019) quienes establecieron la correlación entre la aparición de compuestos nitrogenados y la proliferación de *Pseudomonas* en piscinas de *L. vannamei*. También se encontró poca presencia de *Vibrio* manteniéndose en niveles por debajo de 0,7% durante todo el ciclo de cultivo.

Por otro lado, en muestras de intestinos se observó que antes de la siembra (aS) predominó el género *Marinobacter* (30,3%) frente a *Bacillus* con el 4.8%. Luego en fC, fL y fE *Bacillus* alcanzó las abundancias relativas más altas de 29,3, 30,5 y 36,3%, respectivamente. Las especies de *Pseudomonas* alcanzaron el 3%, relativamente bajo en comparación con los niveles reportados en el agua superiores al 11%. Se encontró baja presencia de *Vibrio* (0.9%) lo que reflejaría la buena colonización del tracto digestivo por las especies de *Bacillus* limitando la proliferación de las especies de *Pseudomonas* y *Vibrio*, ello concuerda con los reportes de Zhang *et al.*, 2021 y Wang *et al.*, 2020 quienes mostraron que la suplementación dietética con *B. subtilis* redujo la adhesión y colonización de *Pseudomonas* y *Vibrio* en intestinos de peces y camarones, respectivamente.

Las cepas bacterianas de *Bacillus* inoculadas en este trabajo poseen genes biosintéticos de péptidos antimicrobianos (AMP) como *spaS* (prepéptido de subtilina), *bacA* (proteína de biosíntesis de bacilisina), *srfAA* (subunidad 1 de surfactina) y *aiiA* (N-acil homoserina lactonasa) (Sumi *et al.*, 2015; Intriago *et al.*, 2018; Mora *et al.*, 2011 y Feria *et al.*, 2004); que inhiben el crecimiento de otros grupos bacterianos estimulando la proliferación de microorganismos benéficos como es el caso de *Porphyrobacter* y *Lysobacter* (Intriago *et al.*, 2018; Cao *et al.*, 2022; Kristyanto *et al.*, 2017 y Gómez Expósito *et al.*, 2015). Estos dos grupos bacterianos ocupan el segundo y tercer nivel de abundancia relativa en las muestras de intestinos.

Recientes hallazgos han demostrado que *Porphyrobacter* agrupa especies especializadas en la producción de vitaminas B2, B6 y otras sustancias promotoras del crecimiento de microalgas ampliando significativamente nuestro conocimiento sobre las interacciones microalgas-bacterias (Astafyeva *et al.*, 2022). En cuanto a *Lysobacter*, Xie *et al.*, (2012) mostraron que los miembros de este género son buenos productores de bioactivos naturales, especialmente,

0.28%) y fE (3.19, 1.36, 1.28 y 0.3%), respectivamente. En fC las especies *P. putida* (13,34%), *P. oligotropica* (9,02%) y *P. stutzeri* (6,45%) fueron las más abundantes; resaltando lo indicado previamente de que durante este periodo se presentó un pico de amonio (0,75 mg/L.). Estas especies han sido reportadas en procesos del ciclo del nitrógeno como nitrificación y desnitrificación (Zhang *et al.*, 2022; Gao *et al.*, 2020 y Kim *et al.*, 2008). En esta muestra las cepas inoculadas presentaron abundancias relativas más bajas de *B. subtilis* (5,35%), *B. subsps. Subtilis* (2,50%), *B. subsps. Inaquosuorum* (1,38%), *Bacillus cereus* (1,08%), *B. lincheniformis* (1,05%) y *B. cereus ATCC 14579* (0,28%).

En la muestra de intestino aS, cuando las larvas aún no habían entrado en contacto con el biofloc domesticado, las especies más abundantes fueron *Marinobacter vinifirmus*, (11,34%) y *M. shengliensis* (8,23%), mientras que cuatro de las cepas del biofloc domesticado estuvieron presentes en bajas proporciones (*B. subtilis*: 0,86%; *B. cereus*: 0,24%; *B. lincheniformis*: 0,22%; *B. subsps subtilis*: 0,20%), representando el 1,52% de la comunidad bacteriana.

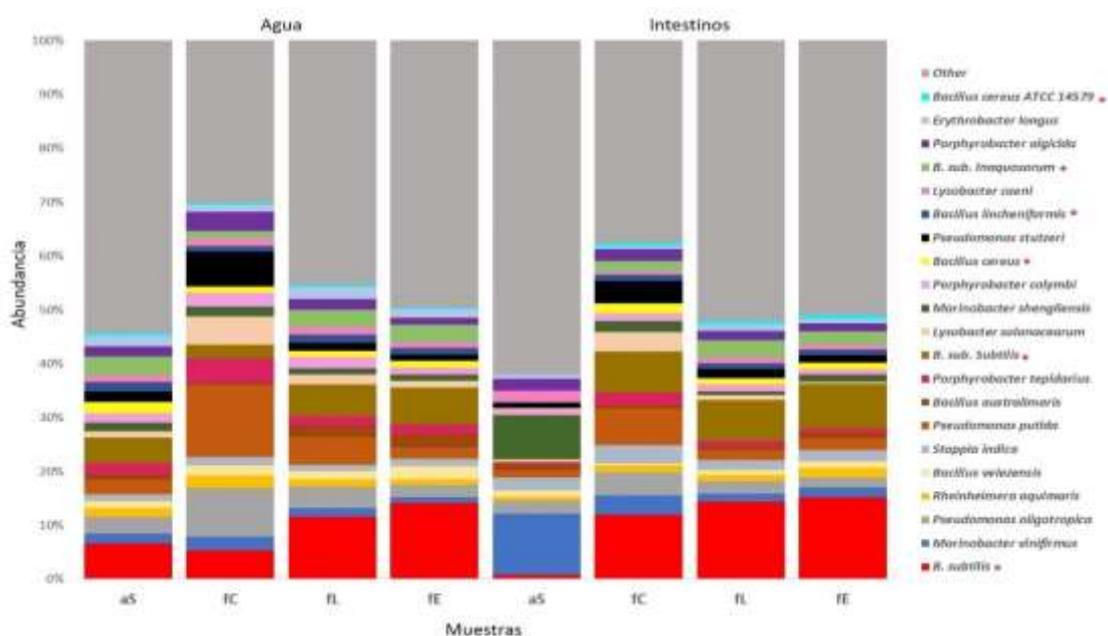
Las especies de *Bacillus* se encuentran comúnmente en una amplia gama de ambientes, incluyendo los sedimentos y el agua, por lo tanto, son ingeridas naturalmente por los camarones (Purivirojkul, 2007). Esto es coherente con la presencia de las cuatro especies de *Bacillus* encontradas en los intestinos de las larvas antes de la siembra. Después del primer mes de cultivo *B. subtilis* y *B. subsps subtilis*, representaron los mayores niveles de abundancias en fC (12 y 7,6%), fL (14,3 y 7,6%) y fE (15,3 y 8,4%) mientras que *B. subtilis subsps. inaquosuorum*, *B. lincheniformis*, *B. cereus* y *B. cereus ATCC 14579* mostraron abundancias relativas en fC (2,05, 1,08, 1,88 y 0,59%), fL (3,3, 1,02, 1,22 y 0,61%) y fE (2,5, 1,09, 1,2 y 0,73%), respectivamente.

B. subtilis es la especie mejor caracterizada del género, su genoma está totalmente secuenciado, puede formar una endospora resistente y protectora que le permite tolerar condiciones extremas como crecer en ambientes aeróbicos, anaeróbicos, cambios de temperatura y pH extremos que pueden ser perjudiciales para otras cepas; éste podría ser el motivo por el cual fue la especie más abundante dentro del sistema durante todo el ciclo de cultivo. En este sentido, *B. subtilis* y sus subespecies representan un grupo ideal de bacterias

probióticas para la inoculación de cultivos RAS - BIOFLOC a baja salinidad (Dunlap *et al.*, 2020; Olmos *et al.*, 2019 y Abriouel *et al.*, 2011).

Figura 7.

Diversidad bacteriana a nivel de especie en muestras de agua e intestinos de L. vannamei en el sistema RAS-BIOFLOC, correspondiente a las diferentes fases de cultivo, antes de siembra de larvas (aS), final de cría (fC), final de levante (fL) y final de engorde (fE).



4.4.1. Diversidad alfa en muestras de agua e intestino

Para conocer la biodiversidad entre las muestras se calcularon los índices de Simpson y Shannon. Se pudo observar que la biodiversidad microbiana en las muestras arroja valores similares donde todas las muestras tuvieron un índice Simpson entre 0,98 y 0,99. El índice Simpson es un parámetro que nos permite medir la riqueza de organismos en una muestra y su valor varía entre 0 y 1, cuanto más se acerca a uno hay mayor posibilidad de dominancia de unas pocas especies en una población (Roswell *et al.*, 2021). En nuestros resultados podemos observar que el índice de Simpson en todas las muestras está próximo a la unidad, esto indicaría que unos pocos taxones tienen la mayor abundancia (Tabla 2). Ello concuerda con lo encontrado, donde *Bacillus* y *Pseudomonas* muestran la mayor abundancia en todas las muestras.

Por otro lado, los resultados del índice Shannon, que se usa para medir la biodiversidad específica dentro de una muestra (0,5 y 5), mostraron valores entre 4,28 y 4,94. Valores inferiores a 2 se consideran bajos en diversidad (Roswell *et al.*, 2021). Bajo estas consideraciones en este estudio se puede observar valores cercanos a 5 lo que indica una alta diversidad bacteriana en todas las muestras (Tabla 2).

Tabla 2.

Índices de diversidad alfa Shannon y Simpson en muestras de agua e intestino.

Muestra	Observado	Diversidad Gini Simpson	Diversidad Shannon
aS-A	233	0,993	4,913
fC-A	187	0,989	4,856
fL-A	147	0,982	4,429
fE-A	180	0,989	4,817
aS-I	202	0,992	4,952
fC-I	141	0,988	4,645
fL-I	100	0,983	4,277
fE-I	154	0,986	4,558

4.5. Análisis metagenómico de las poblaciones microalgales de agua e intestino.

Las ocho muestras utilizadas para el análisis bacteriano, correspondientes a intestinos y agua (aS, fC, fL, y fE) fueron también utilizadas para el análisis de secuencias de ARNr 23S dirigido a la comunidad microalgal. Los seis géneros microalgales *Gomphoneis*, *Navicula*, *Thalassiosira*, *Isochrysis*, *Chaetoceros* y *Pavlova*, a los cuales pertenecen las cepas inoculadas, fueron encontrados en todas las fases de cultivo, tanto en agua como en intestinos. *Gomphoneis*, *Navicula*, *Thalassiosira* e *Isochrysis* fueron los más abundantes, sin embargo, sus niveles de abundancia difirieron entre las muestras de agua e intestinos.

En muestras de agua los más abundantes fueron, *Gomphoneis* (aS: 44,3%; fC: 39,1%; fL: 40,6% y fE 42,2%) y *Navicula* (aS: 32,9; fC: 28,6; fL: 33,3% y fE: 32,4%), seguidos por *Thalassiosira* (aS: 10%; fC: 16,8%; fL: 9,9% y fE: 13,7%) e *Isochrysis* (aS: 6,4%; fC: 8%; fL: 5,2% y fE: 5,6%) mostrando estabilidad de estos géneros durante el ciclo de cultivo. *Chaetoceros* (aS: 2,7, fC: 1,2, fL: 1 y

fE: 2,1%) y *Pavlova* (aS: 0,2, fC: 0,8, fL: 0,5 y fE: 0,1%) mostraron los niveles más bajos respecto a los 6 géneros inoculados. Cabe resaltar que las especies de microalgas utilizadas fueron adaptadas a las condiciones de baja salinidad lo que podría explicar estos resultados considerando los reportes de que la concentración de sales inorgánicas disueltas en el agua puede, potencialmente, afectar al crecimiento de las microalgas en función de su actividad osmótica (Haris *et al.*, 2022).

La tolerancia a la sal varía según las especies, algunas sólo pueden tolerar concentraciones milimolares de sal mientras que otras sobreviven en soluciones saturadas (Leal, 2013). El efecto de la salinidad adquiere más influencia cuando se relaciona con otras variables como la temperatura, luz, fuente de nitrógeno, carga orgánica y concentración de nutrientes (Montes-González *et al.*, 2021 y Ahmad *et al.*, 2020). Varias especies del género *Gomphoneis* han sido relacionadas con hábitats eutróficos y se desarrollan muy bien en ambientes con altas cargas orgánicas lo cual es propio de las condiciones de este trabajo por lo que podría ser este el motivo de que este género, en particular, se destacara dentro de la comunidad microalgal en agua (Kociolek y Stoermer, 1988). Por otro lado, varios autores han reportado que las diatomeas como *Navicula*, *Thalassiosira* e *Isochrysis* se encuentran en todo tipo de agua, desde agua de mar hasta agua dulce, oligotróficas hasta eutróficas, pero tienen mejor crecimiento en salinidades entre 20 y 30 ppt (Wardi *et al.*, 2023; Garcia *et al.*, 2012 y Haris *et al.*, 2022).

Así también, varios reportes indican que *Chaetoceros* y *Pavlova* han demostrado tener un mejor desarrollo en niveles de salinidades de 30 y 35 ppt, respectivamente, presentando limitaciones en su desarrollo en aguas con salinidades por debajo de estos niveles (Adenan *et al.*, 2013 y Shah *et al.*, 2014). El bajo nivel de salinidad (4 ppt) utilizado en este trabajo pudo ser un limitante para el buen desarrollo de estos dos géneros que mostraron los niveles más bajos de abundancia respecto a las cepas inoculadas. Además, también se ha reportado que *Pavlova* es más sensible a bajos niveles de salinidad en presencia de carbono orgánico (Bashir *et al.*, 2019) lo que podría ser el motivo por el cual

Pavlova fue el género menos abundante de los seis inoculados en el sistema RAS-BIOFLOC a baja salinidad.

Estos resultados confirman que varias especies de microalgas pueden adaptarse a amplios rangos de salinidades. Sin embargo, los niveles de salinidad y carga orgánica pueden llegar a tener una influencia directa sobre el desarrollo de algunas especies como se pudo ver en este estudio donde la baja salinidad y alta carga orgánica favorecieron el crecimiento de los géneros *Gomphoneis*, *Navicula*, *Thalassiosira* e *Isochrysis* pero a su vez limitaron el buen crecimiento y desarrollo a las microalgas *Chaetoceros* y *Pavlova*, las cuales tienen mejor crecimiento en ambientes marinos.

Por su parte en intestinos de larvas aS se encontró que *Chaetoceros* (65,3%) y *Thalassiosira* (27,8%) tuvieron el mayor nivel de abundancia, representando el 93,1% de la comunidad microalgal, estos resultados eran esperados ya que estas especies son predominantemente utilizadas en las primeras etapas de la larvicultura. Se encontró también presencia, en bajas proporciones de *Navicula* (1,5%), *Isochrysis* (1,3%), y *Pavlova* (0,7%), así como ausencia de *Gomphoneis*. En fC, fL y fE los géneros más abundantes fueron *Navicula* (35,7, 40,8 y 34,9%) e *Isochrysis* (24,4, 18,2 y 20,9%), seguidos de *Gomphoneis* (12,5, 17 y 17,8%), *Thalassiosira* (9,8, 8,5 y 9,1%), *Chaetoceros* (9,1, 6,9 y 7%) y *Pavlova* (0,2, 0,1 y 0,4%) (Fig.8).

Algunas microalgas al igual que las bacterias tienen la capacidad de sintetizar exopolisacáridos (EPS) que son macromoléculas de carbohidratos unidas a proteínas y que se excretan y acumulan extracelularmente dando al cultivo un aspecto mucilaginoso. Ello les confiere a ciertas especies de microalgas una propiedad de pegajosidad generando un adhesivo que favorece la unión entre microalgas, bacterias y otras partículas. Algunas de estas colisiones dan como resultado la formación de agregados o bioflóculos (Thornton, 2002).

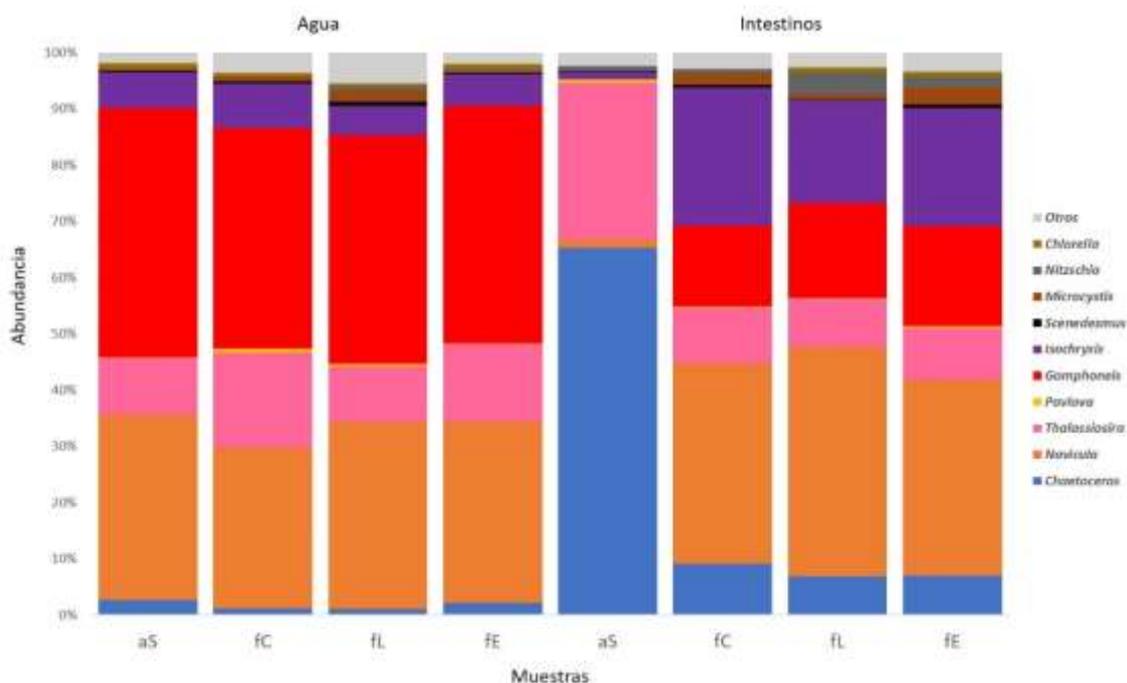
Precisamente, varios reportes han descrito que las diatomeas *Navículas*, *Thalassiosira*, *Chaetoceros* y *Gomphoneis* tienen propiedades de unión debido a su capacidad de producción de EPS; sin embargo, la capacidad de agregación depende de cada especie (Sanka *et al.*, 2017; Daglio *et al.*, 2018; Fimbres-

Olivarria *et al.*, 2018; León *et al.*, 2020 y Chen *et al.*, 2019). Jimenez *et al.*, (2021) en su trabajo concluyeron que las *Navículas* mejoran la formación de biofloc al segregar estas sustancias mucilaginosas y adherir bacterias para estimular la formación de bioflóculos. Por ello estos hallazgos en investigaciones previas conllevan a hipotetizar que en este trabajo *Navícula* se destacó como el género más abundante en intestinos debido a que por sus propiedades de unión a sustratos estaría en mayores proporciones en los bioflóculos que son ingeridos por los camarones.

Hay también evidencias que muestran a *Isochrysis* como una buena microalga productora de exopolisacáridos. Sun *et al.*, (2014) encontraron que *Isochrysis galbana* es una especie rica en EPS con un contenido de hasta un 25% del peso de células secas. Marker, (1965) investigó el efecto de la salinidad sobre la producción de EPS en *I. galbana* encontrando un aumento de la producción extracelular de EPS a una salinidad reducida; también parecía haber una tendencia a que la proporción de EPS se relacionara con la formación de agregados. Estas informaciones la convierten en otra buena candidata para estimular la formación de bioflóculos lo cual fue bien marcado en este trabajo mostrando una gran diferencia entre sus niveles de abundancia en el agua (5 y 8%) e intestinos (18 y 24%) reflejando así una gran capacidad de bioagregación en cultivos biofloc a baja salinidad. Al igual que en el agua *Pavlova* fue el género menos abundante en los intestinos de los animales en todas las fases de cultivo, esto podría deberse a su sensibilidad a bajos niveles de salinidad y carga orgánica lo cual tiene relación con las condiciones dadas en este trabajo en el sistema RAS-BIOFLOC (Bashir *et al.*, 2019).

Figura 8.

Diversidad microalgal a nivel de género en muestras de agua e intestinos de L. vannamei en el sistema RAS-BIOFLOC, correspondiente a las diferentes fases de cultivo, antes de siembra de larvas (aS), final de cría (fC), final de levante (fL) y final de engorde (fE).



La comunidad microalgal fue también analizada a nivel de especie con el objetivo de monitorear individualmente las cepas inoculadas y corroborar que lo encontrado a nivel de género fue dado por la participación de las mismas, encontrando que las diez especies inoculadas, *T. weissflogii*, *T. pseudonana*, *P. gyrans*, *C. gracilis*, *C. calcitrans*, *N. cryptocephala*, *N. glaciei*, *N. cf. perminuta*, *G. minuta* var. *cassieae* e *I. galbana* representaron más del 90% en todas las fases de cultivo en agua e intestinos. Exceptuando la muestra de intestino de larvas aS donde *C. calcitrans* (55,2%), *T. weissflogii* (15,9%), *C. gracilis* (13,0%) y *T. pseudonana* (10,7%) fueron las especies más abundantes en concordancia con lo encontrado a nivel de género (93,1%) mientras *I. galbana* y *P. gyrans* fueron encontradas en proporciones de 1,2 y 0,6%, respectivamente. *G. minuta*, *N. cf. perminuta*, *N. glaciei* y *N. cryptocephala* estuvieron ausentes en esta muestra.

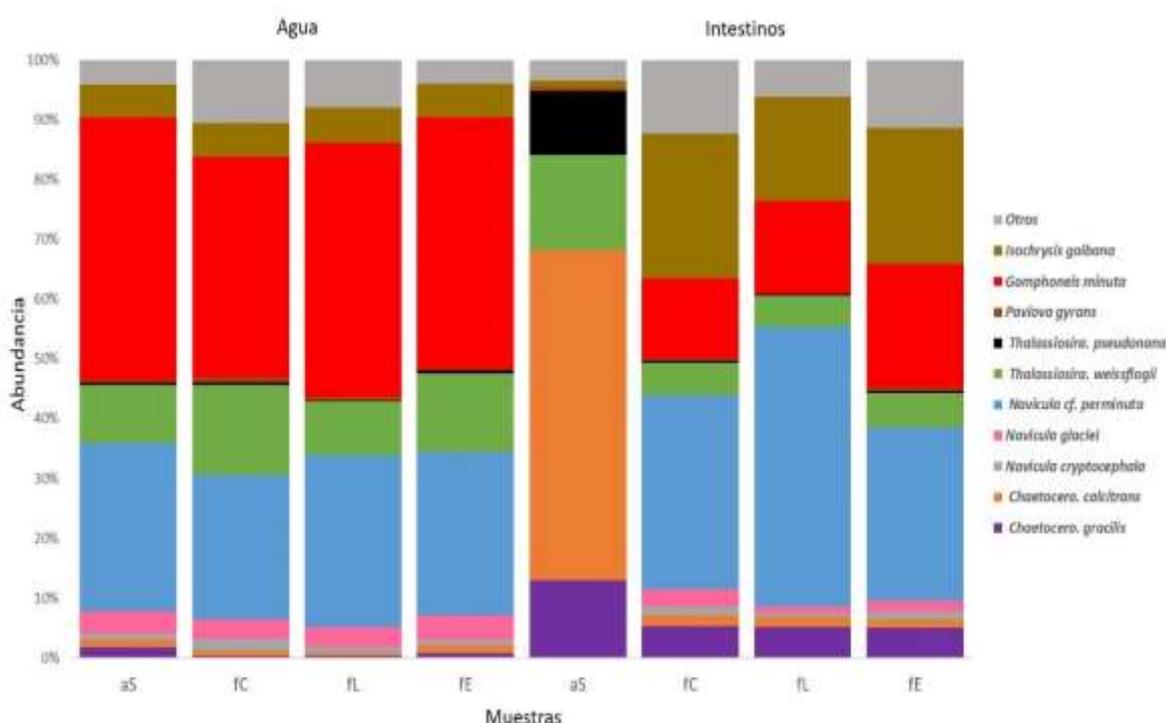
Después del primer mes de cultivo en intestinos en las fases fC, fL y fE las especies más abundantes fueron *N. cf. perminuta*, (32,5, 46.8 y 29%), *I. galbana* (24,1, 17,4 y 22,7%), *G. minuta* (13,5, 15,5 y 28,8%), *T. weissflogii* (9,4, 8,2 y 8,7%) y *C. gracilis* (7,3, 5,2 y 5%) mientras que *N. glaciei* (2,8, 1,1 y 1,8%), *C. calcitrans* (1,8, 1,6 y 1,4%), *N. cryptocephala* (1,5, 0,7 y 1,4%), *T. pseudonana* (0,4, 0,2 y 0,4%) y *P. gyrans* (0,3, 0,1 y 0,4%) estuvieron presentes durante el ciclo de cultivo en proporciones inferiores al 3%.

En muestras de agua de aS, fC, fL y fE las especies *G. minuta* (44,1, 37, 42,6 y 42,2%), *N. cf. perminuta* (28,1, 24,2, 28,7 y 27,3%), *T. weissflogii* (9,8, 15,1, 9 y 13,2%) e *I. galbana* (6,4, 9,9, 5,8, 5,6%) fueron las más abundantes. Las cepas *N. glaciei* (3,8, 3,2, 3,3 y 4%), *C. calcitrans* (1,03, 0,8, 0,6, 1,4%), *N. Cryptocephala* (1, 2, 1 y 0,9%), *C. Gracilis* (1,7, 0,4, 0,3 y 0,8%), *T. pseudonana* (0,45, 0,41, 0,2 y 0,5%) y *P. gyrans* (0,2, 0,7, 0,5 y 0,1%) se mantuvieron en el agua hasta el final del ensayo en proporciones inferiores al 4%.

Los resultados a nivel de especie son similares a lo observado a nivel de género corroborando así que lo encontrado fue dado por la participación directa de las cepas microalgales inoculadas mostrando diferencias de abundancias entre las diferentes especies revelando que las cepas *G. minuta*, *N. cf. perminuta*, *T. weissflogii* e *I. galbana* fueron las mejores candidatas para inducir la formación de biofloculos por su capacidad de colonización del agua y buen desarrollo en sistemas RAS-BIOFLOC a baja salinidad con las condiciones dadas en este trabajo.

Figura 9.

*Diversidad microalgal a nivel de especie en muestras de agua e intestinos de *L. vannamei* en el sistema RAS-BIOFLOC, correspondiente a las diferentes fases de cultivo, antes de siembra de larvas (aS), final de cría (fC), final de levante (fL) y final de engorde (fE).*



4.6. Efecto del ambiente de crianza sobre la microbiota intestinal del camarón

En los ecosistemas acuáticos, las estrechas relaciones entre los microorganismos del entorno y del tracto digestivo de los animales cultivados está dada por la microbiota presente en el agua y su flujo constante a través del tracto digestivo del huésped afectando ya sea positiva o negativamente su microflora autóctona. El ambiente de crianza como salinidad, temperatura, pH y carga de nutrientes puede influir en las comunidades microbianas (Gatesoupe, 1999). Previa investigación han propuesto que la microbiota intestinal de los camarones depende de su entorno de cultivo (Chaiyapechara *et al.*, 2012; Harris, 1993 y Wang C *et al.*, 2014).

Para determinar la relación y diferencias de la composición bacteriana y microalgal presente en las muestras de agua e intestinos en este trabajo se llevó a cabo el análisis de diversidad beta calculado mediante un análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) (He, *et al.*, 2020 y Rungrassamee, *et al.*, 2013). A partir de todas las lecturas de los genes ARNr 16S y 23S, se obtuvo una evaluación a nivel de género y tiempo de muestreo de la separación de las muestras de agua (A) e intestinos (I) antes de la siembra de larvas (aS), final de cría (fC), final de levante (fL) y final de engorde (fE).

4.6.1. Evaluación de pca de las comunidades bacterianas.

El PCA basado en la abundancia relativa bacteriana de los resultados de la secuenciación por nanoporo ARNr 16S reveló poca relación entre las muestras de agua e intestinos al momento de la siembra de las larvas (aSA - aSI) indicando las diferencias que hay entre las comunidades bacterianas de estas dos muestras (Fig. 10).

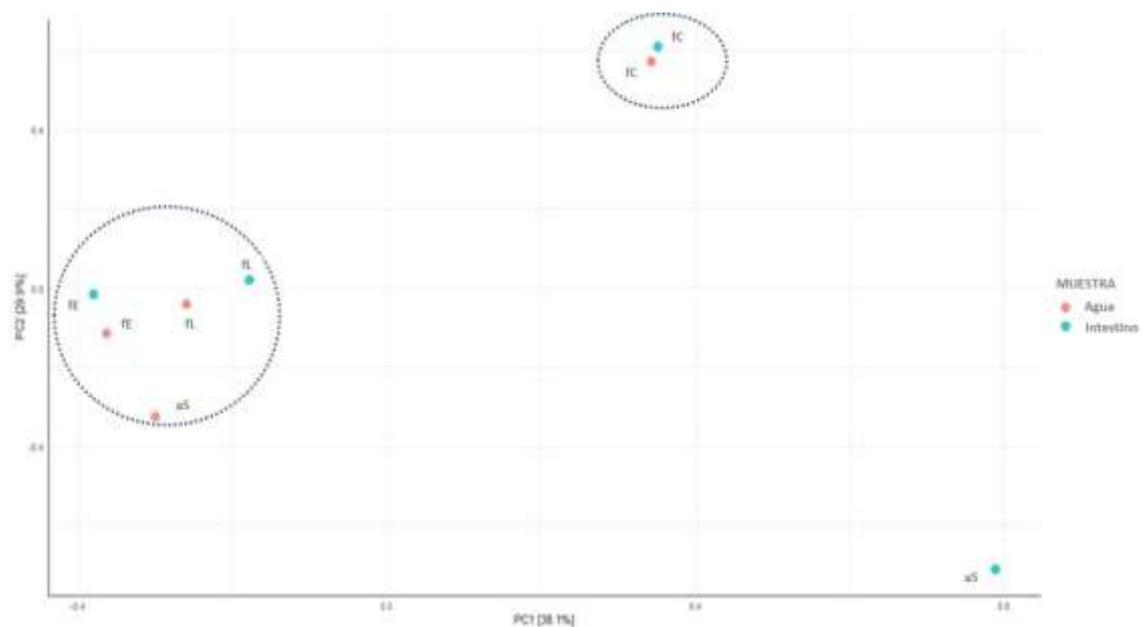
Esto se ajusta a lo esperado debido a que las larvas no habían estado aún en contacto con el agua de cultivo. Al primer mes de cultivo se pudo observar cercanía entre las muestras de agua e intestino (fCA - fCI) lo que denota una estrecha relación entre ambas; sin embargo, se observa un distanciamiento en relación a la microbiota inicial del agua (aSA) esto puede ser debido a que en este lapso de tiempo el tanque de cultivo presentó el pico de amonio lo cual pudo tener injerencia sobre la estructura de la microbiota presente en el agua de cultivo. Ha sido demostrado por varios investigadores que la carga elevada de nitrógeno afecta la estructura de la comunidad bacteriana en aguas de cultivo lo cual tiene relación con lo encontrado en esta fase (Fig. 10) (Lo *et al.*, 2022 y Wang *et al.*, 2022).

Las muestras de agua e intestinos correspondientes al segundo (fLA - fLI) y tercer mes (fEA - fEI) de cultivo mostraron cercanía de la comunidad bacteriana lo que revela una estrecha relación entre estas muestras, además, mostraron proximidad a la muestra de agua aSA que representa la microbiota inicial, esto indicaría que las cepas bacterianas inoculadas fueron capaces de posicionarse en la comunidad bacteriana del agua y modular la microflora intestinal de los animales después del segundo mes de cultivo.

Estos resultados tienen similitud con lo encontrado por Huang *et al.*, (2023) quienes evaluaron en un cultivo de juveniles de *L. vannamei*, con tecnología biofloc, los efectos de *Bacillus* en la formación de bioflóculos, en la calidad del agua y en el crecimiento del camarón, encontrando que las diferentes cepas de *Bacillus*, añadidas al inicio del cultivo, promovieron la formación de flóculos y elevaron el crecimiento de los camarones. En este trabajo se encontraron resultados similares, corroborando mediante metagenómica la presencia y abundancia de las cepas de *Bacillus* inoculadas al inicio del cultivo, tanto en agua como en intestinos. Por lo tanto, se demostró cepas de *Bacillus* inoculadas al inicio del cultivo en agua nueva y desinfectada pudieron establecerse en el sistema regulando la comunidad bacteriana del agua, estimulando la formación de bioflóculos, modulando y ejerciendo efectos probióticos sobre la microflora intestinal del camarón.

Figura 10.

Análisis de componente principal (PCA) de comunidades bacterianas en agua e intestinos de L. vannamei de un sistema RAS-BIOFLOC, en muestras tomadas en las fases de cultivo, antes de siembra de larvas (aS), final de cría (fC), final de levante (fL) y final de engorde (fE).



4.6.2. Evaluación de PCA de las comunidades microalgales.

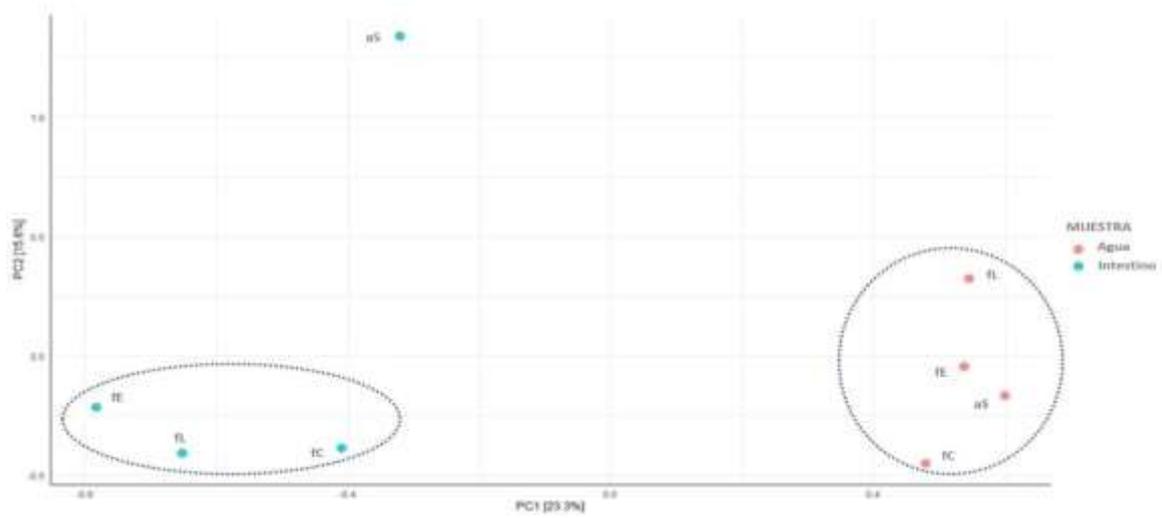
Los resultados de los análisis PCA dirigido al gen ARNr 23S mostraron una clara separación entre las comunidades microalgales del agua de cultivo y de los intestinos de los animales, revelando que no necesariamente las microalgas más abundantes en el agua son las que finalmente son aprovechadas como alimento por los animales cultivados. Esto podría deberse a que algunas microalgas se destacan en la formación de bioflóculos por su capacidad de bioagregarse por lo que podrían encontrarse en mayores proporciones en los bioflóculos que luego son utilizados como alimento por los camarones (Sanka *et al.*, 2017; Daglio *et al.*, 2018; Fimbres-Olivarria *et al.*, 2018; León *et al.*, 2020 y Chen *et al.*, 2019). Este hecho explicaría las diferencias de las abundancias microalgales entre las muestras de agua y de intestinos encontradas en este trabajo.

Por otro lado, se pudo observar que las muestras de agua aS, fC, fL y fE se agruparon entre sí, revelando una estrecha relación en la comunidad microalgal del agua durante todas las fases de cultivo, demostrando que las cepas microalgales inoculadas se mantuvieron en las mismas proporciones de abundancia durante el ciclo de cultivo (Fig. 11), lo cual tiene relación con lo encontrado a nivel de abundancia relativa donde *Gomphoneis*, *Navicula*, *Thalassiosira* e *Isochrysis* fueron las más abundantes en agua en todas las fases de cultivo.

Por su parte las muestras de intestinos fC, fL y fE se agruparon bien indicando que la comunidad microalgal presente en estas tres fases de cultivo fue similar mientras que la muestra aS se observa separada lo que indica poca similitud de la comunidad microalgal presente en los intestinos de las larvas antes de ser sembradas en el agua inoculada. Esta separación encontrada en la muestra aS puede deberse a que las larvas en sus primeros estadios fueron alimentadas con *Thalassiosira* y *Chaetoceros* por lo que la distancia encontrada entre esta muestra y las siguientes fases de cultivo era esperada.

Figura 11.

Análisis de componente principal (PCA) de comunidades microalgales en agua e intestinos de L. vannamei de un sistema RAS-BIOFLOC, en muestras tomadas en las fases antes de siembra de larvas (aS), final de cría (fC), final de levante (fL) y final de engorde (fE).



CAPITULO V

CONCLUSIONES

1. Mediante el análisis de secuencias nucleotídicas de los genes ARNr 16S y 23S fue posible determinar la persistencia y los niveles de abundancia de las seis cepas bacterianas y diez cepas microalgales inoculadas en el sistema híbrido RAS - BIOFLOC en el agua de cultivo e intestinos de *L. vanammei* por secuenciación nanoporo MinION.

2. Las seis cepas bacterianas probióticas *Bacillus subtilis*, *B. subsps. subtilis*, *B. subsps. inaquosorum*, *B. cereus*, *B. cereus ATCC14579* y *B. lincheniformis*) y diez cepas microalgales (*Thalassiosira weissflogii*, *T. pseudonana*, *Chaetoceros gracilis*, *C. calcitrans*, *Navicula cryptocephala*, *N. glaciei*, *N. Perminuta*, *Ghomphoneis minuta*, *Isochrysis galbana* y *Pavlova gryans*) inoculadas en el sistema persistieron durante el ciclo de cultivo tanto en agua como en los intestinos de los animales cultivados.

3. Se determinó que las cepas bacterianas (*B. subtilis*, *B. subsps. Subtilis*) y microalgales (*G. minuta*, *N. cf. perminuta*, *T. weissflogii* e *I. galbana*) fueron las más abundantes tanto en agua como en los intestinos de los animales cultivados lo que las posiciona como especies candidatas para establecimiento de un biofloc domesticado a baja salinidad.

4. La metagenómica es una herramienta fundamental para monitorear la comunidad microbiana en sistemas con tecnología biofloc permitiendo evaluar la participación de los microorganismos que integran los flóculos y la colonización del intestino de los animales cultivados.

CAPITULO VI

RECOMENDACIONES

1. Evaluar el efecto del uso de un biofloc domesticado que incluya las especies bacterianas *B. subtilis* y *B. subsps. Subtilis* y microalgales *G. minuta*, *N. cf. perminuta*, *T. weissflogii* e *I. galbana* sobre el crecimiento, supervivencia e inmunidad del camarón en un ciclo de producción intensiva.

2. Incorporar herramientas como la proteómica y metabolómica para evaluar otras especies de bacterias y microalgas con potencial para ser incorporadas al biofloc domesticado.

CAPITULO VII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abakari, G., Luo, G., & Kombat, E. O. (2020). Dynamics of nitrogenous compounds and their control in biofloc technology (BFT) systems: A review. *Aquaculture and Fisheries*, 6(5), 441–447.
- Abriouel, H., Franz, C. M. A. P., Omar, N. B., & Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(1), 201–232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
- Adenan, N. S., Yusoff, F. M., & Shariff, M. (2013). Effect of salinity and temperature on the growth of diatoms and green algae. *Journal of fisheries and aquatic science*, 8(2), 397–404. <https://doi.org/10.3923/jfas.2013.397.404>
- Aguilar Siguenza, D. A. (2018). *Control de buenas prácticas de manejo de los insumos en el cultivo semi intensivo de litopenaeus vannamei*. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/12902>
- Ahmad, S., Kothari, R., Shankarayan, R., & Tyagi, V. V. (2020). Temperature dependent morphological changes on algal growth and cell surface with dairy industry wastewater: an experimental investigation. *3 Biotech*, 10(1). <https://doi.org/10.1007/s13205-019-2008-x>
- Alves Neto, I., Brandão, H., Furtado, P. S., & Wasielesky, W., Jr. (2019). Acute toxicity of nitrate in *Litopenaeus vannamei* juveniles at low salinity levels. *Ciencia rural*, 49(1). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180439>
- Amit Roy, S. R. (2014). Molecular markers in phylogenetic studies-A review. *Journal of phylogenetics & evolutionary biology*, 02(02). <https://doi.org/10.4172/2329-9002.1000131>

- Astafyeva, Y., Gurschke, M., Qi, M., Bergmann, L., Indenbirken, D., de Grahl, I., Katzowitsch, E., Reumann, S., Hanelt, D., Alawi, M., Streit, W. R., & Krohn, I. (2022). Microalgae and bacteria interaction—evidence for division of diligence in the alga Microbiota. *Microbiology Spectrum*, 10(4). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00633-22>
- Athukorala, S. N. P., Fernando, W. G. D., & Rashid, K. Y. (2009). Identification of antifungal antibiotics of Bacillus species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(9), 1021–1032. <https://doi.org/10.1139/w09-067>
- Azim, M. E., & Little, D. C. (2008). The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 283(1–4), 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.036>
- Bailey-Brock, J. H., & Moss, S. M. (1992). PENAEID TAXONOMY, BIOLOGY AND ZOOGEOGRAPHY. En *Marine Shrimp Culture* (pp. 9–27). Elsevier.
- Bashir, K. M. I., Mansoor, S., Kim, N.-R., Grohmann, F. R., Shah, A. A., & Cho, M.-G. (2019). Effect of organic carbon sources and environmental factors on cell growth and lipid content of *Pavlova lutheri*. *Annals of Microbiology*, 69(4), 353–368. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1423-2>
- BIOAQUAFLOC. (2018, noviembre 27). ¿Cómo se generan los bioflóculos del biofloc?. De Bacterias al plancton. Bioaquafloc.com. <https://www.bioaquafloc.com/biofloc/como-se-generan-los-biofluculos-del-biofloc/>
- Califano, G., Castanho, S., Soares, F., Ribeiro, L., Cox, C. J., Mata, L., & Costa, R. (2017). Molecular taxonomic profiling of bacterial communities in a gilthead seabream (*Sparus aurata*) hatchery. *Frontiers in Microbiology*, 8, 204. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00204>
- Callac, N., Giraud, C., Boulo, V., Wabete, N., & Pham, D. (2023). Microbial biomarker detection in shrimp larvae rearing water as putative bio-surveillance proxies in shrimp aquaculture. *PeerJ*, 11(e15201), e15201. <https://doi.org/10.7717/peerj.15201>

- Cao, H., Chen, D., Guo, L., Jv, R., Xin, Y., Mo, W., Wang, C., Li, P., & Wang, H. (2022). Effects of *Bacillus subtilis* on growth performance and intestinal flora of *Penaeus vannamei*. *Aquaculture Reports*, 23(101070), 101070. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101070>
- Cardona, E., Gueguen, Y., Magré, K., Lorgeoux, B., Piquemal, D., Pierrat, F., Noguier, F., & Saulnier, D. (2016). Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. *BMC microbiology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0770-z>
- Carneiro Fidélis Silva, L., Santiago Lima, H., Antônio de Oliveira Mendes, T., Sartoratto, A., de Paula Sousa, M., Suhett de Souza, R., Oliveira de Paula, S., Maia de Oliveira, V., & Canêdo da Silva, C. (2019). Heterotrophic nitrifying/aerobic denitrifying bacteria: Ammonium removal under different physical-chemical conditions and molecular characterization. *Journal of Environmental Management*, 248(109294), 109294. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109294>
- Chaiyapechara, S., Rungrassamee, W., Suriyachay, I., Kuncharin, Y., Klanchui, A., Karoonuthaisiri, N., & Jiravanichpaisal, P. (2012). Bacterial community associated with the intestinal tract of *P. monodon* in commercial farms. *Microbial Ecology*, 63(4), 938–953. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9936-2>
- Chen, L., Weng, D., Du, C., Wang, J., & Cao, S. (2019). Contribution of frustules and mucilage trails to the mobility of diatom *Navicula* sp. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43663-z>
- Chen, R., Deng, M., He, X., & Hou, J. (2017). Enhancing nitrate removal from freshwater pond by regulating carbon/nitrogen ratio. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1712.
- Cortés-López, N. G., Ordóñez-Baquera, P. L., & Domínguez-Viveros, J. (2019). Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico. Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 11(4), 1150–1173.
- Daglio, Y., Sacristán, H., Ansaldo, M., & Rodríguez, M. C. (2018). Benthic diatoms from Potter Cove, 25 de Mayo (King George) Island, Antarctica: Mucilage and glucan storage as a C-source for limpets. *Polar Science*, 15, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.polar.2018.01.004>

- De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., & Verstraete, W. (2008). The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 277(3–4), 125–137. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.019>
- Dugassa, H., & Gaetan, D. G. (2018). Biology of White Leg Shrimp, *Penaeus vannamei*: Review. <https://doi.org/10.5829/idosi.wjfm.2018.05.17>
- Dunlap, C. A., Bowman, M. J., & Zeigler, D. R. (2020). Promotion of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* and *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* to species status. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01354-9>
- Durango, M. A. (2017). *ón del carácter probiótico de Bacillus sp y Bacterias ácido lácticas aisladas de intestinos de tilapia (Oreochromis) en estado de preceba*. Edu.co. http://repository.unilasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/2268/1/Caracter_probiotico_Bacillus_sp_BacteriasAcidoLacticas.pdf
- Emerenciano, Mauricio, Cuzon, G., Arévalo, M., Miquelajauregui, M. M., & Gaxiola, G. (2013). Effect of short-term fresh food supplementation on reproductive performance, biochemical composition, and fatty acid profile of *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared under biofloc conditions. *Aquaculture International: Journal of the European Aquaculture Society*, 21(5), 987–1007. <https://doi.org/10.1007/s10499-012-9607-4>
- Fan, Y., Wang, X., Wang, Y., Ye, H., Yu, X., Wang, S., Diao, J., Xu, L., Gai, C., Liu, H., & Ma, D. (2021). Effect of dietary *Bacillus licheniformis* on growth, intestinal health, and resistance to nitrite stress in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International: Journal of the European Aquaculture Society*, 29(6), 2555–2573. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00764-9>
- Ferreira, G. S., Bolívar, N. C., Pereira, S. A., Guertler, C., Vieira, F. do N., Mouriño, J. L. P., & Seiffert, W. Q. (2015). Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 448, 273–279.
- Fimbres-Olivarria, D., Carvajal-Millan, E., Lopez-Elias, J. A., Martinez-Robinson, K. G., Miranda-Baeza, A., Martinez-Cordova, L. R., Enriquez-Ocaña, F., & Valdez-

- Holguin, J. E. (2018). Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharides from *Navicula* sp. *Food hydrocolloids*, 75, 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.002>
- Gao, J., Zhu, T., Liu, C., Zhang, J., Gao, J., Zhang, J., Cai, M., & Li, Y. (2020). Ammonium removal characteristics of heterotrophic nitrifying bacterium *Pseudomonas stutzeri* GEP-01 with potential for treatment of ammonium-rich wastewater. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(6), 959–969. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02292-x>
- Garibay-Valdez, E., Martínez-Porchas, M., Calderón, K., Gollas-Galván, T., Martínez-Córdova, L. R., Vargas-Albores, F., & Arvayo, M. A. (2019). La microbiota del tracto digestivo de camarones peneidos: una perspectiva histórica y estado del arte//The gut microbiota of penaeid shrimp: a historical perspective and state of the art. *Biotechnia*, 22(1), 5–16.
- Gatesoupe, F. J. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 180(1–2), 147–165. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(99\)00187-8](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(99)00187-8)
- Gómez Expósito, R., Postma, J., Raaijmakers, J. M., & De Bruijn, I. (2015). Diversity and activity of *Lysobacter* species from disease suppressive soils. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1243. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01243>
- Guiasu, R. C., & Guiasu, S. (2014). Weighted Gini-Simpson quadratic index of biodiversity for interdependent species. *Natural science*, 06(07), 455–466. <https://doi.org/10.4236/ns.2014.67044>
- Dugassa, D. G. G. (2018). *Biology of White Leg Shrimp, Penaeus vannamei: Review*. Academia.edu. https://www.academia.edu/39669075/Biology_of_White_Leg_Shrimp_Penaeus_vannamei_Review
- Hargreaves. (2013). Biofloc production systems for aquaculture. *Southern Regional Aquaculture Center*, 16.
- Haris, N., Manan, H., Jusoh, M., Khatoon, H., Katayama, T., & Kasan, N. A. (2022). Effect of different salinity on the growth performance and proximate composition

- of isolated indigenous microalgae species. *Aquaculture Reports*, 22(100925), 100925. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100925>
- Harris, J. M. (1993). The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: A synthesis. *Microbial Ecology*, 25(3), 195–231. <https://doi.org/10.1007/BF00171889>
- Hatfield, R. G., Batista, F. M., Bean, T. P., Fonseca, V. G., Santos, A., Turner, A. D., Lewis, A., Dean, K. J., & Martinez-Urtaza, J. (2020). The application of nanopore sequencing technology to the study of dinoflagellates: A proof of concept study for rapid sequence-based discrimination of potentially harmful algae. *Frontiers in Microbiology*, 11, 844. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00844>
- He, Z., Pan, L., Zhang, M., Zhang, M., Huang, F., & Gao, S. (2020). Metagenomic comparison of structure and function of microbial community between water, effluent and shrimp intestine of higher place *Litopenaeus vannamei* ponds. *Journal of Applied Microbiology*, 129(2), 243–255. <https://doi.org/10.1111/jam.14610>
- Higgins, P. (2014, diciembre 3). *Super-Intensive Shrimp Aquaculture Provides a Look Into the Future*. Ysi.com. <https://www.ysi.com/ysi-blog/water-blogged-blog/2014/03/super-intensive-shrimp-aquaculture-provides-a-look-into-the-future>
- Holan, A. B., Good, C., & Powell, M. D. (2020). Health management in recirculating aquaculture systems (RAS). En *Aquaculture Health Management* (pp. 281–318). Elsevier.
- Hosokawa, S., Momota, K., Chariton, A. A., Naito, R., & Nakamura, Y. (2021). The use of diversity indices for local assessment of marine sediment quality. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94636-0>
- Huang, H.-H., Li, C.-Y., Lei, Y.-J., Zhou, B.-L., Kuang, W.-Q., Zou, W.-S., & Yang, P.-H. (2023). Effects of *Bacillus* strain added as initial indigenous species into the biofloc system rearing *Litopenaeus vannamei* juveniles on biofloc preformation, water quality and shrimp growth. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 569(739375), 739375. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739375>

- Intriago, J. (2018). *Metagenómica de la microbiota de juveniles del Litopenaeus vannamei inoculados con bacterias probióticas y patógenas*. Redalyc.org. <https://www.redalyc.org/journal/494/49460615001/html/>
- Islam, T., Rabbee, M. F., Choi, J., & Baek, K.-H. (2022). Biosynthesis, molecular regulation, and application of bacilysin produced by *Bacillus* species. *Metabolites*, 12(5), 397. <https://doi.org/10.3390/metabo12050397>
- Jiménez-Ordaz, F. J., Cadena-Roa, M. A., Pacheco-Vega, J. M., Rojas-Contreras, M., Tovar-Ramírez, D., & Arce-Amezquita, P. M. (2021). Microalgae and probiotic bacteria as biofloc inducers in a hyper-intensive Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) culture. *Latin american journal of aquatic research*, 49(1), 155–168.
- John P. Kociolek and Eugene F. Stoermer. (1988). *Ultrastructure and Distribution of Gomphoneis herculeana, G. eriense and Closely Related Species (Naviculales: Gomphonemataceae)*.
- Kim, M., Jeong, S.-Y., Yoon, S. J., Cho, S. J., Kim, Y. H., Kim, M. J., Ryu, E. Y., & Lee, S.-J. (2008). Aerobic denitrification of *Pseudomonas putida* AD-21 at different C/N ratios. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(5), 498–502. <https://doi.org/10.1263/jbb.106.498>
- Kristian, R. S. R. D. (2015). Uji Aktivitas Antioksidan Mikroalga Air Tawar. *J. Medula*, 3, 201–207.
- Kristyanto, S., Lee, S. D., & Kim, J. (2017). *Porphyrobacter algicida* sp. nov., an algalytic bacterium isolated from seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(11), 4526–4533. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002324>
- Koumoutsis, A., Chen, X.-H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J., & Borriss, R. (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of Bacteriology*, 186(4), 1084–1096. <https://doi.org/10.1128/jb.186.4.1084-1096.2004>
- Kubitza, F. (2017, enero 23). *El parámetro de calidad del agua a menudo ignorado: pH*. Global Seafood Alliance. <https://www.globalseafood.org/advocate/el-parametro-de-calidad-del-agua-a-menudo-ignorado-ph/>

- Le, D. H., Nguyen, N. T., Dang, O. H. T., Steinert, G., Tran, T. T., Vu, T. H., Sipkema, D., & Chu, H. H. (2019). Characterization of bacterial community in the gut of *Penaeus monodon* and its culture water in shrimp ponds. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 19(11). https://doi.org/10.4194/1303-2712-v19_11_09
- Leal, S. (2013). Concentration and organic and proximate compositions of two benthic diatoms species at different salinities. *Universidad y ciencia*, 29, 45–52.
- León, P. F., Vásquez, P. F., Sulca-Quispe, L., & Almanza-Marroquín, V. (2020). Proliferaciones mucosas ocasionadas por *Gomphonema minuta* (Stone) Kociolek & Stoermer en ríos de Arequipa, Perú. *Idesia*, 38(1), 85–92. <https://doi.org/10.4067/s0718-34292020000100085>
- Maicá, P. F., Borba, M. R. de, Martins, T. G., & Wasielesky Junior, W. (2014). Effect of salinity on performance and body composition of Pacific white shrimp juveniles reared in a super-intensive system. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 43(7), 343–350.
- Marker, A. F. H. (1965). Extracellular carbohydrate liberation in the flagellates *Isochrysis galbana* and *Prymnesium parvum*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. *Marine Biological Association of the United Kingdom*, 45(3), 755–772. <https://doi.org/10.1017/s002531540001657x>
- Mayers, J. J., Vaiciulyte, S., Malmhäll-Bah, E., Alcaide-Sancho, J., Ewald, S., Godhe, A., Ekendahl, S., & Albers, E. (2018). Identifying a marine microalgae with high carbohydrate productivities under stress and potential for efficient flocculation. *Algal Research*, 31, 430–442. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.034>
- Miranda-Baeza, José Alberto Huerta-Rábago, Jesús Alberto Lizárraga-Armenta. (2020). *Cultivo intensivo de camarón blanco (Litopenaeus vannamei) con tecnología de biofloc (BFT)*. Researchgate.net. https://www.researchgate.net/publication/340464553_Cultivo_intensivo_de_camaron_blanco_Litopenaeus_vannamei_con_tecnologia_de_biofloc_BFT
- Montes-González, O., González-Silvera, A., Valenzuela-Espinoza, E., Santamaría-del-Ángel, E., & López-Calderón, J. (2021). Effect of light intensity and nutrient concentration on growth and pigments of the green microalga *Tetraselmis*

suecica. *Latin american journal of aquatic research*, 49(3), 431–441.
<https://doi.org/10.3856/vol49-issue3-fulltext-2632>

Mora, I., Cabrefiga, J., & Montesinos, E. (2011). Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 14(4), 213–223.
<https://doi.org/10.2436/20.1501.01.151>

NavinChandran, M., Iyapparaj, P., Moovendhan, S., Ramasubburayan, R., Prakash, S., Immanuel, G., & Palavesam, A. (2014). Influence of probiotic bacterium *Bacillus cereus* isolated from the gut of wild shrimp *Penaeus monodon* in turn as a potent growth promoter and immune enhancer in *P. monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*, 36(1), 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.004>

Nayak, S. K. (2021). Multifaceted applications of probiotic *Bacillus* species in aquaculture with special reference to *Bacillus subtilis*. *Reviews in Aquaculture*, 13(2), 862–906. <https://doi.org/10.1111/raq.12503>

Noor, A. O., Almasri, D. M., Basyony, A. F., Albohy, A., Almutairi, L. S., Alhamadi, S. S., Alkhamisi, M. A., Alsharif, S. A., & Elfaky, M. A. (2022). Biodiversity of N-acyl homoserine lactonase (aiiA) gene from *Bacillus subtilis*. *Microbial Pathogenesis*, 166(105543), 105543.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105543>

Ohse, S., Bianchini Derner, R., Ozório, R. Á., Gordo Corrêa, R., Furlong, E. B., Cesar, P., & Cunha, R. (2015). *Lipid content and fatty acid profiles in ten species of microalgae*. Conicyt.cl. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/idesia/v33n1/art10.pdf>

Olmos, J., Acosta, M., Mendoza, G., & Pitones, V. (2019). *Bacillus subtilis*, una bacteria probiótica ideal para la acuicultura de camarones y peces que aumenta la digestibilidad del alimento, previene enfermedades microbianas y evita la contaminación del agua. *Archivos de Microbiología*.
<https://doi.org/10.1007/s00203-019-01757-2>

Oxford, N. (2019). Rapid sequencing amplicons - 16S barcoding (SQK-16S024). Nanoporetech.com.
https://community.nanoporetech.com/docs/prepare/library_prep_protocols/16S-barcoding-1-24/v/16s_9086_v1_revx_14aug2019

- Parker, J. C., Conte, F. S., MacGrath, W. S., & Miller, B. W. (2009). An intensive culture system for penaeid shrimp. *Proceedings of the ... Annual Meeting*, 5(1–4), 65–79.
- Pimentel, O. A. L. F., Amado, A. M., & They, N. H. (2023). Biofloc colors as an assessment tool for water quality in shrimp farming with BFT systems. *Aquaculture Engineering*, 101(102321), 102321. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2023.102321>
- Purivirojkul, W. (2007). *Application of Bacillus spp. Isolated from the Intestine of Black Tiger Shrimp (Penaeus monodon Fabricius) from Natural Habitat for Control Pathogenic Bacteria in Aquaculture*.
- Qiao, L., Chang, Z., Li, J., & Chen, Z. (2020). Phytoplankton community succession in relation to water quality changes in the indoor industrial aquaculture system for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 527(735441), 735441. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735441>
- Quijano, G., Arcila, J. S., & Buitrón, G. (2017). Microalgal-bacterial aggregates: Applications and perspectives for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, 35(6), 772–781. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.07.003>
- Quiroga, C. (2016). Las tecnologías «ómicas»: situación actual y desafíos futuros. *Revista Argentina de microbiología*, 48(4), 265–266.
- Rahman, F. B., Sarkar, B., Moni, R., & Rahman, M. S. (2021). Molecular genetics of surfactin and its effects on different sub-populations of *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands)*, 32(e00686), e00686. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00686>
- Ramarathnam, R., Bo, S., Chen, Y., Fernando, W. G. D., Xuewen, G., & de Kievit, T. (2007). Molecular and biochemical detection of fengycin- and bacillomycin D-producing *Bacillus* spp., antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(7), 901–911. <https://doi.org/10.1139/w07-049>
- Renaud, S. M., Parry, D. L., & Thinh, L.-V. (1994). Microalgae for use in tropical aquaculture I: Gross chemical and fatty acid composition of twelve species of

- microalgae from the Northern Territory, Australia. *Journal of Applied Phycology*, 6(3), 337–345. <https://doi.org/10.1007/bf02181948>
- Rogers, S. O., & Bendich, A. J. (1994). Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. En *Plant Molecular Biology Manual* (pp. 183–190). Springer Netherlands.
- Roldán, L. F. (2020, abril 28). Qué es el ZOOPLANCTON - definición, características y ejemplos. *ecologiaverde.com*. <https://www.ecologiaverde.com/que-es-el-zooplanton-2666.html>
- Romano, N., Dauda, A. B., Ikhsan, N., Karim, M., & Kamarudin, M. S. (2018). Fermenting rice bran as a carbon source for biofloc technology improved the water quality, growth, feeding efficiencies, and biochemical composition of African catfish *Clarias gariepinus* juveniles. *Aquaculture Research*, 49(12), 3691–3701. <https://doi.org/10.1111/are.13837>
- Roswell, M., Dushoff, J., & Winfree, R. (2021). A conceptual guide to measuring species diversity. *Oikos* (Copenhagen, Denmark), 130(3), 321–338. <https://doi.org/10.1111/oik.07202>
- Roy, S. S., & Pal, R. (2015). Microalgae in aquaculture: A review with special references to nutritional value and fish dietetics. *Proceedings of the Zoological Society*, 68(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s12595-013-0089-9>
- Rungrassamee, W., Klanchui, A., Chaiyapechara, S., Maibunkaew, S., Tangphatsornruang, S., Jiravanichpaisal, P., & Karoonuthaisiri, N. (2013). Bacterial population in intestines of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under different growth stages. *PloS One*, 8(4), e60802. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060802>
- Samocha, T. M., & Prangnell, D. I. (2019). Water Quality Management. En *Sustainable Biofloc Systems for Marine Shrimp*. Elsevier.
- Sanka, I., Suyono, E. A., & Alam, P. (2017). The effects of diatom pore-size on the structures and extensibilities of single mucilage molecules. *Carbohydrate research*, 448, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2017.05.014>

- Shah, S. M. U., Che Radziah, C., Ibrahim, S., Latiff, F., Othman, M. F., & Abdullah, M. A. (2014). Effects of photoperiod, salinity and pH on cell growth and lipid content of *Pavlova lutheri*. *Annals of Microbiology*, 64(1), 157–164. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0645-6>
- Sherwood, A. R., & Presting, G. G. (2007). UNIVERSAL PRIMERS AMPLIFY A 23S rDNA PLASTID MARKER IN EUKARYOTIC ALGAE AND CYANOBACTERIA. *Journal of Phycology*, 43(3), 605–608. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00341.x>
- Siew S. W., Kosnin I. N., Zulkifli N. F., Ahmad H. F., Zamri N., Yusof M. F., & Gazali A. M. (2023). Characterization of bacterial communities in prebiotics and probiotics treated shrimp farms from Kuantan. *Malaysian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.21161/mjm.220048>
- Suantika, Gede, Situmorang, M. L., Kurniawan, J. B., Pratiwi, S. A., Aditiawati, P., Astuti, D. I., Azizah, F. F. N., Djohan, Y. A., Zuhri, U., & Simatupang, T. M. (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 in Gresik, East Java, Indonesia. *Aquaculture Engineering*, 82, 12–24.
- Sumi, C. D., Yang, B. W., Yeo, I.-C., & Hahm, Y. T. (2015). Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(2), 93–103. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0613>
- Sun, Y., Wang, H., Guo, G., Pu, Y., & Yan, B. (2014). The isolation and antioxidant activity of polysaccharides from the marine microalgae *Isochrysis galbana*. *Carbohydrate Polymers*, 113, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.058>
- 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 & Shellfish Immunology*, 106, 733–741. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.08.042>

- Thorner, K., Verner-Jeffreys, D., Hinchliffe, S., Rahman, M. M., Bass, D., & Tyler, C. R. (2020). Evaluating antimicrobial resistance in the global shrimp industry. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 966–986.
- Thornton, D. C. O. (2002). Diatom aggregation in the sea: mechanisms and ecological implications. *European journal of phycology*, 37(2), 149–161. <https://doi.org/10.1017/s0967026202003657>
- Trung Tran, T., Bott, N. J., Dai Lam, N., Trung Nguyen, N., Hoang Thi Dang, O., Hoang Le, D., Tung Le, L., & Hoang Chu, H. (2019). The role of *Pseudomonas* in heterotrophic nitrification: A case study on shrimp ponds (*Litopenaeus vannamei*) in Soc Trang province. *Microorganisms*, 7(6), 155. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060155>
- Vargas-Albores, F., Martínez-Porchas, M., Arvayo, M. A., Villalpando-Canchola, E., Gollas-Galván, T., & Porchas-Cornejo, M. A. (2016). Immunophysiological response of pacific white shrimp exposed to a probiotic mixture of Proteobacteria and Firmicutes in farm conditions. *North American Journal of Aquaculture*, 78(3), 193–202. <https://doi.org/10.1080/15222055.2016.1167797>
- Wang, M., Fan, Z., Wang, R., Liu, Z., Gao, F., Zhang, Z., Yi, M., & Lu, M. (2022). Nitrogen removal performance, and microbial community structure of water and its association with nitrogen metabolism of an ecological engineering pond aquaculture system. *Aquaculture Reports*, 25(101258), 101258. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101258>
- Wang, Y., Tian, R. M., Gao, Z. M., Bougouffa, S., & Qian, P.-Y. (2014). Optimal eukaryotic 18S and universal 16S/18S ribosomal RNA primers and their application in a study of symbiosis. *PloS One*, 9(3), e90053.
- Wang, Y.-N., He, W.-H., He, H., Du, X., Jia, B., Zeng, Z.-P., An, M.-L., & Chen, G.-C. (2012). *Pseudomonas nitritireducens* sp. nov., a nitrite reduction bacterium isolated from wheat soil. *Archives of Microbiology*, 194(10), 809–813. <https://doi.org/10.1007/s00203-012-0838-6>
- Wardi, Pagi Sektiana, S., & Suprakto, B. (2023). *Navicula* sp Cell growth at different salinities. *International Journal of Multidisciplinary Research and Growth Evaluation*, 4(1), 401–405. <https://doi.org/10.54660/ijmrge.2023.4.1.401-405>

- Wei, G., Shan, D., Li, G., Li, X., Tian, R., He, J., & Shao, Z. (2020). Prokaryotic communities vary with floc size in a biofloc-technology based aquaculture system. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 529(735632), 735632. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735632>
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- Wobken, D., Fuchs, B. M., Kuypers, M. M. M., & Amann, R. (2007). Potential interactions of particle-associated anammox bacteria with bacterial and archaeal partners in the Namibian upwelling system. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4648–4657. <https://doi.org/10.1128/AEM.02774-06>
- Xie, Y., Wright, S., Shen, Y., & Du, L. (2012). Bioactive natural products from *Lysobacter*. *Natural Product Reports*, 29(11), 1277. <https://doi.org/10.1039/c2np20064c>
- Xu, W.-J., & Pan, L.-Q. (2013). Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 412–413, 117–124.
- Zafar, M. A., & Rana, M. M. (2022). Biofloc technology: an eco-friendly “green approach” to boost up aquaculture production. *Aquaculture International: Journal of the European Aquaculture Society*, 30(1), 51–72. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00781-8>
- Zhang, M., Li, A., Yao, Q., Xiao, B., & Zhu, H. (2022). *Pseudomonas oligotrophica* sp. nov., a Novel Denitrifying Bacterium Possessing Nitrogen Removal Capability Under Low Carbon–Nitrogen Ratio Condition. *Frontiers in microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.882890>
- Zhang, Qian, Kobras, C. M., Gebhard, S., Mascher, T., & Wolf, D. (2022). Regulation of heterologous subtilin production in *Bacillus subtilis* W168. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 57. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01782-9>
- Zhang, W., Tong, Q., You, J., Lv, X., Liu, Z., & Ni, L. (2021). The application of *Bacillus subtilis* for adhesion inhibition of *Pseudomonas* and preservation of fresh

fish. Foods (Basel, Switzerland), 10(12), 3093.
<https://doi.org/10.3390/foods10123093>

Zhou, R., Zeng, S., Hou, D., Liu, J., Weng, S., He, J., & Huang, Z. (2019). Occurrence of human pathogenic bacteria carrying antibiotic resistance genes revealed by metagenomic approach: A case study from an aquatic environment. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 80, 248–256.
<https://doi.org/10.1016/j.jes.2019.01.00>

ANEXOS

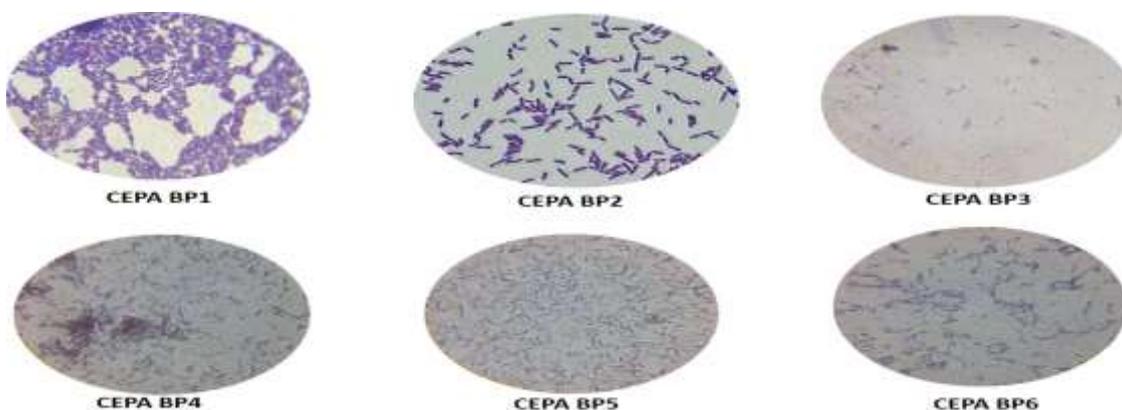
Anexo 1.

*Modulo escala sistema súper intensivo híbrido RAS – BIOFLOC a baja salinidad.
Laboratorio Centro De Biotecnología Acuícola Sostenible (CBAS).*



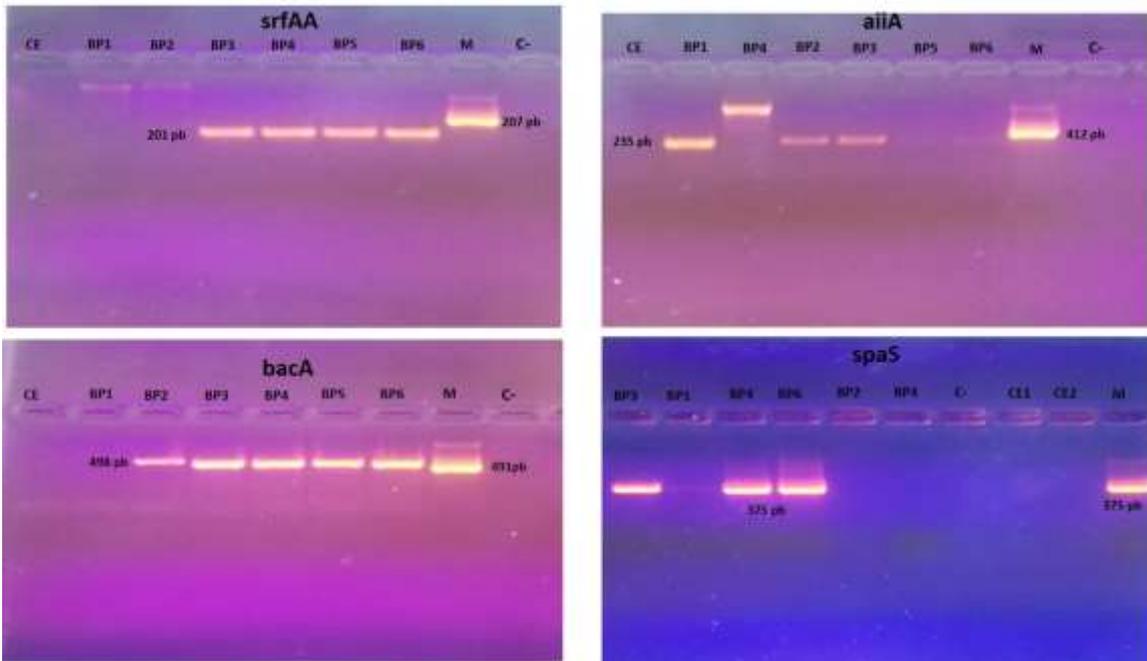
Anexo 2.

Verificación de pureza de cepas bacterianas probióticas tinción gram. B. cereus ATCC14579 (BP1), B. lincheniformis (BP2), B. cereus (BP3), B. subtilis (BP4), B. subsps. subtilis (BP5), B. subsps. Inaquosorum (BP6).



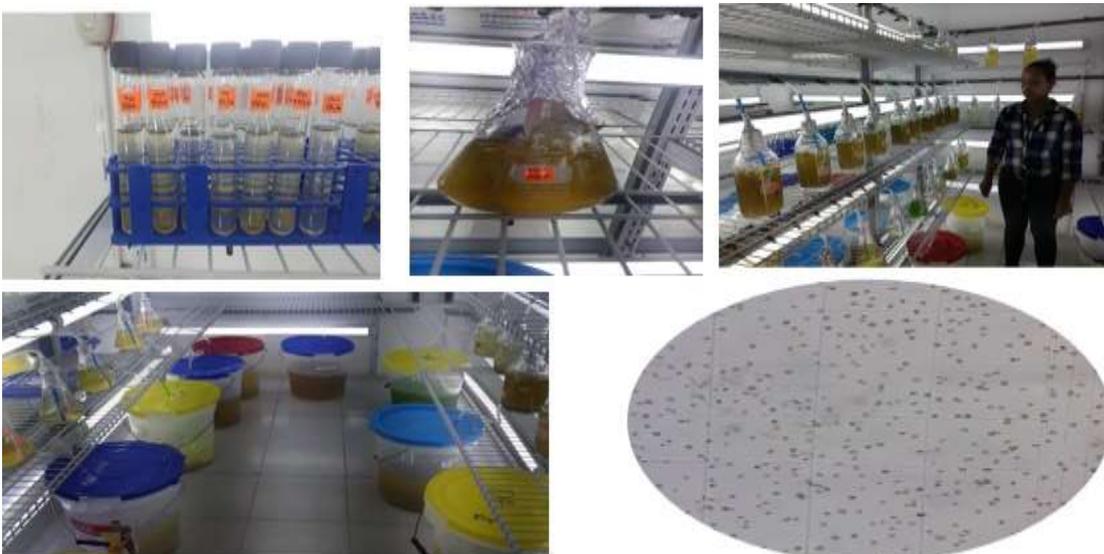
Anexo 3.

Verificación de genes funcionales de cepas bacterianas probióticas mediante electroforesis. *B. cereus* ATCC14579 (BP1), *B. licheniformis* (BP2), *B. cereus* (BP3), *B. subtilis* (BP4), *B. subsps. subtilis* (BP5), *Bacillus subtilis* subsp. *Inaquosorum* (BP6).



Anexo 4.

Producción de microalgas en el laboratorio Centro De Biotecnologías Omicas (CEBIOMICS).



Anexo 5.

Inoculación de biofloc madre A) Inoculación de cepas bacterianas y microalgales probióticas. B) Maduración de biofloc madre.



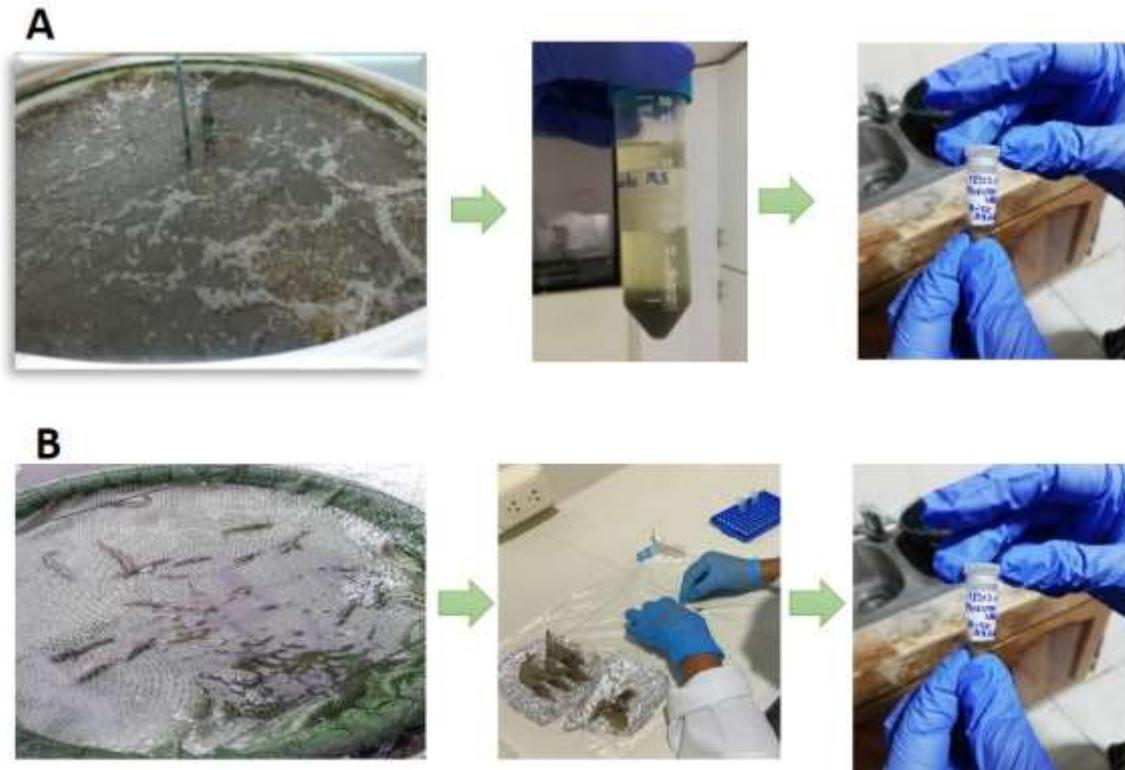
Anexo 6.

Inoculación de Biofloc madre en el agua de cultivo RAS-BIOFLOC y siembra de larvas.



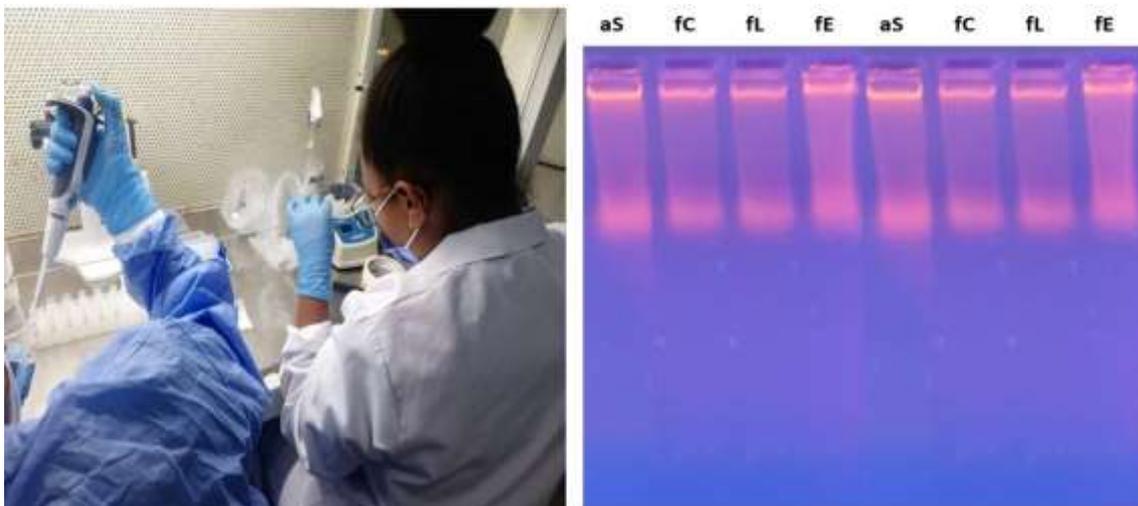
Anexo 7.

Recolección y procesamiento de muestras. A) Agua de cultivo. B) Intestinos de *L. vannamei*.



Anexo 8.

Extracción y migración de ADN de las muestras de agua de cultivo e intestinos de *L. vannamei*.



Anexo 9.

Preparación de librerías y secuenciación por nanoporos.

