



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA SUR

ÁREA DE CONOCIMIENTO DE CIENCIAS DEL MAR Y DE LA TIERRA  
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS MARINAS Y COSTERAS

## TESIS

### **Cultivo hiperintensivo de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) con biofloc inducido por bacterias probióticas, microalgas y macroalgas**

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS MARINAS Y COSTERAS CON ORIENTACIÓN EN  
ACUACULTURA

PRESENTA:

**FRANCISCO JAVIER JIMÉNEZ ORDAZ**

DIRECTORA: **DRA. MAURILIA ROJAS CONTRERAS**

DIRECTOR EXTERNO: **DR. DARIEL TOVAR RAMÍREZ**

**LA PAZ B. C.S., NOVIEMBRE DEL 2020.**





# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA SUR

ÁREA DE CONOCIMIENTO DE CIENCIAS DEL MAR Y DE LA TIERRA  
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS MARINAS Y COSTERAS

## TESIS

### **Cultivo hiperintensivo de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) con biofloc inducido por bacterias probióticas, microalgas y macroalgas**

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS MARINAS Y COSTERAS CON ORIENTACIÓN EN  
ACUACULTURA

PRESENTA:

**FRANCISCO JAVIER JIMÉNEZ ORDAZ**

DIRECTORA: **DRA. MAURILIA ROJAS CONTRERAS**

DIRECTOR EXTERNO: **DR. DARIEL TOVAR RAMÍREZ**

**LA PAZ B. C.S., NOVIEMBRE DEL 2020.**



## DICTAMEN DE APROBACIÓN DEL TRABAJO TERMINADO



Universidad Autónoma  
de Baja California Sur  
Sabiduría como meta, patria como destino

DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN  
INTERDISCIPLINARIA Y POSGRADO  
DEPARTAMENTO DE POSGRADO

FORMATO DP-EGD-001 DICTAMEN DE TESIS

PROYECTO TERMINAL Fecha: 27 / Nov / 2020

**DRA. GEORGINA BRABATA DOMÍNGUEZ**  
**JEFE/A DEL DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE**  
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS MARINAS Y COSTERAS**

Correo electrónico (gbrabata@uabcs.mx )

Por este conducto, quienes integramos el Comité Académico Asesor del/la alumno/a:

**Francisco Javier Jiménez Ordaz**

quien presentó una tesis/proyecto terminal titulado:

**CULTIVO HIPERINTENSIVO DE CAMARÓN BLANCO (*Penaeus vannamei*) CON  
BIOFLOC INDUCIDO POR BACTERIAS PROBIÓTICAS, MICROALGAS Y MACROALGAS**

otorgamos nuestro voto aprobatorio y consideramos que dicho trabajo está listo para ser presentado y defendido en examen de grado (**modalidad a distancia**) del Programa de Doctorado: **en Ciencias Marinas y Costeras, con Orientación en acuicultura**

### COMITÉ ACADÉMICO ASESOR

Nombre	Firma	
Dra. Maurilia Rojas Contreras		Director/a de Tesis
Dr. Dariel Tovar Ramírez		Co-director(a)
Dr. Juan Manuel Pacheco Vega		Asesor(a)
Dr. Pablo M. Arce Amézquita		Asesor(a)
Dr. José Alfredo Guevara Franco		Asesor(a)

C.c.p. programa de Posgrado  
C.c.p. Comité Académico Asesor.  
C.c.p. Alumna/o.  
C.c.p. Expediente.

*Dedicatoria*

*Dedico esta tesis a una persona muy especial que me inspiró para continuar en este camino profesional: Mi querido hermano José Alfredo Jiménez Ordaz.*

*También le dedico esta tesis a mi muy estimado Dr. Marco Antonio Cadena Roa: una gran persona que dejó grandes enseñanzas para mi vida profesional y personal, gracias por ayudarme a ser mejor persona. Agradezco sus consejos y optimismo para, de forma amena apoyar esta investigación. Su paciencia y apoyo incondicional dió lugar a este fruto que se inició el día que empecé a trabajar en este grupo y tuve la oportunidad de formarme en el área de la acuicultura. Aquí, en esta tesis están sus ideas Dr. Cadena Roa, hemos llegado al término de este proyecto, pero estoy seguro que sus conocimientos seguirán guiando mi camino y usted siempre me acompañará.*

*A Dios y a mi Familia que amo tanto.*

## Agradecimientos

A mi comité asesor: Dra. Maurilia Rojas Contreras, gracias por su apoyo incondicional, por enseñarme tantas cosas en el laboratorio, el cual durante este trabajo fue mi hogar, gracias por hacerlo de esta forma, disfruté mucho el aprendizaje, me apasioné por estos temas, principalmente por el mundo microbiano, fue sorprendente y valió la pena estos años. Dr. Dariel Tovar Ramírez muchas gracias por su apoyo y disponibilidad durante este trabajo, sus conocimientos me inspiran a continuar en este cosmos de estudio. Dr. Juan Manuel Pacheco, gracias por sus consejos que me ha brindado desde la maestría, y que hicieron sentirme acogido en La Unidad Pichilingue, he ido siguiendo sus pasos en este apasionado mundo de las microalgas y sus aplicaciones acuícolas, su apoyo ha sido muy importante. Dr. Pablo gracias por sus comentarios para mejorar este trabajo. Dr. Ricardo Vázquez gracias por apoyarme en los análisis metagenómicos y en el mejoramiento académico. Dr. Rangel Dávalos gracias por sus comentarios, ánimo, que gran aprecio le tengo. Dr. José Alfredo Guevara gracias por formar parte de este comité y darme su apoyo.

A CIMACO por permitirme estar dentro de la UABCS y darme los apoyos en mi formación Doctoral. Al Consejo Nacional de ciencia y Tecnología por la beca otorgada, a los laboratorios del CIBNOR y a las laboratoristas Patricia Hinojosa Baltazar y Gabriela Mendoza Carrión por las facilidades brindadas para trabajar. Muchas gracias al Departamento de ingeniería en Pesquerías que siempre me brindaron su apoyo, Ing Madelein, M.I. Resendiz, M.C Miguel, Ing Jesus Valenzuela, Doc. Fredy, Maestra Mony y Rocio gracias. Al personal de La Unidad Pichilingue por hacer el trabajo más ameno, mis ángeles, Ing. Diana, M.C. Giovana y M.C Yesenia gracias. A mi querido amigo Ing. Roberto Iván Jáuregui Paniagua, aprendimos mucho juntos sobre el cultivo de camarón. Mi maestro Oscar Valdés Cano, Gracias por tu apoyo desde que llegue a la Unidad Pichilingue, por los consejos técnicos y acuícolas, al Dr. Ismael Ortiz por compartir espacios de trabajo y su gran amistad, Dra. Erika que aventuras para poder llegar aquí. Ing. Elizabeth Pérez Bravo eres clave en mi formación, gracias por ayudarme en esta otra fase te agradezco todos los consejos y enseñanzas.

A mis queridos compañeros de LABCYTA que puedo decir de ustedes, ser su compañero en el laboratorio fue un placer, todo este tiempo, M.C. Alejandro, M.C. Mak Sabin, M.C. Saul, M.C. Anais, M.C. Amaral, I.P.A. Águstin, Andrea, Oscar Piña, Abdiel muchas gracias por los consejos, ayuda y gran compañía. Gracias, mí querida amiga Metagenómica, Dra. Iran tu sabes todo lo que pasamos y cuanto nos deja, pero lo mejor es esta gran amistad. Gracias mis queridas amigas, Lic. Valentina, M.C. Clara de los Santos, M.C. Ariadna, Gracias por su compañía, M. C. Elena Contreras por tu apoyo en las estancias y M. en C. Carmen Sanchez te agradezco los comentarios acertados para la redacción. Lic. Saulo Alameda Gracias por brindarme tu apoyo, escucharme y entenderme en este camino.

## CONTENIDO

ÍNDICE FIGURAS .....	11
ÍNDICE DE TABLAS .....	15
Resumen .....	17
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>23</b>
<b>I.1. Problemática acuícola – ecológica.....</b>	<b>25</b>
<b>I.2. Problemática Acuícola - económica.....</b>	<b>26</b>
<b>I.3. Tecnología Biofloc (BFT) una alternativa para una acuicultura sustentable .....</b>	<b>27</b>
<b>II. ANTECEDENTES .....</b>	<b>28</b>
<b>II.1. BFT con Mínimo recambio de agua.....</b>	<b>28</b>
<b>II.2. BTF con valor nutricional acuícola .....</b>	<b>28</b>
<b>II.3. Bacterias probióticas en cultivos de camarón .....</b>	<b>28</b>
<b>II.4. Composición de organismos del biofloc .....</b>	<b>29</b>
<b>II.5. Macroalgas para el cultivo de <i>P. vannamei</i> .....</b>	<b>29</b>
<b>II.6. Microalgas y probióticos.....</b>	<b>29</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>31</b>
<b>IV. OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
<b>IV.1. Objetivo general .....</b>	<b>33</b>
<b>IV.2. Objetivos específicos .....</b>	<b>33</b>
<b>VI. CAPITULO 1 .....</b>	<b>35</b>
<b>“Evaluación de la inducción del biofloc con tres microalgas y bacterias probióticas para el cultivo hiperintensivo de camarón blanco (<i>P. vannamei</i>)” ..</b>	<b>35</b>
<b>VI.1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>35</b>
<b>VI.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
<b>VI.2.1. Material biológico y diseño experimental .....</b>	<b>38</b>
<b>VI.2.1.1. Cultivo de microalgas nativas .....</b>	<b>39</b>
<b>VI.2.1.2. Cultivo del probiótico.....</b>	<b>40</b>
<b>VI.2.2. Generación de los flóculos inducidos con microalgas y probióticos ..</b>	<b>40</b>
<b>VI.2.3. Cultivo del camarón .....</b>	<b>42</b>
<b>VI.2.4. Calidad del agua.....</b>	<b>42</b>



<b>VI.2.5. Microorganismos en el biofloc</b> .....	44
<b>VI.2.5.1. Monitoreo de bacterias ácido lácticas y del género <i>Vibrio</i></b> .....	44
<b>VI.2.5.2. Monitoreo de microalgas adicionadas y microorganismos asociados al biofloc</b> .....	45
<b>VI.2.6. Análisis bromatológico del biofloc</b> .....	45
<b>VI.2.7. Rendimiento en el cultivo en camarón</b> .....	46
<b>VI.2.8. Análisis estadísticos</b> .....	46
<b>VI.3. RESULTADOS</b> .....	47
<b>VI.3.1. Calidad del agua</b> .....	47
<b>VI.3.2. Microorganismos en el biofloc</b> .....	50
<b>VI.3.2.1. Bacterias Ácido-Lácticas (BAL) y del género <i>Vibrio</i></b> .....	50
<b>VI.3.2.2. Microalgas inoculadas y otros microorganismos asociados al biofloc</b> .....	52
<b>VI.3.3. Análisis bromatológico</b> .....	54
<b>VI.3.4. Rendimiento del cultivo</b> .....	54
<b>VI.4. DISCUSIÓN</b> .....	56
<b>VI.5. BIBLIOGRAFÍA CITADA</b> .....	65
<b>VII. CAPÍTULO 2</b> .....	78
<b>“Efecto de tres niveles de proteína en el crecimiento y sistema inmune de <i>P. vannamei</i> cultivado en un sistema BFT inducido con microalgas y probióticos”</b> .....	78
<b>VII.2.4.5. Determinación de expresión génica por qPCR</b> .....	87
<b>VIII. CAPITULO 3. Evaluación de la comunidad bacteriana de camarón blanco, <i>Penaeus vannamei</i> en un cultivo hiperintensivo con biofloc inducido y macroalgas.</b> .....	124
<b>VIII.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	124
<b>VIII.2. Materiales y Métodos</b> .....	130
<b>VIII.2.1. Preparación de las dietas</b> .....	130
<b>VIII.2.1.1. Generación del biofloc</b> .....	130
<b>VIII.2.1.2. Obtención de macroalgas</b> .....	130
<b>VIII.2.1.3. Concentración de proteína en las dieta</b> .....	131
<b>VIII.2.2. Diseño experimental y organismos cultivados</b> .....	132

<b>VIII.2.3. Parámetros zootécnicos evaluados a los tratamientos BFI y BFM sin y con adición de macroalga</b> .....	133
<b>VIII.2.3.1 Calidad del agua</b> .....	133
<b>VII.2.3.2. Monitoreo de bacterias ácido-lácticas y del género Vibrio</b> .....	134
<b>VIII.2.3.3. Crecimiento del camarón</b> .....	134
<b>VII.2.3.4. Observaciones de la alimentación del camarón blanco con macroalgas</b> .....	134
<b>VIII.2.3.5. Análisis estadístico</b> .....	134
<b>VIII.2.4. Análisis de las comunidades microbianas en los cultivos de biofloc</b> .....	135
<b>VIII. 2.4.1. Colecta de muestras de biofloc e intestinos de camarón</b> .....	135
<b>VIII.2.4.2. Extracción del ADN metagenómico</b> .....	135
<b>VIII.2.4.2.1. Reacción de PCR para confirmar la presencia de ADN de bacterias</b> .....	136
<b>VIII.2.4.3. Amplificación y secuenciación NGS de las muestras de ADN- meta</b> .....	137
<b>VIII.2.4.3.1. Procesamiento de las secuencias</b> .....	137
<b>VIII.2.5. Análisis metagenómico</b> .....	138
<b>VIII.2.5.1. Estimación de la abundancia relativa en las comunidades microbianas</b> .....	139
<b>VIII.2.5.2. Análisis de componentes principales (PCA)</b> .....	139
<b>VIII.2.6. Análisis estadístico para las comunidades bacterianas</b> .....	139
<b>VIII.3. RESULTADOS</b> .....	140
<b>VIII.3.1. Resultados del cultivo de camarón con biofloc inducido más macroalga</b> .....	140
<b>VIII.3.1.1. Calidad del agua</b> .....	140
<b>VIII.3.1.2. BAL y del género Vibrio en el cultivo con biofloc y macroalgas</b> ..	140
<b>VIII.3.1.3. Rendimiento en el cultivo de camarón blanco con biofloc inducido más macroalga</b> .....	143
<b>VIII.3.2. Observaciones de la alimentación del camarón blanco con macroalgas</b> .....	145
<b>VIII.3.3. Análisis metagenómico de intestinos de camarón cultivados con biofloc inducido por bacterias probióticas, microalgas y macroalgas</b> .....	146

VIII.3.3.2. Análisis Metagenómico en muestras de intestino de camarón ....	148
VIII.3.3.3 Cobertura y profundidad.....	148
VIII.3.3.4. Composición de la comunidad bacteriana del intestino de camarón en cultivo hiperintensivo con biofloc.....	150
VIII.3.3.5. Efecto de la variación de la concentración de proteína de la dieta en la comunidad bacteriana intestinal de camarón cultivado con biofloc .....	152
VIII.3.3.6. Abundancia relativa .....	153
VIII.3.3.7. Comunidades bacterianas con respecto a los parámetros zootécnicos.....	155
VIII.3.3.8. Efecto de la adición de macroalga en la comunidad bacteriana intestinal de camarón cultivado con biofloc .....	158
VIII.3.3.9. Abundancia relativa .....	159
VIII.3.3.10. Análisis de las comunidades bacterianas con respecto a los parámetros zootécnicos de los tratamientos adicionados o no con macroalgas .....	161
VIII. 4. DISCUSIÓN.....	165
VIII. 4. 1. Benéficos de la adición de macroalgas al biofloc inducido.....	165
VIII.4.2. Efecto de la dieta con diferente concentración de proteína en la comunidad bacteriana intestinal de camarón cultivado con biofloc .....	169
VIII.4.3. Efecto de la adición de macroalgas en la comunidad bacteriana intestinal de camarón cultivado con biofloc .....	176
IX. CONCLUSIONES.....	180
X. BIBLIOGRAFÍA CITADA .....	182
ANEXO .....	195

## ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de los peneidos (López- Martínez <i>et al.</i> , 2010). .....	24
Figura 2. Capítulos para la descripción del estudio de un cultivo hiperintensivo de <i>Penaeus vannamei</i> con biofloc inducido por bacterias probióticas, microalgas y macroalgas. ....	34
Figura 3. Unidad Pichilingue de La Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), México. ....	38
Figura 4. Microalgas utilizadas para la inducción del biofloc, <i>Grammatophora sp.</i> , LPU-6 (4a), <i>Navicula sp.</i> , LPU-7 (4b), <i>Schizochytrium sp.</i> , LPU-1 (4c) y la bacteria probiótica <i>Lactobacillus fermentum</i> TD19 (4d). ....	39
Figura 5. Esquema de los tratamientos evaluados con diferentes microalgas para la inducción del biofloc. ....	41
Figura 6. Cultivo hiperintensivo de camarón blanco; a) Tanque de geomembrana para el cultivo del camarón con sistema de Biofloc, b) Monitoreo de organismos, c) biofloc inducido con microalgas y bacterias probióticas y d) Toma de muestras de intestinos de camarón. ....	45
Figura 7. Concentraciones de amonio (a), nitritos (b) y nitratos (c), en biofloc inducido con <i>Schizochytrium sp.</i> , <i>Grammatophora sp.</i> , y <i>Navicula sp.</i> (BFD1), biofloc con <i>Schizochytrium sp.</i> , y <i>Navicula sp.</i> (BFD2) y biofloc con <i>Schizochytrium sp.</i> (BFS) y <i>L. fermentum</i> TD19 en todos los tratamientos para un cultivo de <i>P. Vannamei</i> durante seis semanas. Los valores son presentados como medias $\pm$ desviación estándar (SD) .....	49
Figura 8. Concentración de BAL y <i>Vibrio spp.</i> , en agua con biofloc (a) y en intestino de camarón (b), de un cultivo con <i>P. vannamei</i> en biofloc inducido con <i>Schizochytrium sp.</i> , <i>Grammatophora sp.</i> , y <i>Navicula sp.</i> (BFD1), biofloc con <i>Schizochytrium sp.</i> , y <i>Navicula sp.</i> (BFD2) y biofloc con <i>Schizochytrium sp.</i> (BFS), con <i>L. fermentum</i> TD9 en todos los tratamientos durante seis semanas de cultivo. Los valores son presentados como medias $\pm$ desviación estándar (SD). ....	51
Figura 9. Densidad de microorganismos en mL <sup>-1</sup> de microalgas inóculadas, ciliados, rotíferos y nemátodos en bioflocs inducidos: (A), con <i>Schizochytrium sp.</i> , <i>Grammatophora sp.</i> y <i>Navicula sp.</i> , (B) biofloc con <i>Schizochytrium sp.</i> , y <i>Navicula sp.</i> , (C), biofloc con <i>Schizochytrium sp.</i> y todos con <i>L. fermentum</i> TD19 en cultivo de <i>P. vannamei</i> durante seis semanas. ....	53
Figura 10. Esquema del experimento. Tratamientos con alimentos conteniendo diferente porcentaje de CP: CP25, CP30 y CP35, donde CP35 fue el grupo control. 82	

Figura 11. Concentración de amonio en el biofloc de tres cultivos de <i>P. vannamei</i> , alimentados con las dietas CP25, CP30 y CP35, durante 60 días de cultivo. Los valores son presentados como medias $\pm$ desviación estándar (SD). .....	95
Figura 12. Concentración de Nitritos en el biofloc de tres cultivos de <i>P. vannamei</i> , alimentados con las dietas CP25, CP30 y CP35, durante 60 días de cultivo. Los valores son presentados como medias $\pm$ desviación estándar (SD). .....	95
Figura 13. Concentración de nitratos en el biofloc de tres cultivos de <i>P. vannamei</i> , alimentados con las dietas CP25, CP30 y CP35, durante 60 días de cultivo. Los valores son presentados como medias $\pm$ desviación estándar (SD). .....	96
Figura 14. Volumenes de biofloc de los tres cultivos de <i>P. vannamei</i> , alimentados con las dietas, CP25, CP30 y CP35, durante 60 días de cultivo. Los valores son presentados como medias $\pm$ desviación estándar (SD). .....	97
Figura 15. Cuenta viable de BAL y <i>Vibrio</i> spp., en agua de biofloc (a) y en intestino de camarón (b), de tres cultivos de <i>P. Vannamei</i> en biofloc alimentados con dietas que contienen proteína 25% (CP25), 30% (CP30) y 35% (CP35), durante ocho semanas de cultivo. Los valores son presentados como medias $\pm$ desviación estándar (SD). .	99
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa (1.5 %) que muestra las bandas de ARN total de los tres tratamientos, CP25 (muestras 11-20), tratamiento CP30 (muestras 21-30) y tratamiento CP35 (muestras de 31 al 40). .....	100
Figura 17. Niveles de ARNm de: <i>PEN</i> , <i>SOD</i> , <i>GPO</i> y <i>PROpo</i> en <i>P. vannamei</i> cultivado en biofloc inducido con microalgas y probiótico y con una variación de la concentración de proteína en el alimento. 25% (CP25), 30% (CP30) y un control 35% (CP35). El control equivale a 1 en cuanto al nivel de expresión relativa. Los datos son medias de la expresión de los genes evaluados (n=10). .....	103
Figura 18. Ajuste a modelo lineal simple de la Expresión génica de <i>GPO</i> (a), <i>PEN</i> (b), <i>SOD</i> (c) y <i>PROpo</i> (d), en hepatopáncreas de <i>P. vannamei</i> cultivado en biofloc inducido con microalgas y probiótico y con una variación de la concentración de proteína en el alimento 25% (CP25), 30% (CP30) y un control 35% (CP35). .....	104
Figura 19. Curvas de crecimiento de <i>P. Vannamei</i> cultivados durante ocho semanas en biofloc e inducido con <i>Schizochytrium</i> sp., <i>Grammatophora</i> sp., y <i>Navicula</i> sp., y tres concentraciones de proteína 25% (CP25), 30% (CP30) y el control de 35% (CP35). Cada peso en g es el promedio de 100 camarones muestreados cada semana y las barras representan la desviación estándar (SD). .....	106
Figura 20. Macroalgas adicionadas al biofloc. a) Dos tipos de <i>Ulva</i> spp y b) <i>Gracilaria</i> sp. ....	131
Figura 21. Esquema de los tratamientos con la variación en sus dietas analizadas. Los tres tratamientos varían en la concentración de proteína CP25, CP30 y CP35. ....	132

Figura 22. Esquema de los tratamientos con la variación en sus dietas analizadas, el BFI es el biofloc inducido y el BFIM es el biofloc inducido más macroalgas. ....	133
Figura 23. Concentración de BAL y <i>Vibrio</i> spp., en agua con biofloc (a) y en intestino de camarón (b), en un cultivo de <i>P. vannamei</i> con biofloc inducido sin macroalga (BFI) con macroalga (BFIM), durante seis semanas de cultivo. ....	142
Figura 24. Pesos promedio de <i>P. vannamei</i> cultivado en biofloc inducido con microalgas <i>Schizochytrium</i> sp., <i>Grammatophora</i> sp., y <i>Navicula</i> sp., y probiótico <i>L. fermentum</i> , sin macroalgas (BFI) y con macroalgas <i>Ulva</i> y <i>Gracilaria</i> (BFIM), durante 60 días de cultivo. ....	143
Figura 25. Camarones <i>P. vannamei</i> alimentados solo con las macroalgas (a) <i>Ulva</i> sp., y (b) <i>Gracilaria</i> sp. (c) heces fecales desechadas constantemente. ....	145
Figura 26. Cobertura vs profundidad de secuenciación, A) Distribución de la profundidad de secuenciación de cada muestra. B) Rango de cobertura y profundidad de las muestras aceptables para el análisis. ....	149
Figura 27. Secuencias de OTUS obtenidos > a 10000 K en las muestras analizadas, mostrando 17 phylum. ....	150
Figura 28. Abundancia de OTUs en los intestinos de camarón <i>P. Vannamei</i> alimentado con biofloc inducido con microalgas; <i>Schizochytrium</i> sp., <i>Grammatophora</i> sp., y <i>Navicula</i> sp., y probiótico <i>L. fermentum</i> TD9 (BFI) bajo tres tratamientos con diferente concentración de proteína 25%, 30% y 35%. ....	152
Figura 29. Abundancia relativa de las OTUs, en camarón <i>P. Vannamei</i> cultivados en biofloc inducido con microalgas; <i>Schizochytrium</i> sp., <i>Grammatophora</i> sp., y <i>Navicula</i> sp., y el probiótico <i>L. fermentum</i> TD9. Siendo CP la variación de concentración de proteína 25%, 30% y 35% en la dieta. ....	154
Figura 30. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de la interacción entre comunidades bacterianas de intestino de camarón <i>P. vannamei</i> cultivados en biofloc con respecto al tratamiento. CP25 (muestras Ip_0, 1,10-17) y CP30 (muestras Ip_2,18-26) presentaron mayor cercanía que CP35 (muestras Ip_3, 27-35). ....	156
Figura 31. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de la interacción entre comunidades bacterianas de intestino de camarón <i>P. vannamei</i> cultivados en biofloc con respecto a su concentración de amonio. CP25 (muestras Ip_0,1, 10-17) y CP30 (muestras Ip_2,18-26) mostraron mayor cercanía que CP35 (muestras Ip_3,27-35). ....	156
Figura 32. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de la interacción entre comunidades bacterianas de intestino de camarón <i>P. vannamei</i> cultivados en biofloc con respecto a su pH. CP25 (muestras Ip_0, 1, 10-17), CP30 (muestras Ip_2,18-26) y CP35 (muestras Ip_3,27-35). ....	157

Figura 33. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de la interacción entre comunidades bacterianas de intestino de camarón *P. vannamei* cultivados en biofloc con respecto a su peso. CP25 (muestras Ip\_0, 1,10-17), CP30 (muestras Ip\_2,18-26) y CP35 (muestras Ip\_3,27-35). ..... 157

Figura 34. Abundancia de las OTUs en las comunidades bacterianas de camarón *P. Vannamei* alimentado con biofloc inducido con microalgas y probióticos (BFI) y biofloc inducido más las macroalgas *Ulva* spp y *Gracilaria* spp (BFIM). ..... 158

Figura 35. Abundancia relativa de las comunidades bacterianas del intestino de camarones *P. Vannamei* cultivados con biofloc inducido con microalgas; *Schizochytrium* sp., *Grammatophora* sp., y *Navicula* sp., y el probiótico *L. fermentum* TD9 (BFI) y con el biofloc inducido más macroalgas (BFIM). ..... 160

Figura 36. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las comunidades bacterianas de intestino de camarón *P. vannamei* cultivados en biofloc respecto a su concentración de macroalga. BFI sin macroalgas (muestras Ip\_5, 40-43) y BFIM con macroalgas (muestras Ip\_4, 36-39). ..... 162

Figura 37. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las comunidades bacterianas de intestino de *P. vannamei* cultivados en biofloc respecto al peso obtenido. BFI sin macroalgas (muestras Ip\_5,40- 43) y BFIM con macroalgas (muestras Ip\_4, 36-39). ..... 162

Figura 38. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las comunidades bacterianas de intestino de *P. vannamei* cultivados en biofloc respecto a la concentración de macroalga agregada. CP25 (muestras Ip\_0, 1,10-17), BFI sin macroalgas (muestras Ip\_5, 40-43) y BFIM con macroalgas (muestras Ip\_4, 36-39). ..... 163

Figura 39. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las comunidades bacterianas de intestino de *P. vannamei* cultivados en biofloc respecto a a la concentración del volumen de Biofloc. CP25 (muestras Ip\_0, 1, 10-17), BFI sin macroalgas (muestras Ip\_5, 40-43) y BFIM con macroalgas (muestras Ip\_4, 36-39). ..... 164

Figura 40. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las comunidades bacterianas de intestino de *P. vannamei* cultivados en biofloc respecto a a los pesos del camarón. CP25 (muestras Ip\_0, 1, 10-17), BFI sin macroalgas (muestras Ip\_5, 40-43) y BFIM con macroalgas (muestras Ip\_4, 36-39). ..... 164

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de calidad del agua en cultivos de <i>P. vannamei</i> en biofloc inducido con <i>Schizochytrium</i> sp., <i>Grammatophora</i> sp., y <i>Navicula</i> sp. (BFD1), biofloc con <i>Schizochytrium</i> sp., y <i>Navicula</i> sp. (BFD2), biofloc con <i>Schizochytrium</i> sp. (BFS) y <i>L. fermentum</i> TD19 en todos los tratamientos durante seis semanas de cultivo. ....	47
Tabla 2. Composición proximal (% de peso seco) de los Biofloc, inducidos con <i>Schizochytrium</i> sp., <i>Grammatophora</i> sp., y <i>Navicula</i> sp. (BFD1), biofloc con <i>Schizochytrium</i> sp., y <i>Navicula</i> sp. (BFD2) y biofloc con <i>Schizochytrium</i> sp. (BFS) y con <i>L. fermentum</i> TD9 en todos los tratamientos en cultivo de <i>P. vannamei</i> durante seis semanas de cultivo. ....	54
Tabla 3. Valores promedio del rendimiento en la producción de juveniles <i>P. vannamei</i> cultivados en un sistema de cultivo con bioflocs inducidos con <i>Schizochytrium</i> sp., <i>Grammatophora</i> sp., y <i>Navicula</i> sp., (BFD1), biofloc con <i>Schizochytrium</i> sp., y <i>Navicula</i> sp. (BFD2) y biofloc con <i>Schizochytrium</i> sp. (BFS) y con <i>L. fermentum</i> TD19 en todos los tratamientos durante seis semanas. ....	55
Tabla 4. Composición nutrimental de los alimentos con las tres concentraciones de CP 25, 30 y 35 % empleados en los tratamientos durante las ocho semanas de experimentación. ....	83
Tabla 5. Secuencias de primers utilizados. ....	87
Tabla 6A. Acomodo de las muestras con sus replicas y controles en la placa de 96 pozos para llevarla al termociclador y determinar la eficiencia de la reacción, con las diferentes concentraciones. ....	89
Tabla 6B. Acomodo de las muestras con sus replicas y controles en la placa de 96 pozos para llevarla al termociclador y determinar la concentración. ....	90
Tabla 6C. Acomodo de las muestras con sus replicas y controles en la placa de 96 pozos para llevarla al termociclador y determinar la concentración. ....	91
Tabla 6D. Acomodo de las muestras con sus replicas y controles en la placa de 96 pozos para llevarla al termociclador y determinar la concentración. ....	92
Tabla 7. Valores promedios $\pm$ SD, mínimo y máximo obtenidos de los parámetros fisicoquímicos de la calidad del agua de un cultivo de <i>P. vannamei</i> durante el periodo experimental de 8 semanas en los tres tratamientos con diferentes concentraciones de proteína (CP), 25%, 30% y 35% en la dieta. ....	94
Tabla 8. Concentraciones del ARN extraído de hepatopancreas de camarones de los tres tratamientos experimentales (CP) 25%, (muestras 11-20), 30% (muestras 21- 30) y 35% (muestras 31-40). ....	101



Tabla 9. Valores promedios del rendimiento en juveniles <i>P. vannamei</i> cultivados en bioflocs inducido con <i>Schizochytrium</i> sp., <i>Grammatophora</i> sp., y <i>Navicula</i> sp., y tres concentraciones de proteína 25% (CP25), 30% (CP30) y 35% (CP35) durante ocho semanas .....	105
Tabla 10. Valores de calidad del agua de cultivos de <i>P. vannamei</i> en biofloc inducido con microalgas <i>Schizochytrium</i> sp., <i>Grammatophora</i> sp., y <i>Navicula</i> sp., y probiótico <i>L. fermentum</i> TD9 (BFI) y más macroalgas <i>Ulva</i> y <i>Gracilaria</i> (BFIM), durante 60 días de cultivo.....	141
Tabla 11. Valores promedios del rendimiento de juveniles <i>P. vannamei</i> en cultivo con biofloc inducido con microalgas y probiótico, sin macroalgas (BFI) y con macroalgas (BFIM), durante seis semanas. ....	144
Tabla 12. Concentración de ADN metagenómico en muestras de intestino de camarón de cultivos con biofloc inducido con microalgas y probióticos, con dietas de tres niveles de proteína CP25 muestra 11i- 20i, CP30 muestras 21i- 30i y CP35 muestras 31i-40i, adicionado con macroalga BFIM muestras 41i-45i y Control sin su adición BFI Muestras 41i- 50i. ....	146
Tabla 13. Valores de P-leven obtenidos al comparar las comunidades bacterianas de los tres tratamientos CP25, CP30 y CP35, con respecto a los factores evaluados. ....	155
Tabla 14. Phylum en las comunidades bacterianas del intestino de camarón cultivado en un sistema con biofloc inducido con microalgas; <i>Schizochytrium</i> sp., <i>Grammatophora</i> sp., y <i>Navicula</i> sp., y el probiótico <i>L. fermentum</i> TD9 (BFI) y más macroalgas <i>Ulva</i> y <i>Gracilaria</i> (BFIM) que mostraron diferencia significativa al comparar los tratamientos.....	159
Tabla 15. Valores de P-leven al comparar las comunidades bacterianas de un cultivo con biofloc y macroalga y otro sin macroalga, con diferencia significativa $p < 0.05$ . .	161

## Resumen

Algunos sistemas para el cultivo de organismos de importancia acuícola generan flóculos microbianos que consumen los desechos y sirven de alimento para los organismos en cultivo. En esta investigación se estudió el cultivo de camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei* en un sistema con bioflocs modificado para mejorar la tecnología actual, induciendo la formación de bioflocs con microalgas y bacterias probióticas de la región. Así mismo, en un cultivo hiperintensivo de camarón blanco se evaluaron tres dietas con diferentes porcentajes de proteína, con y sin la adición de macroalgas. Paralelamente se analizaron las comunidades bacterianas del intestino de los camarones de los diferentes tratamientos. El primer experimento se realizó durante seis semanas en tanques de 28 toneladas que contenían 350 camarones/m<sup>3</sup>. Se evaluaron tres tratamientos: BFD1) con dos diatomeas: *Grammatophora* sp. y *Navicula* sp.; BFD2) con *Navicula* sp.; BFS) Sin diatomeas. Todos los tratamientos fueron adicionados con la microalga *Schizochytrium* sp. y la bacteria probiótica *Lactobacillus fermentum* TD19. Los siguientes parámetros fueron monitoreados durante el cultivo: amonio, nitritos, nitratos, variables ambientales, volumen de flóculos, presencia de microorganismos, composición bromatológica de biofloc y parámetros zootécnicos. Los resultados indicaron que los tres bioflocs inducidos presentaron un volumen similar ( $8.34 \pm 4.8$  ml L<sup>-1</sup>) y una concentración de amonio menor de 1.0 mg L<sup>-1</sup>). El tratamiento BFD1 generó flóculos con la concentración más alta de ciliados, rotíferos, nematodos y bacterias ácido lácticas, así como la concentración más baja de *Vibrio* spp.  $1.2 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>, evidenciando una diferencia significativa en la composición bromatológica, con los valores más altos de proteínas y lípidos:  $28.12 \pm 0.50$ ,  $22.44 \pm 0.80\%$ , en peso seco de biofloc respectivamente, y la mejor relación de conversión alimenticia 0.89. Con base en estos resultados, se sugiere que *Schizochytrium* sp., *L. fermentum* y las dos diatomeas deben usarse para inducir el biofloc en el cultivo hiperintensivo de *P. vannamei*. Adicionalmente el biofloc proporcionó una ingesta nutricional suplementaria, lo que puede constituir una ventaja para reducir alimento comercial. En el segundo experimento se evaluó el biofloc BFD1 utilizando tres alimentos pelletizados con diferentes concentraciones de proteína, se mostró el aporte proteico del biofloc, la sobrevivencia y la actividad del sistema inmune de los

camarones. El experimento se llevó a cabo por 8 semanas en tanques de 28 000 L, con 350 camarones/ m<sup>3</sup> y con un peso de 0.8 ± 0.9 g en tres tratamientos con biofloc, BFD1 inducidos con probióticos y las tres microalgas nativas. Cada tratamiento fue alimentado con una dieta con 25, 30 ó 35% de proteína, los tratamientos fueron: CP25; CP30 y CP35 respectivamente. Se monitoreo la calidad del agua, bacterias presuntivas del género *Vibrio* y bacterias ácido-lácticas en el biofloc y tubo digestivo de camarón, el desempeño del cultivo y la actividad de genes relacionados con el sistema inmune, Profenol oxidasa (*PROpo*), Superóxido dismutasa (*SOD*), Peneidina 2 (*PEN*) y Glutación peróxidasa (*GPO*). Los resultados mostraron que el mejor tratamiento fue el CP25 ya que generó parámetros fisicoquímicos estables; amonio 0.13 ± 0.02, nitritos 0.20 ± 0.09 y nitratos 6.36 ± 0.22, el mejor crecimiento del camarón con diferencia significativa (p<0.05), la mayor expresión de genes *SOD*, *PEN* y *GPO*, brindando protección y obteniendo la mayor sobrevivencia de 98.91%. Los resultados sugieren que el tratamiento CP25% es conveniente por que mejora el desempeño del camarón, mantiene activo el sistema inmune de los organismos, además de reducir el costo del alimento. Un Tercer experimento fue realizado para evaluar la adición de macroalgas en el tratamiento CP25 y analizar la composición de las comunidades bacterianas que participaron en éste y en los tratamientos del segundo experimento. Los tratamientos evaluados fueron: BFI) Biofloc inducido y BFIM) Biofloc inducido más macroalgas. Los dos tratamientos fueron alimentados con una dieta con 25% de proteína, cada tratamiento se realizo en tanques de 15000 L, con 350 camarones/ m<sup>3</sup> y con un peso de 0.8 ± 0.9 g. Para el análisis de las comunidades bacterianas, se consideraron los dos ultimos experimentos, se tomaron muestras de intestino de camarón al finalizar cada experimento, se realizaron extracciones de ADN de las muestras de intestino, las cuales se enviaron a una empresa para su secuenciación masiva y las bases de datos resultantes se analizaron con herramientas bioinformáticas para conocer la taxonomía de las comunidades bacterianas, con respecto a los parámetros monitoreados; concentración de compuestos nitrogenados, oxígeno, temperatura, salinidad, pH, peso de los camarones, porcentajes de proteína en la dieta y adición de la macroalga. Los resultados del análisis del agua al adicionar la macroalga mostrarón un buen control de compuestos nitrogenados, BFIM produjo

los niveles más bajos de todos los experimentos realizados, amonio ( $0.11 \pm 0.01$ ), nitritos ( $0.09 \pm 0.02$ ) y nitratos ( $5.41 \pm 0.15$ ). También mostró el mejor crecimiento con diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

Los resultados del análisis metagenómico mostraron diferencia en los phylums bacterianos representados en los tratamientos con diferente porcentaje de proteína, sin embargo, mantuvieron abundancias relativas similares: Proteobacterias de 39.94% a 50.83 %, seguidos de Actinobacterias de 10% a un 25% y Bacteroidetes de 10% a un 15%. El análisis metagenómico mostró que el cambio del porcentaje de proteína en el alimento además de influir en su peso, concentración de amonio, nitratos y pH también influyó en la composición de la comunidad bacteriana de los intestinos del camarón. Los resultados de las comunidades bacterianas de los intestinos de los camarones en BFI y BFM, mostraron una mayor variabilidad. Estos resultados indicaron que, al adicionar la macroalga en el cultivo de camarón blanco, se observaron diferencias hasta de 74.5% en sus comunidades bacterianas. El tratamiento adicionado con macroalgas incrementó el peso final del camarón e incrementó la abundancia relativa con diferencias significativas al comparar los phylum Proteobacteria; 39.94% en BFI y 46.54 % en BFIM y Actinobacteria; 9.8% en BFI y 25.4% en BFIM. Los resultados de esta investigación nos permitieron completar el diseño de un nuevo sistema hiperintensivo con biofloc para el cultivo de camarón blanco a nivel piloto, con ventajas importantes al conocer la mayoría de las variables involucradas, por lo cual se sugiere esta listo para escalarlo a nivel industrial.

## Abstract

Biofloc systems generate microbial flocs that consume waste and serve as food for growing organisms. In this research, the culture of Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* was studied. In order to improve the technology, the system was modified by inducing the formation of bioflocs with microalgae and probiotic bacteria from this region. Likewise, in a hyperintensive culture of white shrimp, three diets with different percentages of protein were evaluated, with and without the addition of macroalgae. At the same time, the bacterial communities of the intestine of the shrimp from the different treatments were analyzed. The first experiment was carried out for six weeks in 28 ton tanks containing 350 shrimp / m<sup>3</sup>. Three treatments were evaluated: BFD1) with two diatoms: *Grammatophora* sp. and *Navicula* sp.; BFD2) with *Navicula* sp.; BFS) Without diatoms. All treatments were added with the microalgae *Schizochytrium* sp. and the probiotic bacterium *Lactobacillus fermentum* TD19. The following parameters were monitored during cultivation: ammonium, nitrites, nitrates, environmental variables, floc volume, presence of microorganisms, bromatological composition of biofloc and zootechnical parameters. The results indicated that the three induced bioflocs presented a similar volume ( $8.34 \pm 4.8 \text{ ml L}^{-1}$ ) and an ammonium concentration lower than  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$ ). The BFD1 treatment generated flocs with the highest concentration of ciliates, rotifers, nematodes and lactic acid bacteria, as well as the lowest concentration of *Vibrio* spp.  $1.2 \times 10^3 \text{ CFU mL}^{-1}$ , showing a significant difference in the bromatological composition, with the highest values of proteins and lipids:  $28.12 \pm 0.50$ ,  $22.44 \pm 0.80\%$ , in dry weight of biofloc respectively, and the best feed conversion ratio 0.89. Based on these results, it is suggested that *Schizochytrium* sp., *L. fermentum* and the two diatoms should be used to induce biofloc in the hyperintensive culture of *P. vannamei*. Additionally, the biofloc provided a supplemental nutritional intake, which may be an advantage to reduce commercial feed. In the second experiment, the BFD1 biofloc was evaluated using three pelletized feeds with different protein concentrations, the protein contribution of the biofloc, survival and the activity of the immune system of shrimp were shown. The experiment was carried out for 8 weeks in tanks of 28,000 L, with 350 shrimp / m<sup>3</sup> and a weight of  $0.8 \pm 0.9 \text{ g}$  in three treatments with biofloc, BFD1 induced with probiotics and the three native microalgae. Each treatment was fed a diet with 25,

30 or 35% protein, the treatments were: CP25; CP30 and CP35 respectively. The quality of the water, presumptive bacteria of the genus *Vibrio* and lactic acid bacteria in the biofloc and digestive tract of shrimp, the performance of the culture and the activity of genes related to the immune system, Profenol oxidase (PROpo), Superoxide dismutase (SOD), Peneidin 2 (PEN) and Glutathione peroxidase (GPO). The results showed that the best treatment was CP25 since it generated stable physicochemical parameters; ammonium  $0.13 \pm 0.02$ , nitrites  $0.20 \pm 0.09$  and nitrates  $6.36 \pm 0.22$ , the best shrimp growth with significant difference ( $p < 0.05$ ), the highest expression of SOD, PEN and GPO genes, providing protection and obtaining the highest survival rate of 98.91%. The results suggest that the CP25% treatment is convenient because it improves the performance of the shrimp, keeps the immune system of the organisms active, in addition to reducing the cost of feed. A third experiment was carried out to evaluate the addition of macroalgae in the CP25 treatment and to analyze the composition of the bacterial communities that participated in this and in the treatments of the second experiment. The treatments evaluated were: BFI) Induced Biofloc and BFIM) Induced Biofloc plus macroalgae. The two treatments were fed a diet with 25% protein, each treatment was carried out in tanks of 15000 L, with 350 shrimp / m<sup>3</sup> and with a weight of  $0.8 \pm 0.9$  g. For the analysis of bacterial communities, the last two experiments were considered, shrimp intestine samples were taken at the end of each experiment, DNA extractions were made from the intestine samples, which were sent to a company for massive sequencing and the resulting databases were analyzed with bioinformatic tools to know the taxonomy of the bacterial communities, with respect to the monitored parameters; concentration of nitrogenous compounds, oxygen, temperature, salinity, pH, shrimp weight, percentages of protein in the diet and addition of macroalgae. The results of the water analysis when adding the macroalgae showed a good control of nitrogen compounds, BFIM produced the lowest levels of all the experiments carried out, ammonium ( $0.11 \pm 0.01$ ), nitrites ( $0.09 \pm 0.02$ ) and nitrates ( $5.41 \pm 0.15$ ). It also showed the best growth with a significant difference ( $p < 0.05$ ).

The results of the metagenomic analysis showed a difference in the bacterial phylums represented in the treatments with different percentage of protein, however, they maintained similar relative abundances: Proteobacteria from 39.94% to 50.83%,

followed by Actinobacteria from 10% to 25% and Bacteroidetes from 10% to 15%. Metagenomic analysis showed that the change in the percentage of protein in the feed, in addition to influencing its weight, ammonium concentration, nitrates and pH, also influenced the composition of the bacterial community of the shrimp intestines. The results of the bacterial communities of the intestines of the shrimp in BFI and BFM, showed greater variability. These results indicated that when adding the macroalgae in the white shrimp culture, differences of up to 74.5% were observed in their bacterial communities. The treatment added with macroalgae increased the final weight of the shrimp and increased the relative abundance with effective differences when comparing the phylum Proteobacteria; 39.94% in BFI and 46.54% in BFIM and Actinobacteria; 9.8% in BFI and 25.4% in BFIM. The results of this research allowed us to complete the design of a new hyperintensive system with biofloc for the cultivation of white shrimp at a pilot level, with important advantages by knowing most of the variables involved, Thus is suggested that it is ready to scale it up to industrial level.

## I. INTRODUCCIÓN

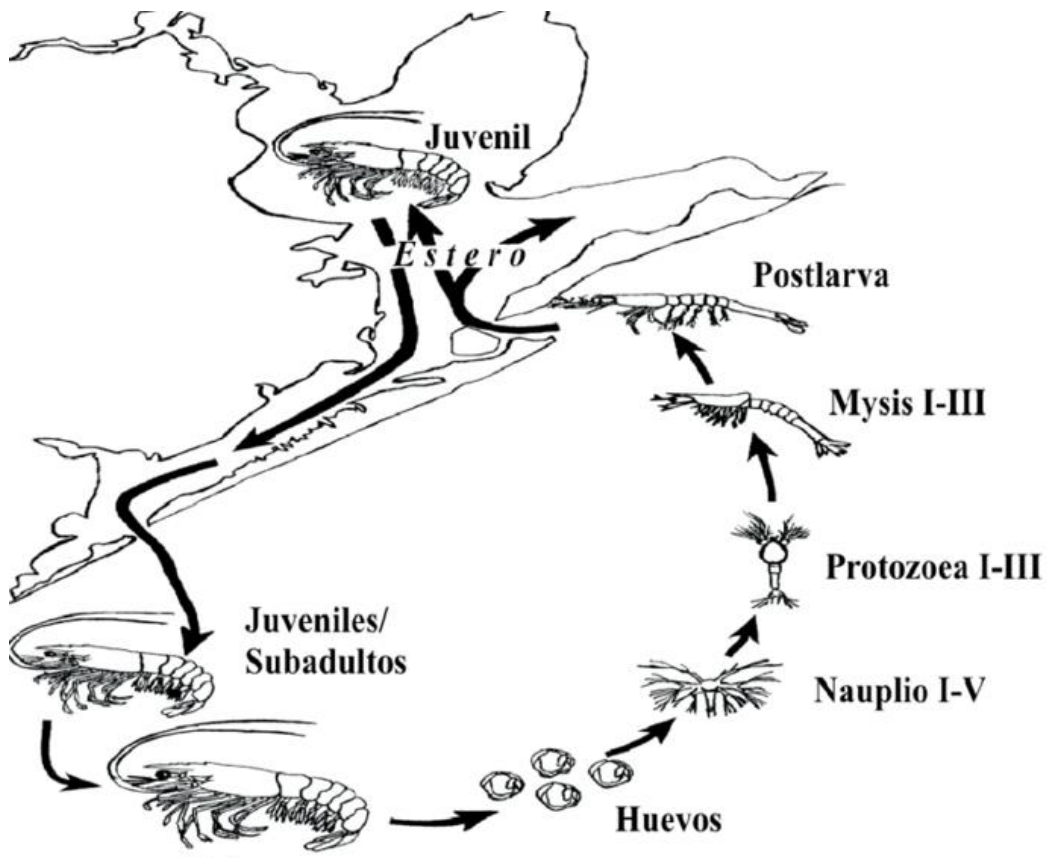
La acuicultura en las últimas décadas ha incrementado su producción, de acuerdo con las estadísticas de la FAO, la producción mundial alcanzó máximos históricos, mientras que las pesquerías disminuyeron presentándose un incremento en la población a nivel mundial (FAO, 2001, 2010). El camarón blanco *Penaeus vannamei* o también citado taxonómicamente como *Litopenaeus vannamei* (Ver anexo 1 clasificación taxonómica actualmente reconocida) es una especie endémica de América Latina y actualmente es cultivado en todo el Pacífico y comprende el 80% de la producción mundial acuícola de camarones. Este camarón es cultivado en granjas acuícolas por su alta fecundidad, es decir que solo con pocos reproductores se producen altas poblaciones, se tiene conocimiento de su reproducción en el ambiente natural donde presenta un ciclo de vida de dos fases, una marina y una estuarina (Morales, 1990).

Su reproducción inicia en zonas alejadas de la costa, donde el macho deposita en la hembra los paquetes de esperma, para realizar la fertilización y después los huevos son liberados para pasar a estadios larvales, que comprenden; nauplio, zoea y mysis (Figura 1), después pasan a ser post-larvas y se mueven en dirección a la costa, durante este trayecto pasan diferentes mudas hasta convertirse en juveniles en los estuarios de los ríos donde se mantienen durante un lapso de 3 a 4 meses (Morales, 1990). Los camarones son sexualmente inmaduros cuando salen de los estuarios y madurarán cuando se encuentran a profundidades, donde ocurre el apareamiento, la hembra debe haber mudado y encontrarse en un estado característico, teniendo el desove en temporada cálida (Arellano *et al.*, 1989) y de esta manera se inicia su ciclo nuevamente.

El conocimiento del ciclo reproductivo en el camarón ha beneficiado a la acuicultura, ya que se han obtenidos progenitores del medio silvestre (peso superior a 40 g) para realizar los cultivos, aunque actualmente se seleccionan organismos de las mismas cosechas para continuar la reproducción, obteniendo líneas de reproductores con las mejores características. En general la reproducción se realiza en salas de maduración, con agua de mar limpia y alimentos balanceados, se procede



a un proceso de ablación de un pedúnculo ocular de la hembra, lo cual lleva a repetidos ciclos de maduración y desove (FAO). Cuando se obtienen los nauplios, estos son colectados por la atracción a la luz, después son enjuagados y desinfectados para colocarlos en tanques para su crecimiento donde se les ofrece alimento vivo, en las primeras fases se les da microalgas y en las siguientes además de microalgas se les da artemia, complementando las últimas etapas con microcápsulas de alimentos preparados secos o líquidos. Cuando alcanzan un estadio de PL 10 -12, se trasportan para el sistema de crianza, donde alcanzan tamaños adecuados de post- larva para ser nuevamente sembrados en tanques para la engorda de éstos. El proceso de engorda del camarón puede llevarse a cabo en diferentes sistemas: de forma extensiva, semiintensiva, intensiva y super-intensiva, los cuales se diferencian por las densidades de siembra que pueden ser baja, mediana y alta (FAO).



**Figura 1.** Ciclo de vida de los peneidos (López- Martínez *et al.*, 2010).

El cultivo de camarón se ha intensificado y demanda, técnicas de cultivo que permitan una mayor producción como son los sistemas hiperintensivos. En México, el cultivo de camarón alcanzó un incremento del 15 % del valor total de los productos pesqueros comercializados a nivel internacional en el 2012, sin embargo, los volúmenes de esta producción mundial de camarón cultivado descendieron en particular en el 2013, debido a problemas relacionados con enfermedades virales y bacterianas (Leaño *et al.*, 2012), como el síndrome de mortalidad temprana que también afectó a México (Cuellar- Anjel, 2013). Esta reducción en la producción de camarón disparó los precios en todo el mundo, afectó al consumo en los mercados tradicionales e incrementó la importación para el consumo. En la actualidad la producción del camarón en ocasiones no puede ser alcanzada debido a que los sistemas de cultivo demandan altas densidades, por la presencia de enfermedades que causan mortalidad, por una alimentación inadecuada que contribuye a que el cultivo sea vulnerable a enfermedades y todo esto genera además problemas ambientales y económicos (Rojas *et al.*, 2005).

### **I.1. Problemática acuícola – ecológica**

El aumento de la demanda del camarón ha generado incremento en la producción acuícola en las últimas décadas, dicha producción está ubicada cerca de sistemas marinos los cuales han estado propensos a daños en los ecosistemas que se ubican a lo largo de los litorales. Dicha producción también ha afectado las características hidráulicas de varios cuerpos costeros por la cantidad de recambios de agua requerida (hasta un 50%) para abastecer las estanquerías existentes para su cultivo y también al vertir sus desechos al sistema marino. La llegada de aguas con desechos acuícolas provoca transfaunación; por ejemplo al usar microalgas traídas de otros lugares para sus cultivos de apoyo o alimento para el camarón, estos residuos de aguas pueden alterar las poblaciones naturales en sus relaciones de competencia, depredación y parasitismo, los desechos pueden contribuir a enfermedades entre ellas las virales a largo plazo, aspectos que traen cambios en la biodiversidad de las regiones (Plascencia y Berm 2012).

Por otro lado, si los animales cultivados presentan enfermedades o no cumplen con una cuarentena, al realizar el recambio de agua en los estanques, los microorganismos patógenos no tienen fronteras saliendo así a mar abierto y afectar a las poblaciones silvestres (Flores *et al.*, 2007) y provocar la destrucción de los hábitats marinos (principalmente manglares) o la muerte de algunas especies de importancia pesquera, esta problemática por lo tanto demanda cultivos más seguros. La contaminación también se puede originar por una descarga excesiva de nutrientes y materia orgánica que se traduce en sobre-enriquecimiento de nutrientes, algunas sustancias tóxicas como el amonio que puede alterar los ecosistemas. Por tal motivo la problemática de contaminación al medio ambiente debe ser contemplada en los sistemas de cultivo de camarón, junto con la menor utilización de agua o desechos que se generen y un conocimiento de las comunidades microbianas que integran estas aguas, que son arrojadas.

## **I.2. Problemática Acuícola - económica**

La producción mundial de camarón se incrementó en los últimos años, si bien los sistemas intensivos alcanzan una mejor producción, también generan más costos, como son los relacionados a los alimentos destinados para la producción, los cuales reducen las ganancias del acuicultor. Otro problema que afectó la economía de los acuicultores fueron las altas mortalidades del cultivo de *P. vannamei* que se enfrentó a virus o bacterias principalmente del género *Vibrio* (Roque *et al.*, 2001), esto afectó a la acuicultura en diferentes países, incluyendo México. Muchos sectores acuícolas que producían toneladas de camarón blanco fueron afectados, las inversiones en el cultivo no alcanzaron para cubrir los gastos de alimentos, afectando la economía del sector.

Para resolver estos problemas se generó la búsqueda de sistemas acuícolas que protejan tanto al camarón como al medio ambiente, que tengan un menor gasto en los alimentos utilizados para obtener mayores ganancias en el cultivo del camarón blanco, se buscaron sistemas que consideran las necesidades ecológicas y económicas cuando la producción es a grandes volúmenes. Sigue existiendo la necesidad de un mejor manejo de los cultivos y apoyo de la biotecnología, de tal

manera que la acuicultura del camarón no afecte o contamine los recursos naturales marinos, que tenga medidas encaminadas a la administración eficiente, con buena producción y responsable para la preservación del equilibrio ecológico. Así mismo, la necesidad de investigación para demostrar la eficiencia de nuevas propuestas de sistemas productivos y manejo encaminado a obtener la mejor calidad posible del camarón cultivado a los menores costos posibles para su rentabilidad (Hanson *et al.*, 2013).

### **I.3. Tecnología Biofloc (BFT) una alternativa para una acuicultura sustentable**

La acuicultura actual del camarón blanco crece y se especula que tendrá un mayor aumento en su producción en un futuro, muchas investigaciones van enfocadas a cubrir la problemática de la infraestructura requerida. La Tecnología Biofloc surge por dichas necesidades, tomando en cuenta además de ser amigable con el medio ambiente, disminuir la cantidad de agua y eliminar o tener menos desechos tóxicos. También utiliza menos espacio y gracias a la generación de los flóculos que contienen microalgas, bacterias, protozoos y otros microorganismos con un valor nutricional para el cultivo (Timmons, 2002 y Ferreira *et al.*, 2014) proporciona una mejora en el crecimiento del camarón. Todos estos atributos del BFT son temas de interés a investigar para mejorar esta tecnología, por lo cual se plantea como objetivo general de esta investigación, desarrollar un sistema hiperintensivo con biofloc inducido con microalgas, probióticos y macroalgas para el cultivo de *Penaeus vannamei* y evaluar su desempeño a través de parámetros zootécnicos en los diferentes experimentos del cultivo, de cuantificar la expresión de genes relacionados con el sistema inmune del camarón y la relación de dichos parámetros con las comunidades bacterianas que están presentes en el intestino del camarón.

Para abordar dicho objetivo se describen antecedentes de los principales temas de interés para mejorar la BFT en el cultivo del camarón, como son; mínimo recambio de agua, contenido nutricional del biofloc, usos de probióticos y macroalgas en cultivos de camarón.

## **II. ANTECEDENTES**

### **II.1. BFT con Mínimo recambio de agua**

Uno de los beneficios que se atribuyen al sistema BFT es el de emplear una menor cantidad de agua en recambios. Estudios realizados mostraron que el sistema BFT es útil para minimizar los porcentajes de agua y disminuir el impacto del daño ambiental (Burford *et al.*, 2004, Samocha *et al.*, 2007 y Zhao *et al.*, 2012). Otros estudios mostraron que los efluentes de las granjas de camarón al ser liberados llevan amonio que puede afectar a otros ecosistemas (Ebeling *et al.*, 2006). Por lo tanto, el desarrollo y aplicación de estos sistemas BFT con cambios mínimos o cero porcentajes de agua benefician el medio ambiente (Wasielesky *et al.*, 2006).

### **II.2. BFT con valor nutricional acuícola**

Los microorganismos dentro del biofloc utilizan el exceso de nutrientes adquiriendo un valor nutricional alto para las especies en cultivo (Ferreira *et al.*, 2015); así, el biofloc es una fuente de proteínas, lípidos, minerales y vitaminas por lo cual los sistemas BFT ofrecen un mejoramiento nutricional necesario para el crecimiento del camarón (Kim *et al.*, 2014), siendo las proteínas del BFT importantes al brindar un gran aporte y permitir una disminución en el alimento suministrado al cultivo y de esta manera disminuir costos.

### **II.3. Bacterias probióticas en cultivos de camarón**

La aplicación a los cultivos de importancia acuícola de diferentes microorganismos benéficos ha sido reportada con los siguientes efectos: 1) incrementar el valor nutricional (Venkat *et al.*, 2004, Balcazar *et al.*, 2017, Banerjee *et al.*, 2010), 2) aumentar la supervivencia y disminuir enfermedades mediante la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas (Sansawat y Thirabunyanon 2009, Ismail y Soliman, 2010), 3) mantener y mejorar la calidad del agua con la reducción de concentraciones de amonio, nitrito y nitrato (Shariff *et al.*, 2001, Jana y Jana, 2003, Gutierrez-Wing y Malone 2006, Chae-Woo *et al.*, 2009) y 4) disminuir la carga elevada de materia orgánica (Douillet 1998, Dalmin *et al.*, 2001). La importancia de las bacterias probióticas en el biofloc dentro del cultivo de camarón es debido a que mejoran la salud del camarón y combaten bacterias patógenas (Xu y Pan, 2014). En

la actualidad la utilización de las bacterias probióticas en el cultivo de camarón trae consigo una mayor producción.

#### **II.4. Composición de organismos del biofloc**

Recientemente se ha reportado la composición de la comunidad microbiana de un biofloc, indicando la abundancia de los diversos microorganismos asociadas a los floculos, los principales grupos encontrados fueron: bacterias, microalgas, ciliados, rotíferos y nematodos, sugiriendo que éstos contribuyen como fuente de alimento natural *in situ*. También encontraron bacterias heterótrofas de los géneros *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Nitrospira*, *Nitrobacter* y la levadura *Rhodotorula* sp. Sugiriendo que estos microorganismos favorecen la calidad del agua y el bienestar fisiológico de los organismos en cultivo, (Monroy- Dosta *et al.*, en el 2013 y Becerril-Cortés *et al.*, 2018).

#### **II.5. Macroalgas para el cultivo de *P. vannamei***

En un estudio realizado con *P. vannamei* cultivado con macroalgas se destaca la inducción de las proteínas relacionadas con el reconocimiento de lipopolisacárido (LPS), b-1,3-glucano (BG) y otras moléculas conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), las cuales provocan la inmunidad innata, aumentan los parámetros inmunes y la resistencia contra los patógenos (Chen *et al.*, en el 2016). En particular, la macroalga *Gracilaria* spp., contribuye a la disminución de amonio, disminuye la densidad de *Vibrio* e incrementa la proteína cruda del camarón (Brito *et al.*, 2014).

#### **II.6. Microalgas y probióticos**

La BFT ha sido implementada con importantes beneficios para la acuicultura, sin embargo se desconocen evaluaciones a nivel de cultivo hiperintensivo en tanques de volúmenes mayores a 15,000 litros y a temperatura ambiente, tampoco se ha implementado un control de calidad de las microalgas que integran el floc. Faltan estudios que muestren la respuesta inmunológica de los camarones bajo estas condiciones y la composición de los grupos bacterianos que integran el agua del biofloc. Además, falta conocer la influencia que tiene el uso de las microalgas y

macroalgas al ser agregadas a la BFT y los beneficios que pudiera tener su implementación.

La Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), cuenta con una colección de cepas probióticas y microalgas aisladas de la región que se han empleado como alimento para *P. vannamei*. (Morales, 2012, Cota, 2015 y Hernández-Rubio, 2015), produciendo mejoras en el cultivo de éste. Varias cepas de microalgas fueron seleccionadas para ser utilizadas en la formación de flóculos a los cuales se les agregó melaza y bacterias probióticas para la aplicación en cultivos, (Hernández-Castro en el 2015). Posteriormente es planteada la utilización de bacterias probióticas y microalgas nativas, para inducir la formación de flóculos y evaluar el desempeño de un sistema con BFT. También se evaluó la adición de macroalgas ya que se conoce la importancia que tienen para mantener la calidad del agua, proveer nutrientes y eliminar compuestos tóxicos (Chopin *et al.*, 2001; Neori *et al.*, 2004), como los residuos de los alimentos pelletizados, los compuestos nitrogenados que llegan a reducir la calidad del agua y causar estrés (Correia *et al.*, 2014). Es conocido también que las macroalgas usan los residuos metabólicos del camarón y de los otros microorganismos como nutrientes, absorben CO<sub>2</sub> y producen O<sub>2</sub> (Alwis & Jayaweera, 2011), por lo tanto la adición de macroalgas podría mejorar la calidad del agua y servir de alimento, pero es necesario generar más información para conocer el impacto de estas y tener un mejor manejo del cultivo.

### III. JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo es conveniente, dado que será de utilidad para los acuicultores y personas que requieran producir camarones a mayores densidades, en sistemas hiperintensivos para *P. vannamei* que actualmente es una fuente de alimento con demanda a nivel mundial y este estudio pretende indicar los procesos necesarios para su cultivo con sistema de biofloc, cuya tecnología está siendo estudiada por los beneficios que tiene en la acuicultura y en esta investigación se indica la generación de los flóculos inducidos con microalgas y probióticos, y explica los beneficios al adicionar macroalgas. Este estudio generó información necesaria para el cultivo de camarón con microorganismos marinos, los cuales son de interés en las ciencias del mar, también generó información importante para llevar a cabo el cultivo de camarón en zonas áridas costeras por personas del sector camaronícola que requieran mejorar su producción. La información generada beneficiará a granjas camaroneras que además pretendan tener sistemas amigables con el medio ambiente, ya que contribuye en el ahorro de agua, minimiza los costos de bombeo, filtración y eliminación de partículas no deseadas.

En este trabajo se explica relevancia para la nutrición acuícola que tiene el biofloc inducido y se muestra que el emplear microalgas y probióticos tiene beneficios en la composición química del biofloc, como son proteína, lípidos y carbohidratos, así mismo mejora el sistema inmune del camarón, manteniendo una buena salud. Lo contrario puede ser un factor detonante en pérdidas económicas en la producción del camarón.

El presente trabajo abarca solo aspectos de la fase de engorda del camarón, los aspectos de su salud se estudiaron cuantificando la expresión de genes relacionados al sistema inmune, los estudios microbiológicos que comprenden monitoreo del género *Vibrio* por su potencial patógeno y las bacterias ácido-lácticas a las que pertenecen la bacteria probiótica adicionada se realizaron en todos los experimentos. En calidad del agua se monitoriaron los compuestos nitrogenados debido a su constante acumulación en los tanques de cultivo para evitar daños al cultivo



y al medio ambiente. Mientras que el conocer la composición de la comunidad bacteriana nos permitió conocer los diferentes grupos de bacterias que participan en el cultivo y que llegan al intestino del camarón sin causar daño. Este estudio fue desarrollado en cultivos a gran escala por contar con tanques de geomembrana de 28 000 L, e instalaciones acordes para simular los sistemas de granjas de las zonas costeras.

El valor práctico de la investigación propuesta radica por lo tanto en conocer información del cultivo, utilizando recursos biológicos locales como las microalgas, probióticos y macroalgas, que ayuden a describir los beneficios que pueden obtenerse para tener un mejor entendimiento de su uso y manejo en los cultivos hiperintensivos de camarón. Así mismo radica en establecer mejores indicadores que contribuyan al manejo de alimentos y dietas para este sistema, con lo cual se pretende llegar a una aplicación acuícola a nivel granja. Esta investigación está lista para trascender a un beneficio social, por medio de la capacitación y asesoría a personas interesadas en la acuicultura, en particular, en el manejo de este sistema, en metodologías para el manejo de microalgas y probióticos locales cultivados a temperatura ambiente, en dar alternativas para disminuir el consumo de los alimentos comerciales empleados y disminución del porcentaje de proteínas en los alimentos los cuales representan altos costos, todo esto con el fin de mejorar la producción acuícola..

El presente trabajo confirma que este sistema es la mejor alternativa de una acuicultura con biofloc sustentable y se sugiere sea implementado para el desarrollo de las regiones costeras donde pueda ser puesto en marcha con más eficiencia y con un enfoque al desarrollo acuícola sustentable.

## **IV. OBJETIVOS**

### **IV.1. Objetivo general**

Desarrollar un sistema hiperintensivo con biofloc inducido con microalgas, probióticos y macroalgas para el cultivo de *Penaeus vannamei* y evaluar su desempeño con parámetros zootécnicos, análisis del sistema inmune y comunidades bacterianas.

### **IV.2. Objetivos específicos**

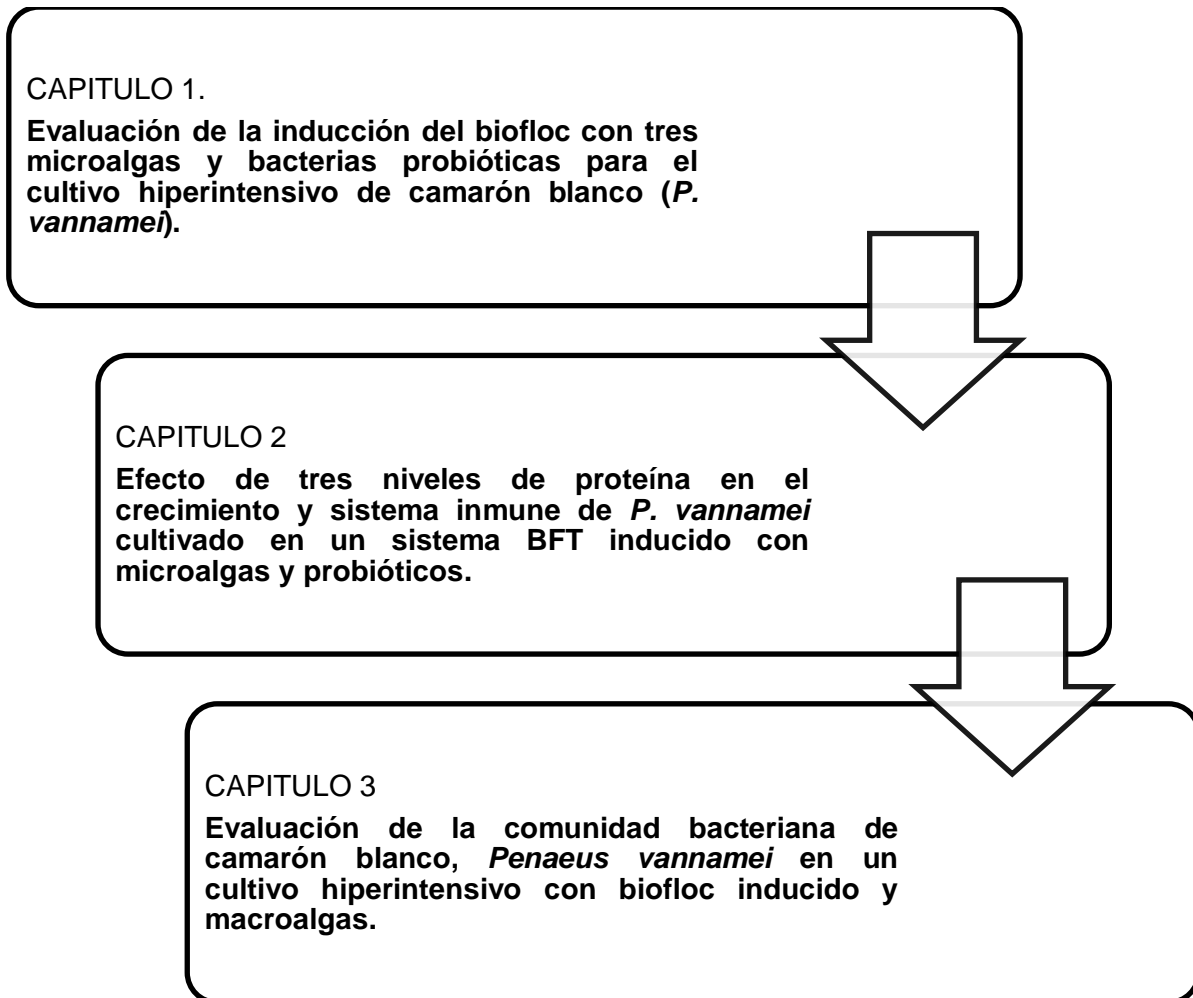
1. Evaluar la inducción de un biofloc con tres microalgas y bacterias probióticas por medio de los parámetros fisicoquímicos del agua y zootécnicos del camarón blanco (*P. vannamei*)
- 2.- Evaluar el efecto de tres niveles de proteínas en el crecimiento y sistema inmune del camarón en el cultivo hiperintensivo con Biofloc inducido con microalgas y bacterias probióticas.
- 3.- Evaluar la diversidad y las Unidades taxonómicas operacionales de las comunidades bacterianas del tracto intestinal de los camarones en el cultivo hiperintensivo con biofloc con respecto a su dieta (macroalga y nivel de proteína), parámetros fisicoquímicos (concentración de compuestos nitrogenados, oxígeno, temperatura, salinidad y pH) y su peso.

## **V. HIPÓTESIS**

El cultivo hiperintensivo del camarón blanco mantiene estables sus parámetros fisicoquímicos y comunidad bacteriana, mejora el crecimiento y el sistema inmune del camarón al contar con un biofloc inducido por microalgas, probióticos, macroalgas y un bajo porcentaje de proteína en el alimento.

## Descripción de la estructura del trabajo

Con los objetivos propuestos en este estudio se desarrollaron tres capítulos para una mejor estructura y descripción como se muestra en la Figura 2.



**Figura 2.** Capítulos para la descripción del estudio de un cultivo hiperintensivo de *Penaeus vannamei* con biofloc inducido por bacterias probióticas, microalgas y macroalgas.

## VI. CAPITULO 1

### **“Evaluación de la inducción del biofloc con tres microalgas y bacterias probióticas para el cultivo hiperintensivo de camarón blanco (*P. vannamei*)”**

#### VI.1. INTRODUCCIÓN

La tecnología biofloc es utilizada en el cultivo del camarón blanco (*P. vannamei*), para mejorar su producción (Avnimelech 2012; Crab *et al.*, 2012; Emerenciano *et al.*, 2013), gracias a la generación de los flóculos en los que se encuentran microorganismos con valor nutricional para el camarón (Timmons *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2015). La generación de flóculos microbianos en los cultivos son indicativos de un estado saludable del cultivo, por lo cual se promueve la formación de flóculos con calidad nutricional. La inducción de flóculos en cultivos de camarón se ha evaluado con diferentes fuentes de carbono, como melaza, azúcar de caña, dextrosa y el salvado de arroz, principalmente para reducir la concentración de nitrógeno amoniacal total y en busca de solucionar problemas en cultivos con altas densidades (Serra *et al.*, 2015). La melaza es la fuente de carbono más utilizada para la producción de biofloc en camarón (Baloi *et al.*, 2013, Schweitzer *et al.*, 2013, Correia *et al.*, 2014, Arias- Moscoso *et al.*, 2018), sus flóculos generados han mostrado un aporte como alimento, logrando una reducción del costo de alimento (Hari *et al.*, 2004). Los flóculos reportados muestran diferentes resultados con respecto a la calidad del agua del cultivo, valor nutritivo y otros aspectos como morfología y comunidad microbiana sin embargo en los flóculos se busca que las fuentes de carbono favorezcan el crecimiento de bacterias específicas, protozoos y fitoplancton (Crab *et al.*, 2012).

Se ha sugerido mantener las microalgas dentro del biofloc (Wei *et al.*, 2016), debido a que se les atribuye la producción de biomoléculas esenciales para la acuicultura (Roy y Pal, 2015). Diferentes microalgas como diatomeas o cianobacterias pueden desarrollarse en los flóculos, siendo estas una fuente importante de alimento para bacterias, ciliados, rotíferos y nématodos los cuales a su vez aportan proteínas que complementan el alimento del camarón en el sistema biofloc (Hargreaves, 2013).

Diatomeas como *Grammatophora* sp., y *Navicula* sp., han sido sugeridas para alimentación en dietas de organismos marinos (Ferreira *et al.*, 2014), *Schizochytrium* sp., tiene la capacidad de producción de ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6n-3), que juega un papel importante para la salud y contra enfermedades (Sun *et al.*, 2014), debido a dichas características, estas microalgas tienen un gran potencial biotecnológico para ser aplicadas en la acuicultura. Además de las ventajas nutritivas mencionadas, también ayudan a mantener adecuadas concentraciones de compuestos nitrogenados en el agua (Emerenciano *et al.*, 2013; Quijano *et al.*, 2017). Las microalgas eliminan nitratos y evitan la acumulación de este desecho que puede afectar el crecimiento del camarón (Xu and Pan, 2014), Por lo tanto, éstas juegan un papel importante para mantener una buena calidad del agua y no favorecen la presencia de bacterias patógenas como algunas especies de *Vibrio* que pueden causar la muerte al camarón (Lv *et al.*, 2017). Para disminuir estos patógenos se adicionan bacterias probióticas (Farzanfar 2006; Ma *et al.*, 2009; Balcazar *et al.*, 2017), que además favorecen la reducción de compuestos nitrogenados y pueden ser inhibidoras de bacterias de género *Vibrio*. Estudios han demostrado que el uso de probióticos tiene mejoras en crecimiento del camarón (Xie *et al.*, 2019), atribuyéndoles mejor absorción de nutrientes (Lin *et al.*, 2004) y beneficio en ganancia de biomasa del cultivo (Martínez-Córdoba *et al.*, 2015).

Dentro de los principales requisitos para implementar el uso de microalgas y probióticos es que éstas tengan un fácil manejo y manipulación para ser empleados en la acuicultura, una evaluación previa del uso de *Schizochytrium* sp., mostró resultados favorables (Pacheco-Vega *et al.*, 2018). En esta investigación se propuso evaluar a *Lactobacillus fermentum* (TD19), *Schizochytrium* sp., *Grammatophora* sp., y *Navicula* sp., que muestran un crecimiento adecuado a temperatura ambiente y se muestran las ventajas que brindan estas microalgas al ser incorporadas como inductores iniciales del biofloc en un sistema BFT para el cultivo de camarón blanco (*P. vannamei*). Así mismo se muestra como mejora la formación de flóculos y los parámetros de la calidad del agua como: disminución de compuestos nitrogenados y *Vibrio* spp., en cultivo. Adicionalmente se cuantificó el crecimiento poblacional de las microalgas adicionadas, la concentración de microorganismos que prevalecen y la

composición química (proteína y lípidos) de los bioflocs inducidos. Finalmente se analizó el efecto en el crecimiento de *P. vannamei* en un cultivo hiperintensivo y se propuso la adecuada disminución de alimento comercial, lo cual generará menores costos en la acuicultura de camarón.

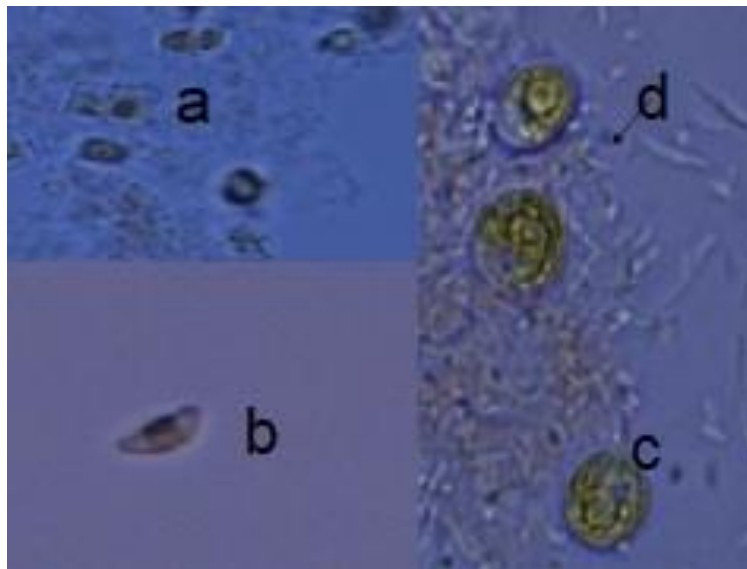
## VI.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### VI.2.1. Material biológico y diseño experimental

El estudio se realizó en la Unidad Pichilingue de La Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), México (Figura 3), durante los meses de septiembre y octubre del 2016. Las microalgas fueron, dos diatomeas *Grammatophora* sp. LPU-6 y *Navicula* sp. LPU-7 (Figura 4a y 4b), *Schizochytrium* sp. LPU-1 (Figura 4c), los inóculos fueron obtenidos del cepario perteneciente al laboratorio de microalgas de esta unidad. La bacteria probiótica *Lactobacillus fermentum* TD19 (Figura 4d) fue obtenida del Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos (UABCS), la cual fue aislada del tracto digestivo de *P. vannamei* y caracterizada por su potencial probiótico.



**Figura 3.** Unidad Pichilingue de La Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), México.



**Figura 4.** Microalgas utilizadas para la inducción del biofloc, *Grammatophora sp.*, LPU-6 (4a), *Navicula sp.*, LPU-7 (4b), *Schizochytrium sp.*, LPU-1 (4c) y la bacteria probiótica *Lactobacillus fermentum* TD19 (4d).

#### **VI.2.1.1. Cultivo de microalgas nativas**

Las microalgas se cultivaron cada una por separado, con precauciones asépticas en el laboratorio de cultivo de microalgas en la Unidad de Pichilingue. Los cultivos se iniciaron en matraces de 125 mL inoculados al 10%, posteriormente se escalaron a volúmenes de 1 L, después a garrafones de 18 L y finalmente a cilindros de 4000 L inoculando con 60% de cada microalga respectivamente se utilizó agua de mar previamente pasada por luz ultravioleta y filtros de 1 micra. La transferencia de cultivos de matraz de 125 mL y de 1 L se realizó en una campana de flujo laminar y en presencia de un mechero. Para los cultivos a nivel matraz se esterilizó el agua de mar, se preparó el medio nutritivo F/2 (Guillard, 1975), más silicatos en diatomeas, se inocularon las cepas y se mantuvieron a temperatura ambiente (25-28 °C). La aireación de los cultivos se realizó manualmente agitando los matraces cada 12 horas.

En el caso de los cultivos en garrafón de 18 L y en cilindros de policarbonato de 400 L, la aireación fue dada con un compresor blower de 100 Hp / Ha. El agua que se utilizó para estos cultivos fue pasada por filtro de 1 micra, por luz ultravioleta, clorada con 1ml de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex) por cada litro de agua, dejada en reposo por 24 horas y posteriormente neutralizada agregando 0.05 g de tiosulfato de



sodio por cada mL. Los cultivos desde nivel matraz hasta 18 L se mantuvieron en el laboratorio por 144 horas, mientras que los cultivos de 400 L fueron en el exterior a temperatura ambiente (24 y 33 °C), durante 48 horas.

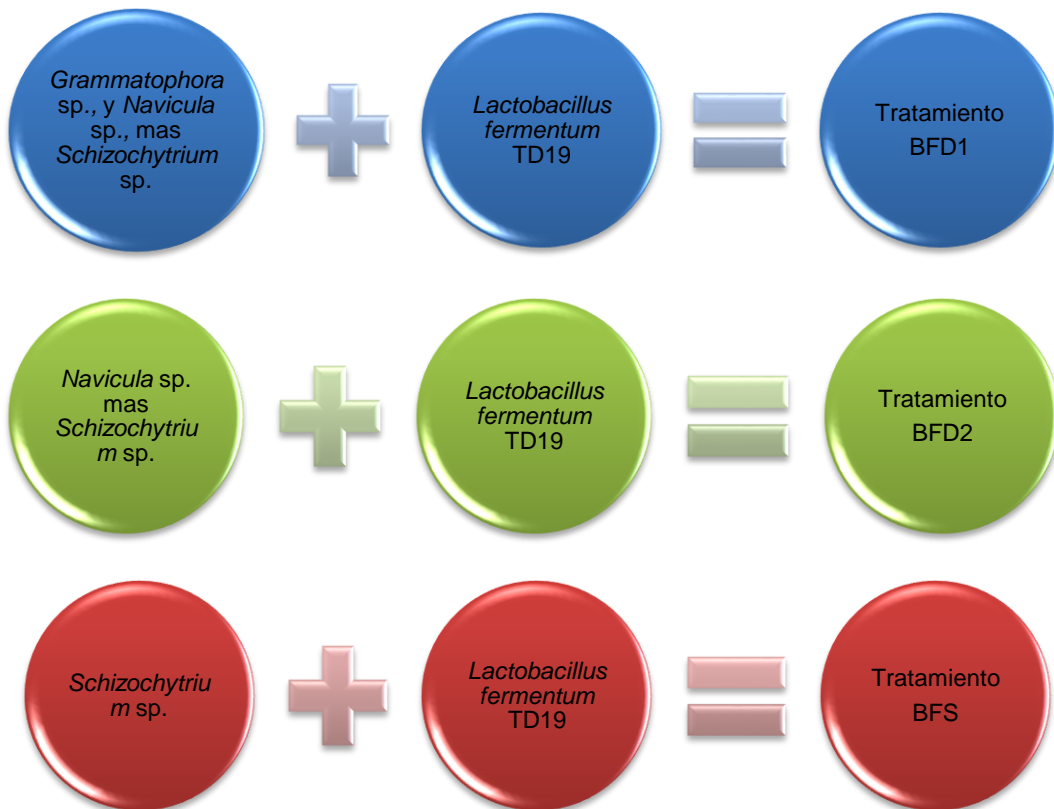
#### **VI.2.1.2. Cultivo del probiótico**

La cepa probiótica *Lactobacillus fermentum* TD19 que se encontraba en el Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos a -85°C, fue reactivada con 100µl en placas de MRS usando la técnica de extensión en superficie con varilla de vidrio. Posteriormente, se mantuvo en incubación a 30°C en jarras de anaerobiosis por un periodo de 24 a 48 horas. Una vez que la bacteria presentó crecimiento, se seleccionaron colonias aisladas, se resembraron en placas nuevamente de MRS y se dejaron incubar por 24 horas bajo las mismas condiciones. De las colonias recién formadas se tomó una colonia y se inoculó en tubos de ensaye con 3 ml de caldo MRS y se incubó en las condiciones mencionadas. La cepa pura reactivada y con la misma morfología de los registros iniciales fue considerada para preparar el inóculo inicial a escalar en matraces de 125 ml, 1L, 4 L. El medio de cultivo utilizando se preparó con agua de mar estéril, adicionada con 0.12 ml de medio nutritivo F/2 (Guillard, 1975), concentrado por litro de agua, melaza (2.5 g L<sup>-1</sup>) y citrato de sodio (1.17 g L<sup>-1</sup>). Este medio también se empleó para los volúmenes 18 y 400 L, pero el agua fue sanitizada con hipoclorito de sodio y neutralizada con tiosulfato de sodio de la forma en que se mencionó anteriormente.

#### **VI.2.2. Generación de los flóculos inducidos con microalgas y probióticos**

La generación de los flóculos para los diferentes tratamientos se hizo en tanques circulares de geomembrana con volumen de 28 000 L, los cuales fueron sanitizados con agua clorada con 1ml de hipoclorito de sodio comercia por L, el agua de mar previamente pasada por filtro de arena y de 1 micra, la cual fue clorada y neutralizada de la misma forma mencionada, se agregaron aproximadamente 400 litros de microalgas en concentraciones de 2 x 10<sup>4</sup> células mL<sup>-1</sup>, la microalga inoculada se seleccionó de acuerdo a cada uno de los tres tratamientos a evaluar para el biofloc.

El primer tratamiento fue compuesto por biofloc con las microalgas *Grammatophora* sp., *Navicula* sp., y *Schizochytrium* sp., y con la bacteria TD19 (**BFD1**), el segundo tratamiento con *Navicula* sp., *Schizochytrium* sp., y TD19 (**BFD2**) y el tercer tratamiento con *Schizochytrium* sp., y TD19 (**BFS**) (Figura 5). Se consideró la presencia de *Schizochytrium* sp., en los tres tratamientos por los beneficios que comparten esta microalga y *Lactobacillus fermentum*- TD19 (Pacheco-Vega *et al.*, 2018; Hernández-Castro, 2015). La bacteria TD19 se agregó a cada tanque en cantidades aproximadas de 20 L para tener una concentración inicial de  $3.5 \times 10^3$  unidades formadoras de colonias (UFC) mL<sup>-1</sup>. Como fuente de nutrientes se adicionó a cada tanque F/2 (Guillard, 1975) a una concentración de F/14 y como fuente de carbono para bacterias se utilizó melaza (15 g/m<sup>3</sup>). La aireación fue por medio de blower a una relación de 100 Hp / Ha, su distribución del aire fue con aireadores contruidos de fibra de vidrio con salidas en la parte inferior con tubo de microporo.



**Figura 5.** Esquema de los tratamientos evaluados con diferentes microalgas para la inducción del biofloc.

### VI.2.3. Cultivo del camarón

Las poslarvas de camarón blanco *P. vannamei* fueron adquiridas del laboratorio comercial: Acuacultura Mahr de Baja California Sur, México en el estadio PL-10, se mantuvieron en aclimatación en tanques de 15 000 L de volumen con agua clara tratada como se mencionó anteriormente a una densidad de 125 organismos/L hasta llegar con un peso promedio de  $1400 \pm 30$  mg (Figura 6a), para después ser colocadas en nueve tanque de 28,000 L con el biofloc, (tres tanques por tratamiento) a una densidad de 350 camarones/m<sup>3</sup>. Se agregó cada ocho días 200 L de la microalga correspondiente a cada tanque de acuerdo con el tratamiento, junto con 20 L de la bacteria TD19. La alimentación del camarón fue suministrada cada 3 horas, con un alimento comercial del 35% de proteína (Nutrimentos Acuícolas Azteca, Guadalajara, Jalisco, México), a una tasa inicial de 6% y reduciéndola al final de 4.4% respecto a la biomasa del camarón, la cual fue estimada por biometrías semanales. Los datos obtenidos de las biometrías también fueron utilizados para calcular la cantidad de melaza que se agregaba diariamente de acuerdo con la relación de carbono nitrógeno (C: N) de 15:1, (Avnimelech 1999) y para calcular los parámetros zootécnicos del cultivo.

### VI.2.4. Calidad del agua

Se registró la temperatura y oxígeno disuelto cada tres horas con un oxímetro (YSI EcoSense DO200A), el pH se midió una vez por día con un potenciómetro (HANNA, Hi 98127), la salinidad con un refractómetro manual (BTX – 1, VEE GEE) y el volumen de biofloc (VBF) se determinó semanalmente mediante el uso de conos Imhoff, sedimentando 1 L por 30 minutos (Avnimelech, 2009). Los análisis del total de amonio, nitritos y nitratos se determinaron utilizando el Kit comercial LYSA y realizando las lecturas por espectrofotometría con un equipo YSI®, Photometer Ecosense 9500®, para esto se colectaron de forma aleatoria muestras de 50 ml de agua de cada tanque, por triplicado cada ocho días.

Los pasos del método realizado con el kit comercial para determinar la concentración de Amonio, Nitritos y Nitratos por el método LYSA se indican a continuación.

### **Determinación de amonio**

1.- Se midieron 10 mL de muestra y se colocaron en tubos de 50 mL, por triplicado. Se preparó un blanco con agua destilada.

2.- Se agregaron 4 gotas de LYSANH4-1 y 4 gotas de LYSANH4-2. Después se agregó una cucharadita (~60 µg) de LYSANH4-3 y se agitó hasta disolver.

3.- Se dejó reposar en la oscuridad por 30 minutos y se tomó la lectura a 640nm.

### **Determinación de nitritos**

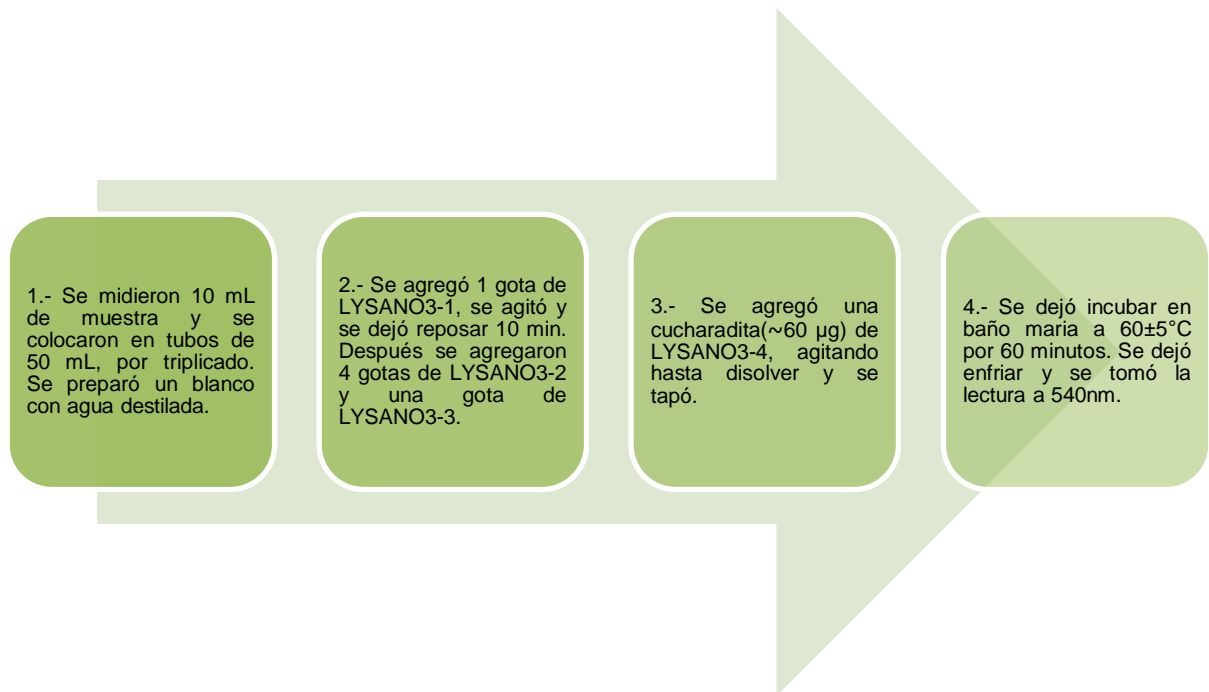
1.- Se midieron 10 mL de muestra y se colocaron en tubos de 50 mL, por triplicado. Se preparó un blanco con agua destilada.

2.- Se agregaron 4 gotas de LYSANO2-1.

3.- Se agregó una cucharadita (~60 µg) de LYSANO2-2 y se agitó hasta disolver.

4.- Se dejó reposar al menos 10 minutos y se tomó la lectura a 540nm.

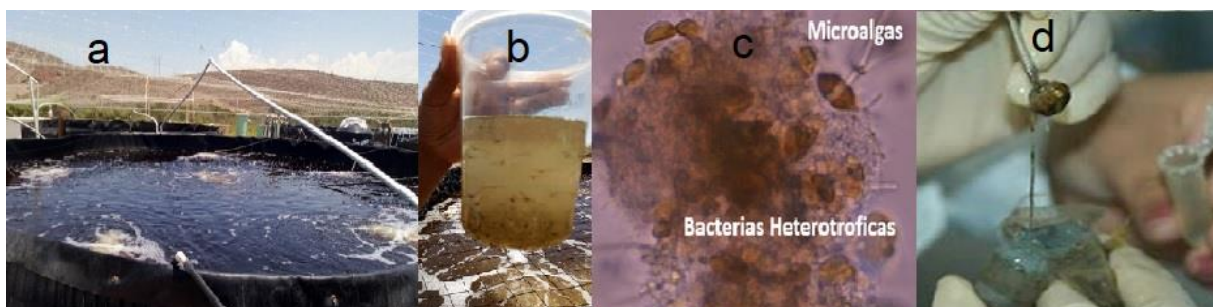
## Determinación de nitratos



### VI.2.5. Microorganismos en el biofloc

#### VI.2.5.1. Monitoreo de bacterias ácido lácticas y del género *Vibrio*

El muestreo para determinar por cuenta viable en número de UFC/ml de BAL y *Vibrio* spp, consistió en la toma de tres muestras de cada tanque cada ocho días, hasta finalizar el experimento, evaluándose la concentración de éstas bacterias en el floc (Figura 6c) e intestinos (Figura 6d) de tres camarones por tanque. Para llevar a cabo la cuenta viable de bacterias se utilizaron diluciones decimales y la técnica de extensión en superficie (APHA 1995). Las muestras homogenizadas de 0.1 mL con sus respectivas diluciones fueron sembradas en medio de Agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS; DIFCO, EE.UU) para bacterias ácido lácticas y en medio tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS; DIFCO, EE.UU) para *Vibrio* spp, manteniéndose en incubación a  $30 \pm 2$  °C durante  $24 \pm 2.0$ ; después del periodo de incubación, las colonias fueron contadas para determinar el número de unidades formadoras de colonia (UFC mL<sup>-1</sup>).



**Figura 6.** Cultivo hiperintensivo de camarón blanco; a) Tanque de geomembrana para el cultivo del camarón con sistema de Biofloc, b) Monitoreo de organismos, c) biofloc inducido con microalgas y bacterias probióticas y d) Toma de muestras de intestinos de camarón.

#### **VI.2.5.2. Monitoreo de microalgas adicionadas y microorganismos asociados al biofloc**

Para cuantificar la concentración de microalgas utilizadas para la inducción del biofloc, fueron colectadas cada ocho días, tres muestras del agua con biofloc por tanque, se realizaron diluciones con agua de mar y con una cámara de Neubauer se contabilizaron con ayuda de un microscopio óptico Olympus®. Para determinar el número de otros microorganismos asociados al biofloc como son ciliados, rotíferos y nematodos, se tomó 1mL del agua con biofloc y se agregó lugol, se observaron y contabilizaron en una cámara de Sedgewick-Rafter. La identificación se realizó con ayuda de literatura especializada (Alandro-Lubel, 2009).

#### **VI.2.6. Análisis bromatológico del biofloc**

Para determinar la composición del biofloc, se colectaron muestras de 1 L de agua con biofloc de todos los tanques en los días de cultivo: 15, 30, 45 y 60. Las muestras fueron centrifugadas y lavadas con agua destilada para eliminar el exceso de sales y se congelaron a -80°C. Las muestras fueron liofilizadas en un equipo marca Telstar, modelo cryodos, para después ser mantenidas a 23 °C hasta su procesamiento por triplicado. El contenido de cenizas se determinó por incineración (Mufla TERLAB) a 550 °C por 24 h, los pesos se determinaron mediante una balanza analítica (Vibra HT-224 R). El contenido de proteína fue obtenido con muestras de 4-6 mg (Lowry *et al.*, 1951 y modificado por Malara y Charra 1972). El contenido de carbohidratos se

determinó con muestras de 4-6 mg (White 1987 y Dubois *et al.*, 1956). Los lípidos fueron extraídos y su determinación se realizó por el método gravimétrico empleando de 20-30 mg por muestra analizada (Bligh and Dyer 1959).

#### **VI.2.7. Rendimiento en el cultivo en camarón**

El peso del camarón fue monitoreado cada semana utilizando una balanza para laboratorio GRAM FC con precisión de 0.001 a 0.1 g, por muestreos al azar de 100 camarones por tanque. Se estimó la biomasa final ( $\text{g/m}^3$ ), tasa de crecimiento semanal y tasa de conversión alimenticia (TCA) (Zhao *et al.*, 2012). La supervivencia y tasa de crecimiento específica (%) (Kumar *et al.*, 2018).

#### **VI.2.8. Análisis estadísticos**

Los datos obtenidos fueron verificados con los supuestos de homocedasticidad y normalidad (Bartlett's y Kolmogorov-Smirnov tests). Los parámetros de calidad del agua, concentración de microorganismos (bacteriana, microalgas inducidas, ciliados, rotíferos y nemátodos), composición de BFT, supervivencia (arcoseno transformado), peso final, tasa de crecimiento específica y factor de conversión alimenticia (FCR) se analizaron con una ANOVA de una vía (Zar, 1996). La prueba de Tukey fue aplicada en caso de encontrar diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con el software Statistica 8.5.1 para Windows.

## VI.3. RESULTADOS

### VI.3.1. Calidad del agua

Durante el experimento las variables de calidad del agua; temperatura, oxígeno disuelto, salinidad y pH presentaron valores similares en los tres tratamientos, sin diferencia significativa. El oxígeno disuelto mantuvo rangos de 5.5 a 6.3 mg L<sup>-1</sup>; la temperatura de 25 a 31°C; Salinidad de 36 a 38‰ y el pH de 7.3 a 8.0 (Tabla 1). Los compuestos nitrogenados mantuvieron concentraciones promedio similares en los tres tratamientos durante el experimento. Los resultados del volumen del biofloc no mostraron diferencia significativa ( $P > 0,05$ ) al comparar los tratamientos. Los valores iniciales (día 7 de cultivo) de concentración de flóculos fueron de 4.10 mL L<sup>-1</sup> para BFD1, 3.80 mL L<sup>-1</sup> en el BFD2, de 3.45 mL L<sup>-1</sup> en tratamiento BFS, mientras que al final del experimento (día 42 de cultivo) se tuvieron: 13.45 mL L<sup>-1</sup> en el tratamiento BFD1, en BFD2 13.27 mL L<sup>-1</sup>, y en BFS 13.11 mL L<sup>-1</sup>.

**Tabla 1.** Valores de calidad del agua en cultivos de *P. vannamei* en biofloc inducido con *Schizochytrium* sp., *Grammatophora* sp., y *Navicula* sp. (BFD1), biofloc con *Schizochytrium* sp., y *Navicula* sp. (BFD2), biofloc con *Schizochytrium* sp. (BFS) y *L. fermentum* TD19 en todos los tratamientos durante seis semanas de cultivo.

Parámetro	Tratamientos		
	BFD1	BFD2	BFS
Oxígeno (mg L <sup>-1</sup> )	5.98±0.33	5.92±0.30	5.92±0.34
Temperatura (°C)	27.12±1.98	27.22±1.91	27.18±1.94
pH	7.72±0.29	7.71±0.31	7.69±0.34
Salinidad (‰)	37.62±0.70	37.72±0.74	37.72±0.69
Volumen del biofloc (ml L <sup>-1</sup> )	8.34±4.70	8.29±4.80	8.30±4.82

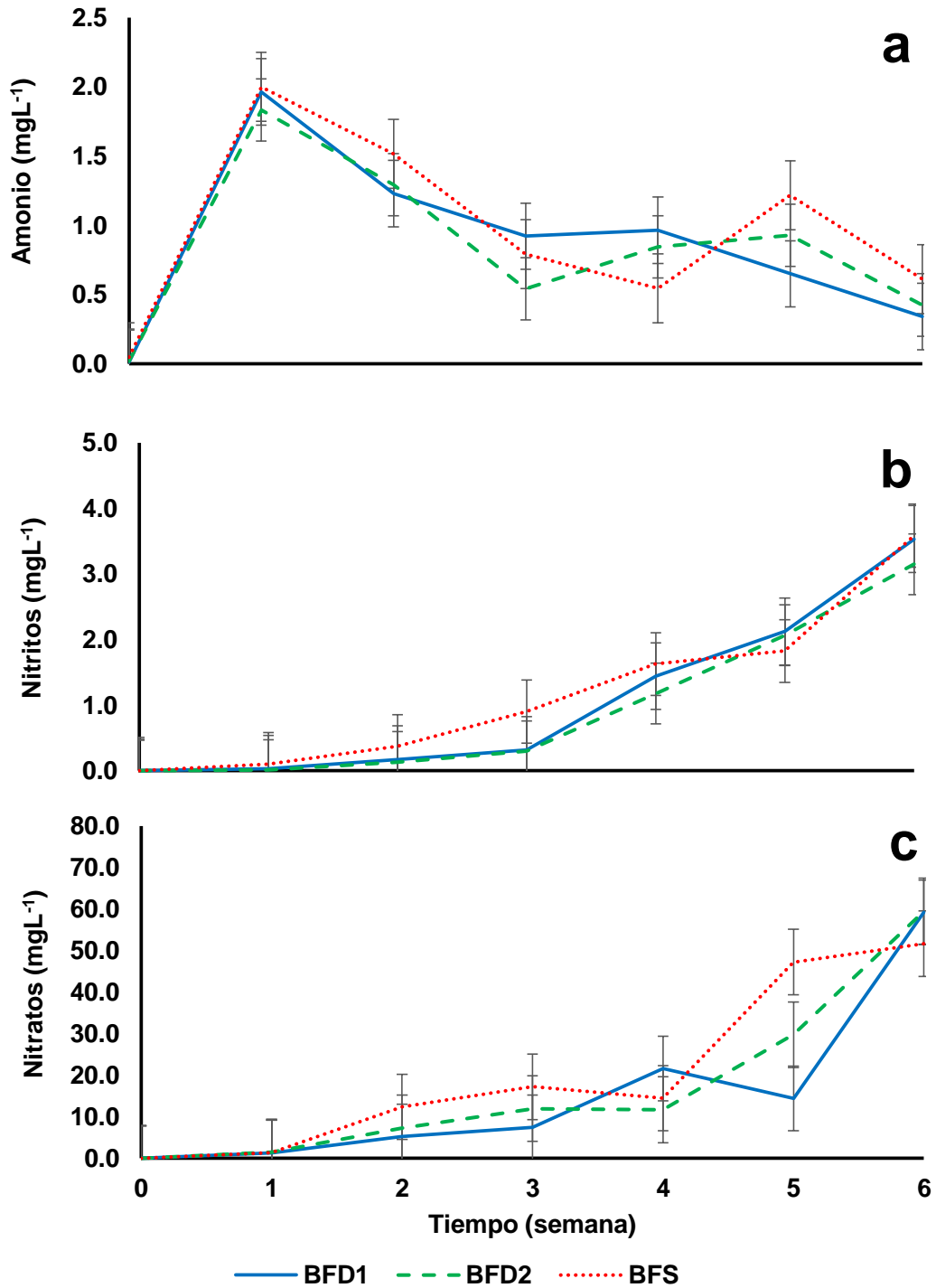
Valores promedio ± desviación estándar (SD). La ausencia de subíndices indica que no hay diferencia significativa entre los tratamientos (ANOVA de una vía,  $P < 0.05$ ).



Los niveles máximos de amonio se registraron en la primera semana de cultivo en todos los tratamientos: BFS con  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ , BFD1 con  $1.96 \text{ mg L}^{-1}$  y BFD2 con  $1.83 \text{ mg L}^{-1}$ . A partir de la semana dos se observó una disminución en la concentración de amonio en los tres tratamientos, teniendo en la semana tres de  $0.92 \text{ mg L}^{-1}$  en BFD1,  $0.54 \text{ mg L}^{-1}$  en BFD2 y  $0.79 \text{ mg L}^{-1}$  en BFS, manteniéndose hasta la semana 4 con valores  $<1.0 \text{ mg L}^{-1}$ . El BFS mantuvo un ligero incremento de amonio en la semana cinco ( $1.21 \text{ mg L}^{-1}$ ), mientras que en los dos tratamientos con adición de diatomeas se observaron valores  $<0.95 \text{ mg L}^{-1}$  hasta finalizar el experimento (Figura 7a).

Durante las dos primeras semanas de cultivo, en los tres tratamientos los nitritos se mantuvieron en concentraciones  $<0.4 \text{ mg L}^{-1}$ . En la semana tres BFS presentó valores  $>0.9 \text{ mg L}^{-1}$  y en la semana cuatro los tres tratamientos estuvieron entre  $1.11$  y  $1.63 \text{ mg L}^{-1}$ . En la semana seis se alcanzaron las concentraciones de nitritos mayores registrados en el experimento, en BFD1  $3.53 \text{ mg L}^{-1}$ , en BFD2  $3.15 \text{ mg L}^{-1}$ , y en BFS  $3.58 \text{ mg L}^{-1}$  (Figura 7b).

Durante la primera semana, los nitratos mantuvieron concentraciones  $<1.50 \text{ mg L}^{-1}$  y fue incrementándose hasta finalizar el experimento. En la semana tres, todos los tratamientos alcanzaron valores entre  $7.42$  y  $17.22 \text{ mg L}^{-1}$ , incrementándose hasta  $47.27 \text{ mg L}^{-1}$  en la semana cinco en BFS, los valores máximos alcanzados en los tres tratamientos en la última semana fueron entre  $51.00$  y  $59.50 \text{ mg L}^{-1}$  (Figura 7c).



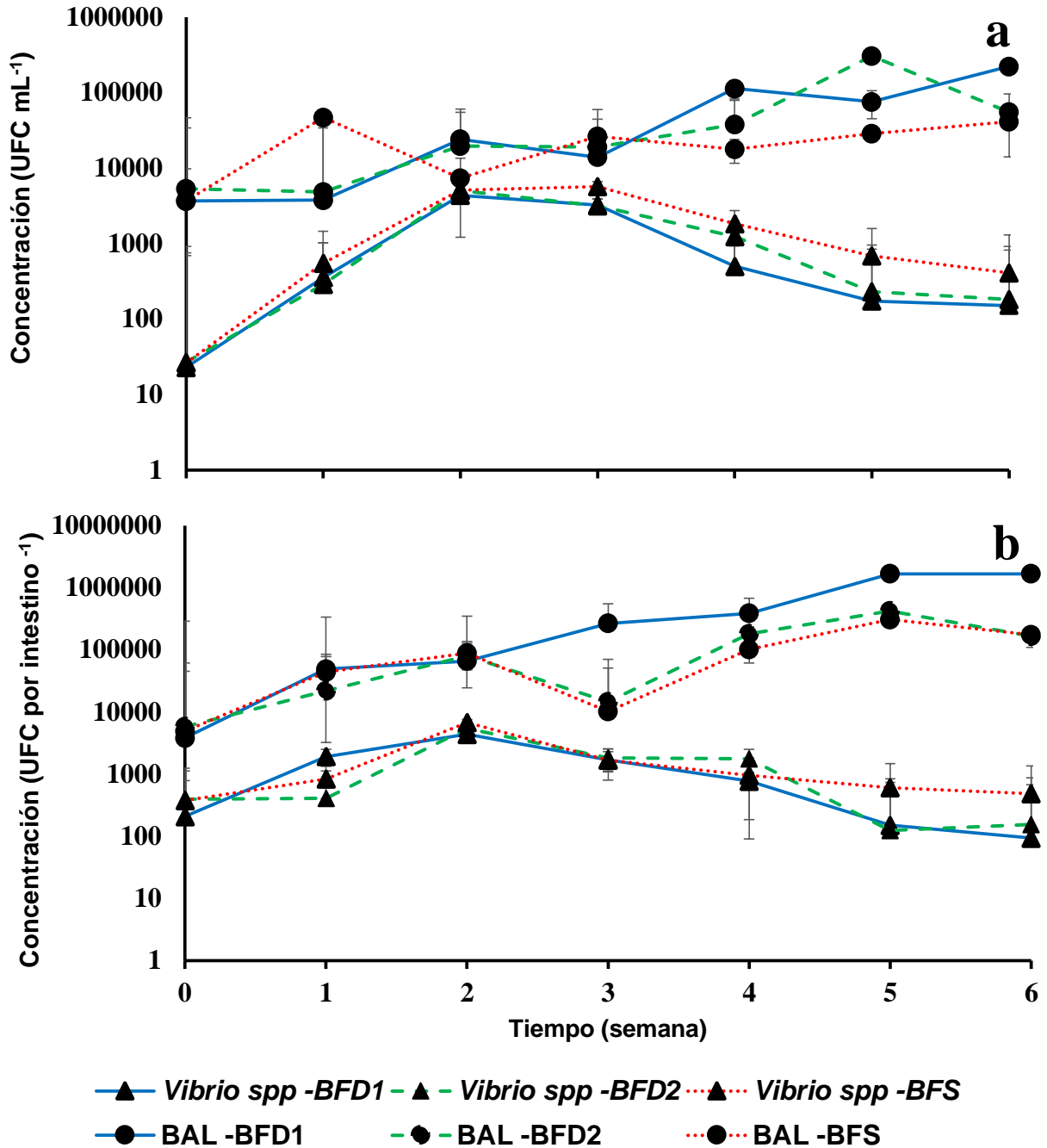
**Figura 7.** Concentraciones de amonio (a), nitritos (b) y nitratos (c), en biofloc inducido con *Schizochytrium* sp., *Grammatophora* sp., y *Navicula* sp. (BFD1), biofloc con *Schizochytrium* sp., y *Navicula* sp. (BFD2) y biofloc con *Schizochytrium* sp. (BFS) y *L. fermentum* TD19 en todos los tratamientos para un cultivo de *P. Vannamei* durante seis semanas. Los valores son presentados como medias  $\pm$  desviación estándar (SD).

### VI.3.2. Microorganismos en el biofloc

#### VI.3.2.1. Bacterias Ácido-Lácticas (BAL) y del género *Vibrio*

Las BAL y *Vibrio* spp., fueron cuantificadas cada semana como UFC por mL<sup>-1</sup> en agua con biofloc y en el intestino de los camarones en cultivo. Las BAL en agua estuvieron inicialmente en el rango de 3.68-5.31 x 10<sup>3</sup> UFC por mL<sup>-1</sup> y se incrementaron gradualmente, hasta los últimos días de cultivo alcanzando concentraciones: 22.32, 5.51 y 4.16 x 10<sup>3</sup> UFC por mL<sup>-1</sup> en BFD1, BFD2 y BFS respectivamente (Figura. 8a). Mientras tanto, las mayores concentraciones *Vibrio* spp., en agua se presentaron en la semana dos: 4.37, 3.05 y 5.14 x 10<sup>3</sup> UFC por mL<sup>-1</sup> en los tratamientos BFD1, BFD2 y BFS, respectivamente. Después en la semana tres inició su descenso hasta la semana seis con concentraciones de: 1.50, 1.83 y 4.10 x 10<sup>2</sup> UFC por mL<sup>-1</sup> en los tratamientos BFD1, BFD2 y BFS, respectivamente (Figura 8a).

En los intestinos de los camarones, las concentraciones de BAL fueron incrementándose durante el experimento, iniciando de la siguiente forma: 3.08, 5.79 y 4.92 x 10<sup>3</sup> UFC por intestino<sup>-1</sup> en BFD1, BFD2 y en BFS. Mientras que en la semana seis: 16.77, 1.65 y 1.75 x 10<sup>5</sup> UFC por intestino<sup>-1</sup> en BFD1, BFD2 y en BFS. (Figura 8b). El conteo de *Vibrio* spp., en intestino también presentó un incremento en la semana dos, observando las siguientes concentraciones: BFD1 con 4.37, BF2 con 5.42 y BFS con 6.75 x 10<sup>3</sup> UFC por intestino<sup>-1</sup>. Posteriormente la concentración de *Vibrio* spp., fue disminuyendo hasta la semana seis: BFD1 con 1.00, BFD2 con 1.55 y BFS con 4.86 x 10<sup>3</sup> UFC por intestino<sup>-1</sup> (Figura 8b).



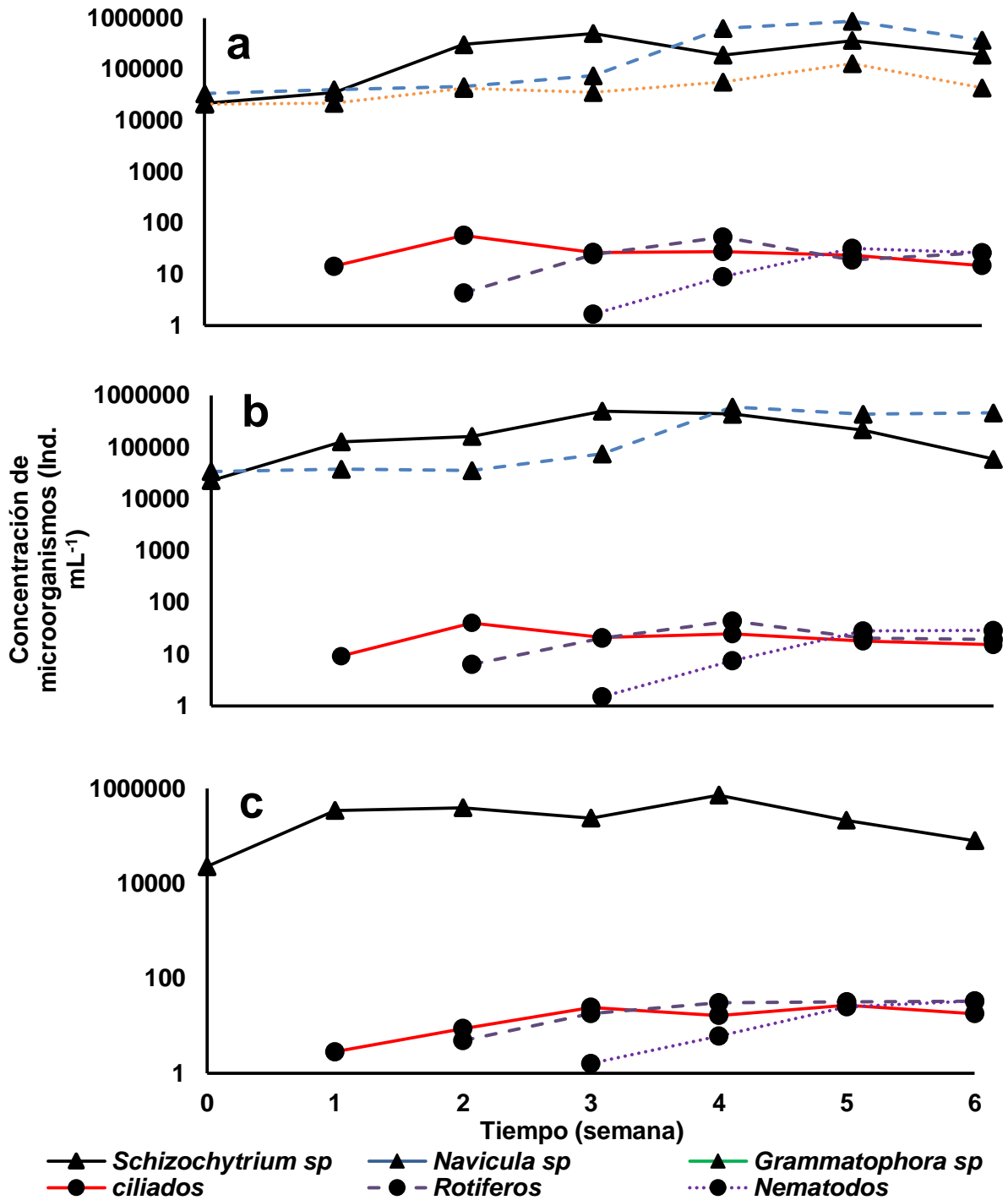
**Figura 8.** Concentración de BAL y *Vibrio* spp., en agua con biofloc (a) y en intestino de camarón (b), de un cultivo con *P. Vannamei* en biofloc inducido con *Schizochytrium* sp., *Grammatophora* sp., y *Navicula* sp. (BFD1), biofloc con *Schizochytrium* sp., y *Navicula* sp. (BFD2) y biofloc con *Schizochytrium* sp. (BFS), con *L. fermentum* TD9 en todos los tratamientos durante seis semanas de cultivo. Los valores son presentados como medias  $\pm$  desviación estándar (SD).

### **VI.3.2.2. Microalgas inoculadas y otros microorganismos asociados al biofloc**

Las microalgas inoculadas permanecieron en los cultivos a través del tiempo. En particular *Schizochytrium* sp., hasta la semana cuatro mantuvo concentraciones de  $4.9 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> en los diferentes tratamientos y posteriormente se presentó una disminución de su concentración en todos los tratamientos (Figura 9), no obstante los análisis estadísticos mostraron que no hay diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) dentro de los tratamientos.

El conteo directo de las diatomeas *Navicula* sp., y *Grammatophora* sp., mostró incrementos en las primeras cuatro semanas, en los tratamientos BFD1 y BFD2, *Navicula* sp., con concentraciones hasta de  $8.60 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> en BFD1 y  $5.90 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> en BFD2 (Figura 9a y 9b). Las concentraciones de *Grammatophora* sp., en los cultivos de BFD1 mostraron poca variación durante el cultivo, obteniéndose en la semana cinco  $1.20 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> (Figura 9a).

Otros microorganismos asociados al biofloc observados fueron ciliados, rotíferos y nematodos, estos dos últimos se mantuvieron en cantidades similares en los tres tratamientos, sin embargo, los ciliados mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en las primeras dos semanas en el tratamiento BFS con respecto al BFD1 y BFD2 que contienen diatomeas. Los ciliados tuvieron presencia a partir de la segunda semana, con promedio de 14, 9 y 3 organismos mL<sup>-1</sup> respectivamente en BFD1, BFD2 y BFS y alcanzaron valores hasta de 40 organismos mL<sup>-1</sup> en los tres tratamientos durante el experimento. Los rotíferos se presentaron a partir de la semana tres con valores máximos: 53 organismos mL<sup>-1</sup> en BFD1, 44 organismos mL<sup>-1</sup> en BFD2 y 33 organismos mL<sup>-1</sup> en BFS, en la semana cuatro para los tratamientos con diatomeas y en semana seis para BFS. Los nematodos se presentaron a partir de la semana tres en los diferentes tratamientos a partir de la semana tres, con concentraciones máximas de 32, 29 y 33 organismos mL<sup>-1</sup> (BFD1, BFD2 y BFS) como se muestra en la Figura 9a, 9b y 9c.



**Figura 9.** Densidad de microorganismos en mL<sup>-1</sup> de microalgas inoculadas, ciliados, rotíferos y nemátodos en bioflocs inducidos: (A), con *Schizochytrium sp.*, *Grammatophora sp.* y *Navicula sp.*, (B) biofloc con *Schizochytrium sp.*, y *Navicula sp.*, (C), biofloc con *Schizochytrium sp.* y todos con *L. fermentum* TD19 en cultivo de *P. vannamei* durante seis semanas.

### VI.3.3. Análisis bromatológico

La composición proximal del biofloc varió en los tratamientos, los adicionados con diatomeas mostraron un mayor contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos. El porcentaje de proteínas es significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) en los tratamientos BFD1 y BFD2, mientras que el mayor ( $P < 0.05$ ) porcentaje de lípidos se obtuvo en el tratamiento BFD1 y en carbohidratos ( $P < 0.05$ ) es mayor para el BFS (Tabla 2).

**Tabla 2.** Composición proximal (% de peso seco) de los Biofloc, inducidos con *Schizochytrium* sp., *Grammatophora* sp., y *Navicula* sp. (BFD1), biofloc con *Schizochytrium* sp., y *Navicula* sp. (BFD2) y biofloc con *Schizochytrium* sp. (BFS) y con *L. fermentum* TD9 en todos los tratamientos en cultivo de *P. vannamei* durante seis semanas de cultivo.

Constituyente (%)	Tratamientos		
	BFTD1	BFD2	BFS
<b>Proteínas</b>	28.12±0.50 <sup>a</sup>	26.39±1.04 <sup>a</sup>	23.81±0.99 <sup>b</sup>
<b>Lípidos</b>	22.44±0.80 <sup>a</sup>	17.31±0.55 <sup>b</sup>	14.31±0.41 <sup>c</sup>
<b>Carbohidratos</b>	30.11±0.23 <sup>c</sup>	35.42±0.91 <sup>b</sup>	43.24±1.83 <sup>a</sup>
<b>Cenizas</b>	19.17±0.23 <sup>a</sup>	19.50±0.09 <sup>a</sup>	18.72±0.51 <sup>a</sup>

Valores promedio  $\pm$  SD ( $n=3$ ) de pool de 4 muestras por tratamiento. Superíndice indica diferencia entre los grupos de tratamientos ( $P < 0.05$ )

### VI.3.4. Rendimiento del cultivo

El rendimiento en *P. vannamei* expuesto a diferentes dietas muestra que el peso inicial, final, tasa de crecimiento por día y semanal, fueron similares ( $P > 0.05$ ) entre los tres tratamientos evaluados. Sin embargo, la supervivencia y desempeño del cultivo en camarón fue superior ( $P < 0.05$ ) en el tratamiento inducido con *Schizochytrium* sp., *Grammatophora* sp., y *Navicula* sp. (BFD1) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Valores promedio del rendimiento en la producción de juveniles *P. vannamei* cultivados en un sistema de cultivo con bioflocs inducidos con *Schizochytrium* sp., *Grammatophora* sp., y *Navicula* sp., (BFD1), biofloc con *Schizochytrium* sp., y *Navicula* sp. (BFD2) y biofloc con *Schizochytrium* sp. (BFS) y con *L. fermentum* TD19 en todos los tratamientos durante seis semanas.

	Tratamientos		
	BFD1	BFD2	BFS
<b>Peso inicial (g)</b>	1.40± 0.22	1.40±0.22	1.40±0.22
<b>Peso final (g)</b>	8.00±0.22	8.10±0.21	7.80±0.50
<b>Tasa de crecimiento Especifico (%/día )</b>	3.12±0.05	3.14±0.05	3.06±0.12
<b>Tasa de conversión alimenticia (%)</b>	0.89±0.02 <sup>b</sup>	0.97±0.02 <sup>a</sup>	0.97±0.06 <sup>a</sup>
<b>Supervivencia (%)</b>	80.08±0.01 <sup>a</sup>	72.49±3.64 <sup>b</sup>	71.71±.001 <sup>b</sup>
<b>Tasa de crecimiento semanal</b>	1.11±0.04	1.12±0.04	1.06±0.08
<b>Desempeño del cultivo</b>	1.04±0.06 <sup>a</sup>	0.84±0.04 <sup>b</sup>	0.78±0.11 <sup>c</sup>

Valores promedios ± desviación estándar (SD). La letra superíndice diferente en la fila indica una diferencia significativa entre los grupos de tratamientos; ANOVA de una vía, (P <0.05).



## VI.4. DISCUSIÓN

La aplicación de la tecnología Biofloc (BFT) ofrece beneficios para mejorar la producción acuícola y podría contribuir para el logro de metas del desarrollo sostenible. Esta tecnología podría resultar en mayor productividad con menos impacto al medio ambiente. Además, se pueden desarrollar sistemas de biofloc inducidos que mantengan la salud de los camarones y que aporten nutrientes al camarón. Sin embargo, la tecnología biofloc todavía está en una etapa temprana y requiere de investigación para diseñar sistemas que mantengan parámetros fisicoquímicos del agua estables y que además de mantener la salud del camarón mantengan parámetros productivos más altos que los sistemas tradicionales. En esta investigación a nivel piloto se experimentó con bioflocs inducidos obteniendo resultados importantes.

Las variables fisicoquímicas del agua en el sistema de cultivo con bioflocs inducidos con diferentes microalgas y una bacteria probiótica en los tres tratamientos mantuvieron valores adecuados para los cultivos del camarón blanco *P. vannamei*, siendo relevante la estabilidad de estas variables para la densidad de cultivo de camarón y volumen evaluado. En este sistema no se presentaron descensos de oxígeno disuelto (OD), que pudieran repercutir en la supervivencia de los camarones. Un estudio realizado en un sistema BFT con densidades similares a este experimento, registró temperaturas de 27 a 32 °C, con bajas concentraciones de OD entre 1.30 a 2.02 mg L<sup>-1</sup> (Krummenauer *et al.*, 2011), comparado con el presente BFT inducido con microalgas y probióticos y con temperaturas similares de 25 a 31°C se observó una concentración de OD con valores mayores de 5.0 mg L<sup>-1</sup>, manteniendo los cultivos de camarón en condiciones recomendadas (Brock and Main 1994) con rangos de 4 a 10 mg L<sup>-1</sup> que aseguran un buen crecimiento del camarón en sistemas BFT. Dos puntos importantes relacionados a temperatura son: la relación entre los incrementos de esta y los descensos de OD ya señalado, lo cual puede afectar al cultivo de acuerdo con (Ponce-Palafox *et al.*, 2019), en este sentido los resultados obtenidos son alentadores ya que a pesar de que estas evaluaciones se realizaron en zona costera donde existen altos incrementos de la temperatura, no se presentaron bajas concentraciones de OD durante las 24 horas del día. Adicionalmente, la densidad de microalgas en el biofloc

particularmente de las diatomeas se mantuvo estable, sin desaparecer o generar Bloom microalgal. A este respecto, se ha señalado que las temperaturas altas pueden ser beneficiosas para el crecimiento de cianobacterias y para una productividad alta de biomasa microalgal, sin embargo, una alta temperatura junto con alta luminosidad puede afectar el crecimiento de diatomeas (Lan *et al.*, 2015). Las poblaciones altas de microalgas en este BFT confirman la tendencia descrita para temperaturas ambientales promedio de 27 °C y sin alta luminosidad, esto último debido a la melaza agregada en estos cultivos, la cual contribuyó a mantener las diatomeas inducidas durante el cultivo, y a generar flóculos de calidad, alimento importante para otros microorganismos (Milhazes-Cunha and Otero, 2017).

Otros parámetros importantes para el cultivo de *P. vannamei* son las concentraciones de los compuestos nitrogenados (Valencia-Castañeda *et al.*, 2019), en este trabajo los biofloc generados en los tres tratamientos mantuvieron concentraciones de amonio, nitritos y nitratos dentro de los rangos recomendables para el cultivo de camarón (Crawford *et al.*, 1999 and Valencia-Castañeda *et al.*, 2019). El contenido de amonio no mostró diferencia significativa entre tratamientos, por otra parte, las variaciones encontradas en el experimento son similares a los reportados (Reis *et al.*, 2019), con incrementos de amonio durante la primera semana y las menores concentraciones al finalizar el experimento. El amonio se controló de manera efectiva en los tres tratamientos con valores promedio por debajo de los niveles tóxicos (De Lourdes *et al.*, 2014), lo cual sugiere un equilibrio en las comunidades microbianas principalmente bacterias y microalgas responsables de la oxidación y la remoción respectivamente, logrando mantener concentraciones aceptables.

Los incrementos en la concentración de amonio y en el volumen de los flóculos, registrados durante la primera semana en los tres tratamientos, están relacionados con un proceso de acumulación de compuestos nitrogenados asociados al inicio de la colonización de bacterias heterótrofas que inician la actividad de oxidación de la materia orgánica y producen amonio el cual es utilizado por otras bacterias nitrificantes y microalgas que mejoran la calidad del agua (Emerenciano *et al.*, 2007). Durante esta primera semana se observó la formación de los flóculos con las microalgas

adicionadas, lo que concuerda con estudios descritos (Fatimah *et al.*, 2019 y Feng *et al.*, 2019) quienes señalan la formación de agregados microbianos al inicio para posteriormente generar características físicas y procesos biogeoquímicos asociados al biofloc, que determinarán la eliminación del nitrógeno amoniacal total, (Ebeling *et al.*, 2006). Los resultados de esta investigación sugieren que en los tres tratamientos con bioflocs inducidos, la formación de agregados microbianos se presentó en la semana dos con bacterias relacionadas con la oxidación de amonio a nitritos, coincidiendo con lo reportado por otros autores (Van Rijn *et al.*, 2006, Ebeling *et al.*, 2006 y Crab *et al.*, 2010). Otro grupo de bacterias que se presentan a medida que se da la maduración del sistema, son las oxidantes de nitritos y que se puede evidenciar por el incremento de concentraciones de nitratos, llegando a valores  $>10.0 \text{ mg L}^{-1}$  después de la semana cuatro, lo que concuerda con lo reportado (Reis *et al.*, 2019). Aunque estos resultados no mostraron diferencias significativas entre los tres tratamientos de microalgas, respecto a concentraciones de compuestos nitrogenados, los adicionados con diatomeas mantuvieron los menores valores, por lo cual se sugiere que estas tienen preferencia por la forma de nitratos, reduciendo la acumulación de estos en el agua de cultivo.

En este estudio, el tratamiento BFD1 mostró la mejor transformación de los compuestos nitrogenados, a este respecto se observó que las microalgas evaluadas contribuyeron a la remoción de compuestos nitrogenados en su forma de nitratos. Diatomeas como *Navicula* sp., han mostrado su captación de nitratos, este proceso está relacionado con los nutrientes necesarios para su crecimiento (Yang *et al.*, 2014). Además, estas microalgas son importantes removedores no solo de Nitrógeno, también de Fósforo a temperaturas de 15°C a 25 °C (Ji *et al.*, 2019). Así mismo se ha reportado la importancia de esta temperatura, en la actividad de microalgas y bacterias que realizan para mejorar la calidad del agua, (Delgadillos-Mirquez *et al.*, 2016), lo anterior podría estar ocurriendo en los flóculos generados. Además, los bioflocs con diatomeas aquí evaluados estuvieron en rangos cercanos a 27°C, lo cual confiere a las microalgas mejores condiciones para la reproducción, crecimiento y actividades asociadas a bacterias para los procesos de nitrificación. Por lo tanto, las diatomeas en los cultivos, favorecieron la eliminación de compuestos que en concentraciones altas

son tóxicos para el camarón. Las diatomeas, además, ayudaron a la formación del biofloc por la segregación de sustancias mucilaginosas (Sanka Immanuel *et al.*, 2017 y Daglio *et al.*, 2018), proporcionando a otros microorganismos una mejor adhesión al biofloc y otros compuestos que son adecuados para su alimentación, como lo indica un estudio con *Navícula* (Fimbres-Olivarria *et al.*, 2018). Las diatomeas también son portadoras de nutrientes necesarios para el crecimiento de diferentes microorganismos presentes en el biofloc, como son los ciliados y rotíferos, los cuales tienen la ventaja de mantenerse en el floc debido a sus diversos tamaños. La presencia de estos microorganismos mejora la calidad nutricional del biofloc, por lo cual en este estudio uno de los aspectos relevantes fue el monitoreo de microorganismos asociados al biofloc inducido con microalgas y bacteria probiótica, así como la concentración de bacterias que pudieran afectar el cultivo de camarón.

El monitoreo de bacterias del género *Vibrio*, es importante por las afectaciones de algunas especies que suelen enfermar los cultivos de camarón blanco (Muthukrishnan *et al.*, 2018), razón por la cual se desea tener una baja concentración de estas bacterias en los cultivos. En un reporte reciente se adicionaron a un cultivo de camarón, la bacteria probiótica *L. fermentum* junto con *Schizochytrium* sp., y mostraron que estos sistemas reducen la concentración de *Vibrio* spp., con mayor eficiencia que un cultivo con probiótico comercial, (Pacheco-Vega *et al.*, 2018). En este sentido, la implementación del probiótico junto con microalgas, puede coadyuvar a mantener una microbiota intestinal saludable en camarón y aumentar su resistencia a *Vibrio* spp., como se mencionó también en otros reportes donde se usó una bacteria del género *Bacillus* como probiótico, (Amoah *et al.*, 2019, Kuebutornye *et al.*, 2019 y Zheng and Wang *et al.*, 2017).

En este estudio el uso de la bacteria probiótica TD19 en los tratamientos con diatomeas mostró resultados favorables para los cultivos, mostrando un incremento de BAL en el biofloc y tracto digestivo del camarón y una disminución de *Vibrio* spp., en los cultivos de camarón en el sistema BFT. Otros estudios mostraron que camarones suplementados con probióticos mantuvieron cantidades superiores de BAL, y disminuyeron las concentraciones totales de *Vibrio* spp., en camarones al adicionar *L.*

*plantarum*, Kongnum and Hongpattarakere *et al.*, (2012). En este estudio, la adición de *L. fermentum* TD19 y microalgas mostró esta misma tendencia: BAL mayores a  $1.00 \times 10^3$  UFC por  $\text{mL}^{-1}$  y menores concentraciones de *Vibrio* spp., al finalizar el experimento.

En este trabajo, las menores concentraciones de *Vibrio* spp., se observaron en el tratamiento de biofloc inducido con diatomeas (BFD1), el cual, además, presentó el mayor número de ciliados. Este grupo de microorganismos ha sido sugerido como bioindicador de calidad de agua (Luna-Pabello *et al.*, 1990) y en este biofloc podría estar contribuyendo en la disminución de bacterias del género *Vibrio*, generando un beneficio al BFT. Los ciliados son organismos filtradores del agua, que retienen bacterias para alimentarse y disminuyen cargas bacterianas. En el tratamiento BFD1 con el mayor número de ciliados, se observó mejor supervivencia del camarón y la menor concentración de *Vibrio*. Es conocido que los ciliados son indicadores de procesos beneficiosos en plantas de tratamiento de agua (Esteban *et al.*, 1991), en los lodos activados reducen las bacterias dispersas y mejoran la floculación (Pajdak- Stós *et al.*, 2017), proceso que beneficia a los bioflocs generados. En este estudio se correlacionó el mayor número de ciliados con el mayor volumen de biofloc, reflejando una mejor floculación.

Otro grupo importante de microorganismos que integraron los bioflocs son los nematodos, que tienen la función de ayudar a la estructuración de biopelícula dentro del biofloc, como de limpieza de materia orgánica o desechos (Du Preez *et al.*, 2018). Otros estudios los han sugeridos como alimento vivo (Santiago *et al.*, 2003 and Schlechtriem *et al.*, 2004), por lo cual su presencia en los bioflocs juega un papel relevante. En este estudio las densidades de nematodos y rotíferos en los tres tratamientos fueron similares. La presencia de estos microorganismos protistas y animales incrementaron el valor nutritivo del biofloc.

Los rotíferos son señalados para la acuicultura como una alternativa de alimentación (Fengqi L. 1996 y Wilcox *et al.*, 2006), la presencia de estos organismos también puede tener una relación con los mejores parámetros. Previos reportes indican que la presencia de rotíferos en cultivos de camarón fue significativamente mejor, respecto a su peso ganado, biomasa, supervivencia y tasa de crecimiento

específica, en tratamientos con mayor número de rotíferos (15 y 20 mL<sup>-1</sup>) y concluyen que el uso de rotíferos *B. rotundiformis* en altas concentraciones mejora los parámetros de producción (Campaña-Torres *et al.*, 2009). El mismo trabajo hace referencia que el incrementar el número de rotíferos puede incrementar la cantidad de amonio pero no a un nivel de afectación, esto porque el cultivo evaluado era con agua sin microalgas, lo cual en este estudio se incluyen, favoreciendo a mejorar la calidad del agua en concentración de amonio, ya que se ha reportado que las microalgas consumen y por lo tanto reducen la concentración de nitrógeno amoniacal (Burford *et al.*, 2002)

El análisis químico proximal del biofloc mostró mayor porcentaje de proteína y lípidos en los bioflocs inducidos con diatomeas, lo cual sugiere que, aunque se tenga la misma cantidad de rotíferos y nematodos en los tres tipos de bioflocs, su valor nutricional puede ser diferente debido al contenido diferente de las microalgas. Un estudio realizado) al evaluar a *Navicula* sp., y *Schizochytrium* sp., en dietas por separado y combinada para *Artemia franciscana*, obtuvo mayor peso seco de la *Artemia* al combinar las microalgas (Pacheco-Vega *et al.*, 2015), en este estudio, el biofloc inducido con dos microalgas mostró tendencias similares.

Las microalgas en este sistema de cultivo contribuyen al adecuado funcionamiento del biofloc y mediante la formación de flóculos nutritivos, proporcionan alimento a bacterias heterotróficas por intercambio extracelular, se conoce que las bacterias pueden encontrarse en la superficie de las pared celular de las microalgas, de donde pueden tomar los compuestos orgánicos de carbono que son necesarios para generar compuestos nutritivos que contribuyen a la remoción de nitratos y segregan sustancias mucilaginosas (Fuentes *et al.*, 2016), con lo cual se diversifican los microorganismos que integran el biofloc. Otro estudio donde emplearon solamente bacterias probióticas para la inducción de flóculos, reportó valores menores al 6% de proteínas y 1% de lípidos (Fleckenstein *et al.*, 2019), que contrastan con lo reportado en este estudio, lo cual sugiere que el adicionar microalgas al biofloc genera un incremento de nutrientes. En otro estudio se muestra la importancia que tiene un biofloc con organismos fototrófos, como las microalgas para mejorar la calidad de lípidos y proteínas, recomendando un sistema que considere 12 h de luz natural y para

mejorar la nitrificación con 12 h de oscuridad (Reis *et al.*, 2019), Estas recomendaciones son las mismas que se usaron en el sistema BFT evaluado en esta investigación.

Este estudio incorporó solo tres especies de microalgas, debido a la escasa información que se tenía en ese momento sobre su manejo en el biofloc. Un estudio previo realizado (Pacheco-Vega *et al.*, 2018), donde incorporó *Schizochytrium* sp., en el biofloc, reportó una variación del porcentaje de proteína (12 a 16 %) y lípidos (18 a 28 %) en la composición del biofloc durante el ciclo del cultivo, en este estudio se obtuvieron resultados similares, sin embargo se sugiere una mejor calidad de estos nutrientes (proteínas y lípidos) debido a la diversidad de microorganismos que integraron este biofloc: bacterias, ciliados, rotíferos y nematodos. Se han señalado cambios en la composición del biofloc debido a cambios en la microbiota del mismo (Martínez-Córdova *et al.*, 2015), además de cambios en las condiciones del cultivo como la temperatura, la salinidad, la intensidad de la luz, el fotoperiodo y disponibilidad de nutrientes, la densidad de la población, la calidad del agua y otros factores (Pacheco-Vega *et al.*, 2018).

La siembra inicial de diatomeas (tratamiento BFD1), dio lugar a mejores resultados de supervivencia y tasa de conversión alimenticia comparado con el tratamiento control (BFS) sin la adición de éstas. En BFD1 también se observó el mayor número de ciliados, rotíferos, nematodos dentro del biofloc sugiriendo una mayor disponibilidad de diferentes nutrientes integrados en el biofloc que se considera como suplemento alimenticio (Avnimelech, 2009).

El tratamiento BFD1 también mantuvo la mejor supervivencia de 80%, resultados favorecedores para un cultivo hiperintensivo, además del FCA obtenido <1.00, valor mejor comparado con valores cercanos a 1.00 Kumar *et al.*, (2018) y aun valor de 1.18 sin la utilización de las diatomeas, en un tratamiento evaluado solo con *Schizochytrium* sp. (Pacheco-Vega *et al.*, 2018). El biofloc inducido es recomendable por el buen manejo de parámetros zootécnicos, los resultados del FCA similar a <1.00 para los tres tratamientos indicaron un buen manejo del alimento comercial, y un adecuado desempeño del cultivo. Además, el haberlo evaluado en densidades de 350

camarones  $\text{m}^3$  muestra una gran ventaja para ser implementado en la acuicultura y para obtener adecuados parámetros de crecimiento en el cultivo de camarón. En otra investigación se reportaron cultivos con densidades de 300 y 400  $\text{m}^2$  con FCA de 1.29 y 2.41, y supervivencia de 81.2 y 75.0 respectivamente (Krummenauer *et al.*, 2011), lo cual está relacionado con los resultados de este estudio. Por lo tanto, usar microalgas con mayor calidad nutritiva genera ventajas que se ven reflejadas en los parámetros zootécnicos del cultivo.

La inducción de flóculos con las tres microalgas mencionadas y la bacteria probiótica es favorable para la producción hiperintensiva del camarón con altas densidades de siembra, necesarias en granjas acuícolas donde necesitan alimento nutritivo y disponible las 24 horas. Este biofloc inducido tiene la ventaja de ser escalado al volumen evaluado, su implementación redujo los costos, lo cual se vio reflejado en el FCA. El uso de diatomeas como alimento natural suplementado a camarones, ha mostrado en otros trabajos buenos resultados zootécnicos en el crecimiento, peso y tasa de conversión (Becerril-Cortes *et al.*, 2018). Las microalgas utilizadas en este estudio han sido descritas en estudios previos: *Schizochytrium* sp., contiene 19.5 de carbohidratos, 25% de lípidos y 26.3% proteína, *Navicula* sp., con 7.7% de carbohidratos, 31.7% de lípidos y 12% de proteínas, *Grammatophora* sp., con 9.3% de carbohidratos, 32.3% de lípidos y 22.7% de lípidos (Pacheco-Vega *et al.*, 2015). Estas características nutricionales pudieron contribuir en la mejor supervivencia de camarón en el tratamiento BFD1 en comparación con el tratamiento BDS sin diatomeas. Por lo tanto, para obtener las mejores variables productivas con camarón en biofloc, se recomienda aprovechar el valor nutritivo de microalgas (Wells *et al.*, 2017) y los beneficios que ofrecen en la formación del biofloc, como la segregación de sustancias para dar un beneficio de antioxidante y actividad antimicrobiana (mucopolisacáridos). Un estudio con adición de *Navicula* sp., mostró diferencias significativas entre los tratamientos al utilizarla como fuente de alimento natural para las postlarvas de *P. vannamei* obteniendo beneficios en el peso final, ganancia de peso, ganancia de biomasa, índice de conversión, tasa de crecimiento específico y supervivencia (Ferreira *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos también son favorables al utilizar a *Navicula* sp., para inducir la formación de flóculos y mejora al integrar otra diatomea,



*Grammatophora* sp., por lo cual en conjunto pueden presentar los beneficios mencionados del tratamiento BFD1. Se ha mencionado a *Schizochytrium aggregatum* como especie de importancia por su capacidad oxidativa, teniendo un papel significativo en la alimentación (Lv *et al.*, 2015), por lo tanto si adicionamos las diatomeas *Navicula* sp., y *Grammatophora* sp., pueden estar contribuyendo en el biofloc no solo para alimentar al zooplancton presente sino también como alimento directo del camarón lo cual permitirá disminuir la cantidad de alimento comercial, debido al aporte alimenticio de los bioflocs disponibles y consumidos por el camarón en cultivo.

## VI.5. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Alandro-Lubel, M. 2009. Manual de protozoarios. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de México, 123 pp.
- Alwis GMC, Jayaweera CD 2011. Hydrilla verticella as a carbon capturing plant. Proceeding of 16<sup>th</sup> International Forestry and Environment Symposium 2011. Boralesgamuwa, Sri Lanka.
- Amoah, K. Huang, Q.C., Tan, B.P., Zhang, S., Chi, S.Y., Yang, Q.H. & Dong, X.H. 2019. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus coagulans* ATCC 7050, improves the growth performance, intestinal morphology, microflora, immune response, and disease confrontation of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology, 87: 796–808.
- APHA, 1995. WPCF, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA.
- Arias-Moscoso, J.L., Espinoza-Barrón, L.G., Miranda-Baeza, A., Rivas-Vega, M.E. & Nieves-Soto, M. 2018. Effect of commercial probiotics addition in a biofloc shrimp farm during the nursery phase in zero water Exchange. Aquaculture Reports, 11: 47-52.
- Arellano, Edgar; Leslie, M.; Mock, C.; Boeing, P.; Maugle, P. 1989. El Papel de los Laboratorios en la Industria del Cultivo del Camarón en Piscina. In A Sustainable Shrimp Mariculture Industry for Ecuador, editado por Olsen, Stephen; Arriaga, Luis. Technical Report Series TR-E-6. 276 pp.
- Avnimelech, Y. 1999. Carbon/Nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. Aquaculture, 176: 227–235.
- Avnimelech, Y. 2009. Biofloc technology. A practical guide book. The World Aquaculture Society, Baton Rouge.
- Avnimelech, Y. 2012. Biofloc technology a practical guide book, The World Aquaculture Society, Baton Rouge, 272 pp.
- Banerjee, S., H. Khatoon, M. Shariff & F.M. yusoff. 2010. Enhancement of *Penaeus monodon* shrimp postlarvae growth and survival without water

exchange using marine *Bacillus pumilus* and periphytic microalgae. *Fish. Sci.* 76: 481-487.

- Baloi M, Arantes R, Schweitzer R, Magnotti C, Vinatea L (2013) Performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* raised in biofloc systems with varying levels of light exposure. *Aquacult Eng* 52:39–44.
- Balcazar, J.L., Rojas, L.T. & Cunningham, D.P. 2017. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of invertebrates Pathology*, 96(2): 147-50.
- Becerril-Cortés, D., Del, M., Monroy-Dosta, C., Gustavo, M., Emerenciano C., Sofia, B. & Schettino-Bermúdez, B.S. 2018. 6(2): 541-547. Effect on nutritional composition of produced bioflocs with different carbon sources (Molasses, coffee waste and rice bran) in Biofloc system. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*; 6(2): 541–547.
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry and Physiology*, 37(8): 911–917.
- Brock, J. & Main, K.L. 1994. A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*. World Aquaculture society, Baton Rouge Louisiana, 242 pp.
- Brito, L. O., Chagas, A. M., Silva, E. P. d., Soares, R. B., Severi, W. and Gálvez, A. O. (2014), Water quality, *Vibrio* density and growth of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) in an integrated biofloc system with red seaweed *Gracilaria birdiae* (Greville). *Aquaculture Research*. doi: 10.1111/are.12552.
- Burford MA, NP Preston, PM Glibert & WC Dennison. 2002. Tracing the fate of 15N-enriched feed in an intensive shrimp system. *Aquaculture* 206: 199-216.
- Burford MA, Thompson PJ, McIntosh RP, Bauman RH, Pearson DC. 2004. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a highintensity, zero-exchange system. *Aquaculture* 232:525–537.
- Campaña-Torres Alfredo, Martínez-Córdova Luis R, Villarreal-Colmenares Humberto, Hernández-López Jorge, Ezquerra-Brauer Josafat M. y Cortés-

Jacinto Edilmar. 2009. Efecto de la adición del rotífero *Brachionus rotundiformis* (Tschugunoff, 1921) sobre la calidad del agua y la producción, en cultivos super-intensivos de camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 44(2): 335-342.

- Correia, E. S., Wilkenfeld, J.S., Morris, T.C., Wei, L., Prangnell, D.I. & Samocha, T.M. 2014. Intensive nursery production of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* using two commercial feeds with high and low protein content in a biofloc-dominated system. *Aquacultural Engineering*, 59: 48–54.
- Cota Sáñez M. 2015. Aislamiento de microalgas marinas y su efecto monoalgal y en combinación con probióticos como alimento vivo de larvas de *Litopenaeus vannamei*. Tesis. Instituto Tecnológico de la Paz. 74 pp.
- Chopin T, Buschmann AH, Troell M, Kautsky N, Neori A, Yarish C, 2001. Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: a key toward sustainability. *J Phycol* 2001; 37: 975–86.
- Chae-Woo, M., C. yun-Seok & O. Kye-Heon. 2009. Removal of pathogenic bacteria and nitrogens by *Lactobacillus* spp. JK-8 and JK-11. *Aquaculture* 287: 266-270.
- Chen, Y. Y., Chen, J. C., Kuo, Y. H., Lin, Y. C., Chang, Y. H., Gong, H. Y., & Huang, C. L. (2016). Lipopolysaccharide and  $\beta$ -1,3-glucan-binding protein (LGBP) bind to seaweed polysaccharides and activate the prophenoloxidase system in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Developmental and Comparative Immunology*, 55, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.10.023>.
- Crab, R. 2010. Bioflocs technology: an integrated system for the removal of nutrients and simultaneous production of feed in aquaculture, 178 pp.
- Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P. & Verstraete, W. 2012. Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*, 356–357: 351–356.
- Cuellar-Anjel, 2013. Enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas. College de Veterinary Medicine Iowa State University 7pp.

- Crawford, B.O.B., Wyk, P.V., Davis-hodgkins M., Laramore, R., Main K.L., Mountain, J. & Scarpa, J. 1999. Farming Marine Shrimp in. Main (4520) Retrieved from.
- 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.
- De Lourdes Cobo, M., Sonnenholzner, S., Wille, M. & Sorgeloos, P. 2014. Ammonia tolerance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) larvae. *Aquaculture Research*, 45(3): 470–475.
- Delgadillo-Mirquez, L., Lopes, F., Taidi, B. & Pareau, D. 2016. Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. *Biotechnology Reports*, 11: 18–26.
- Dalmin, G., K. Kathiresan & A. Purushothaman. 2001. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian J. Exp. Biol.* 39: 939-942.
- Douillet, P.A. 1998. Bacterial probiotic for water quality and disease control. World Aquaculture Society, Las Vegas, Nevada, EE.UU.
- Du Preez, G.C., Daneel, M.S., Wepener, V. & Fourie, H. 2018. Beneficial nematodes as bioindicators of ecosystem health in irrigated soils. *Applied Soil Ecology*, 132: 155–168.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., & Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.
- Ebeling, J.M., Timmons, M.B., & Bisogni, J.J. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257(1–4): 346–358.
- Emerenciano, M.G.C., Wasielesky, W., Soa, Res, R.B., Ballester, E.C., Izeppi, E.M. & Cavalli, R.O. 2007. Crescimento e sobrevivência do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) na fase de berçário em meio heterotrófico. *Acta Scientiarum - Biological Sciences*, 29(1): 1–7.

- Emerenciano M, Cuzon, G., Arevalo, M., y Gaxiola, G. 2013. Biofloc technology in intensive broodstock farming of the pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum*: spawning performance, biochemical composition and fatty acid profile of eggs. *Aquaculture Research* January, doi: 10.1111/ are.12117.
- Esteban, G., Téllez, C. & Bautista. L.M. 1991. Dynamics of ciliated protozoa communities in activated-sludge process. *Water Research*, 25(8): 967–972.
- Farzanfar, A., 2006. The use of probiotic in shrimp aquaculture. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.*48, 149-158.
- Fatimah, N., Pande, G.S.J., Natrah, F. M.I., Meritha, W.W., Widanarni, S.A., & Ekasari, J. 2019. The role of microbial quorum sensing on the characteristics and functionality of bioflocs in aquaculture systems. *Aquaculture*. 504: 420–426.
- Feng, Z., Sun, Y., Li, T., Meng, F. & Wu, G. 2019. Operational pattern affects nitrification, microbial community and quorum sensing in nitrifying wastewater treatment systems *Science of the Total Environment*, 677: 456–465.
- Fengqi L. 1996. Production and application of rotifers in aquaculture. *Aquaculture Magazine* 22: 16-22.
- Ferreira, M.Y., Brito, L.O., Figueiredo da Silva, C.V., Sobral dos Santos, I.G. & Olivera- Galvez, A. 2014. Effect of Addition of *Navicula* sp. on plankton composition and postlarvae growth of *Litopenaeus vannamei* reared in culture tanks with zero water Exchange. *Latin American Aquatic Research*, 42(3): 427–437.
- Ferreira Gabriela soltes, Volivar Norha Constanza, Pereira Acheila Anelise. 2015. Microbial Biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 444, 273-279.
- Fimbres-Olivarria, D., Carvajal-Millan, E., Lopez-Elias, J. A., Martinez-Robinson, K.G., Miranda-Baeza, A., Martinez-Cordova, L.R. & Valdez-Holguin, J.E. 2018. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharides from *Navicula* sp. *Food Hydrocolloids*, 75: 229–236.
- FAO 2001. Planning and management for sustainable coastal aquaculture development. Joint group of experts on the scientific aspects of Marine environmental protection.

- FAO. 2010. The State of World Fisheries and Aquaculture 2010 Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy (2010), p. 197.
- Fleckenstein, L.J., Tierney, T.W., Fisk, J.C. & Ray, A.J. 2019. Effects of supplemental LED lighting on water quality and Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) performance in intensive recirculating systems. *Aquaculture*, 504: 219–226.
- Flores I. J. *et al.* 2007. “Puntos críticos en la evaluación del impacto ambiental de la camaronicultura en el pacífico de Nicaragua, durante su proceso productivo” en *Universita*. Vol. 1, Núm. 1, pp. 33-38.
- Fuentes, J., Garbayo, I., Cuaresma, M., Montero, Z., González-del-Valle, M. & Vilchez, C. 2016. Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of algal biomass and associated compounds. *Marine drugs*, 14(5): 100.
- Guillard, R.R. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *Culture of Marine Invertebrate Animals*, 3: 29 –60.
- Gutierrez-Wing, M.T. & R. Malone. 2006. Biological filters in aquaculture: Trends and research directions for freshwater and marine applications. *Aquac. Eng.* 34: 163-171.
- Hanson, T., Samocha, T., Morris, T., Advent, B., Magalhaes, V., Braga, A., 2013. Economic analyses proyect rising returns for intensive biofloc shrimp systems. *Global Aquac. Adv.* 16 (4), 24-26.
- Hargreaves, J. 2013. Biofloc production systems for aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center publication, 4503.
- Hari, B., Kurup, B.M., Varghese, J.T., Schrama, J.W. & Verdegem, M.C.J. 2004. Effects of carbohydrate addition on production in extensive shrimp culture systems. *Aquaculture*, 241: 179–194.
- Hernández-Castro, J.E. 2015. Interacción Mixotrófica de microalgas marinas y bacterias probióticas con enfoque a la formación de bioflocs para la acuicultura. Tesis. UABCS. P 1-71.
- Hernández-Rubio, J. 2015. Inmunoestimulación por alimentos Artificiales Adicionados con microalgas marinas sobre postlarvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis. UABCS. P 1-64.

- Hernández-Castro, J.E., Pacheco-Vega, J.M. 2015. Interacción mixotrófica de microalgas marinas y bacterias probióticas. Editorial Académica Española, 978-3-8473-5782-7, p 88, ISBN-13.
- Ismail, M.M. & W.S. Soliman. 2010. Studies on Probiotic Effects of Lactic Acid Bacteria Against *Vibrio vulnificus* in freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Am. J. Sci. 6: 781-787.
- Jana, B.B. & S. Jana. 2003. The potential and sustainability of aquaculture in India. J. Appl. Aquacult. 13: 283-316.
- Ji, L., Song, W., Wei, D., Jiang, D., Cai, L., Wang, Y. & Zhang, H. 2019. Modified mussel shell powder for microalgae immobilization to remove N and P from eutrophic wastewater. Bioresource Technology, 36–42.
- Kongnum, K. & Hongpattarakere, T. 2012. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. Fish and Shellfish Immunology 32(1): 170–177.
- Kim, S. K., Pang, Z., Seo, H. C., Cho, Y. R., Samocha, T., & Jang, I. K. 2014. Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture Research*, 45(2), 362–371. <https://doi.org/10.1111/are.12319>
- Krummenauer, D., Peixoto, S., Cavalli, R.O., Poersch, L.H. & Wasielesky, W. 2011. Superintensive Culture of White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in a Biofloc Technology System in Southern Brazil at Different Stocking Densities. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42(5): 726–733.
- Kuebutornye, F.K.A., Abarike, E.D. & Lu, Y. 2019. A review on the application of Bacillus as probiotics in aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*. Academic Press.
- Kumar, S.V., Pandey, P.K., Anand, T., Bhuvaneshwari, G.R., Dhinakaran, A. & Kumar, S. 2018. Biofloc improves water, effluent quality and growth parameters of *Penaeus vannamei* in an intensive culture system. *Journal of Environmental Management*, 215: 206–215.



- Lan S., Wu, L., Zhang, D. & Hu, C. 2015. Effects of light and temperature on open cultivation of desert cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. *Bioresource Technology*, 182: 144–150.
- Leaña, E.M. y Mohan C.V. 2012. EM Síndrome de la mortalidad temprana amenaza de camarón de Asia. *Glob. Aquac. Abogado*, 4 (2012), pp. 38-39.
- Lin, H.Z., Guo, Z., Yang, Y., Zheng, W. & Li, Z.J. 2004. Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. *Aquaculture Research*, 35(15): 1441–1447.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265–275.
- Luna-Pabello, V.M., Mayén, R., Olvera-Viascan, V., Saavedra, J. & Durán de Bazúa, C. 1990. Ciliated protozoa as indicators of a wastewater treatment system performance. *Biological Wastes*, 32(2): 81–90.
- Lv, J., Jingfang, D., Yu, B.Z., Fengling, B., Honngfei, Z. & Jianrong, L. 2017. Purification and antibacterial mechanism of fish-borne bacteriocin and its application in shrimp (*Penaeus vannamei*) for inhibiting *Vibrio parahaemolyticus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33: 156.
- Lv, J., Yang, X., Ma, H., Hu, X., Wei, Y., Zhou, W. & Li, L. 2015. The oxidative stability of microalgae oil (*Schizochytrium aggregatum*) and its antioxidant activity after simulated gastrointestinal digestion: Relationship with constituents. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(12): 1928–1939.
- Ma, C.W., Cho, Y.S. & Oh, K.H. 2009. Removal of pathogenic bacteria and nitrogen by *Lactobacillus* spp. JK-8 and JK-11. *Aquaculture*, 287(3–4): 266–270.
- Lopez-Martíez J. Hernández-Vázquez S. Herrera-Valdivia E. Rodríguez-Romero J. y A. Chávez eresto. 2010. Influencia ambiental e la pesquería de camarón.p.114. En: La variabilidad ambiental y las pesquerías de México. López-Martíez, J., (Ed) Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. México.200 p.
- Martínez-Córdova, L. R., Emerenciano, M., Miranda-Baeza, A., & Martínez-Porchas, M. 2015. Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: An updated review. *Reviews in Aquaculture*, 7(2); 131–148.

- Malara, G. & Charra, R. 1972. Dosages des proteines partiulaires selon la méthode de Lowry. Université de Paris, Station Zoologique, Villefranche-Sur-Mer, Notes de Travail, 6:11.
- Milhazes-Cunha, H. & Otero, A. 2017. Valorisation of aquaculture effluents with microalgae: The Integrated Multi-Trophic Aquaculture concept. *Algal Research*, 24: 416–424.
- Monroy DM, Lara AR, Castro MJ, Castro MG, Emerenciano CM. 2013. Composición y abundancia de comunidades microbianas asociadas al biofloc en un cultivo de tilapia. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*; 48(3):511-520.
- Morales, V., 1990. Levantamiento larvario de camarones peneidos. Cartilla Pradepesca. 1 pp.
- Morales Cristobal. Y. 2012. Evaluación de crecimiento y del contenido de Hemocitos circulantes totales en juveniles de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, expuestos a dietas experimentales con diferentes niveles de proteína y probiótico. Tesis. UABCS. 98 pp.
- Muthukrishnan, S., Defoirdt, T., Ina-Salwany, M.Y., Yusoff, F.M., Shariff, M., Ismail, S.I. & Natrah, I. 2019. *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* causing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) isolated from Malaysian shrimp ponds. *Aquaculture*, 511.
- Neori A, Chopin T, Troell M, Buschmann AH, Kraemer GP, Halling C, Shpigel M, Yarish C. 2004. Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture* 231:361–391.
- Pacheco-Vega, J. M., Cadena-Roa, M.A., Leyva-Flores, J.A., Zavala-Leal, O.I., Pérez-Bravo, E. & Ruiz-Velazco, J.M.J. 2018. Effect of isolated bacteria and microalgae on the biofloc characteristics in the Pacific white shrimp culture. *Aquaculture Reports*, 11: 24–30.
- Pacheco-Veja, J.M., Cadena-Roa, M.A., Ascencio, F., Rangel-Dávalos, C. & Rojas-Contreras, M. 2015. Assessment of endemic microalgae as potential food

for *Artemia franciscana* culture. Latin American Journal of Aquatic Research, 43: 23-32.

- Pajdak-Stós, A., Sobczyk, M., Fiałkowska, E., Kocerba-Soroka, W. & Fyda, J. 2017. The effect of three different predatory ciliate species on activated sludge microfauna. European Journal of Protistology, 58: 87–93.
- Pérez-Farfante, I & Kensley, B. 1997. Keys and diagnoses for the families angenera. Penaeoid and sengeroid shrimps and prawns of the world. Memoires du museum national histoire naturelle. pp 233.
- Plascencia, Espinosa y Berm, Carmen. 2012. La acuicultura y su impacto al medio ambiente. *Estudios Sociales*, (2), 221–232.
- Ponce-Palafox, J.T., Pavia, Á.A., Mendoza-López, D.G., Arredondo-Figueroa, J.L., Lango-Reynoso, F., Castañeda-Chávez, M. del R. & Peraza-Gómez, V. 2019. Response surface analysis of temperature-salinity interaction effects on water quality, growth and survival of shrimp *Penaeus vannamei* postlarvae raised in biofloc intensive nursery production. *Aquaculture*, 503: 312–321.
- Quijano, G., Arcila, J.S. & Buitrón, G. 2017. Microalgal-bacterial aggregates: Applications and perspectives for wastewater treatment. *Biotechnology Advances Elsevier Inc*, 35(6): 772-781.
- Reis, W.G., Wasielesky, W., Abreu, P.C., Brandão, H. & Krummenauer, D. 2019. Rearing of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in BFT system with different photoperiods: Effects on the microbial community, water quality and zootechnical performance. *Aquaculture*, 508: 19–29.
- Rojas, A.A., Haws, M.C. y Cabanillas, J.A. ed. 2005. Buenas Prácticas de Manejo Para el Cultivo de Camarón. The David and Lucile Packard Foundation. United States Agency for International Development (Cooperative Agreement No. PCE-A-00-95- 0030-05).
- Roque A, Molina AA, Bolán MC, Gómez GB. 2001. *In vitro* susceptibility to 15 antibiotic of *Vibrios* isolated from penaeid shrimps in Northwestern México. *International Journal Antimicrobial agents* 17: 383-387.

- 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.
- Shariff, M.F., M. Yusoff, T.N. Devaraja & P.S. Srinivasa Rao. 2001. The effectiveness of a commercial microbial product in poorly prepared tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius), ponds. Aquac. Res. 32: 181-187.
- Sansawat, A. & M. Thirabunyanon. 2009. Anti-Aeromonas hydrophila activity and characterization of novel probiotic strains of Bacillus subtilis isolated from the gastrointestinal tract of giant freshwater prawns. J. Sci. Technol. 3: 77-87.
- 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.
- Santiago, C.B., Gonzal, A.C., Ricci, M. & Harpaz, S. 2003. Response of bighead carp *Artisticthys nobilis* and Asian catfish *Clarias macrocephalus* larvae to free-living nematode *Panagrellus redivivus* as alternative feed. Journal of Applied Ichthyology, 19: 239-243.
- Samocha, T.M., S. Patnaik, M. Speed, A.M. Ali, J.M. Burger, R.V. Almeida, Z. Ayub, M. Harisanto, A. Horowitz & D.L. Brock. 2007. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. Aquacult. Eng., 36: 84-191.
- Schlechtriem, C., Ricci, M., Focken, U. & Becker, K. 2004. Mass produced nematodes *Panagrellus redivivus* as live food for rearing carp larvae: Preliminary results. Aquaculture Research, 35(6): 547–551.
- Schweitzer, R., Arantes, R., Costodio, P.F.S., Do Espirito Santo, C.M., Arana, L.V., Seiffert, W.Q., & Andreatta, E.R. 2013. Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. Aquacultural Engineering, 56: 59–70.
- Serra, F.P., Gaona, A.C.P., Furtado, P.S., Poersch, L.H. & Wasielesky, J.W. 2015. Use of different carbon sources for the biofloc system adopted during the

nursery and grow-out culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture international*, 23: 1325-1339.

- Sun, L., Ren, L., Zhuang, X., Ji, X., Yan, J. & Huang, H. 2014. Differential effects of nutrient limitations on biochemical constituents and docosahexaenoic acid production of *Schizochytrium* sp. *Bioresource Technology*, 159: 199–206.
- Timmons, M.B., Ebeling, J.M., Wheaton, F.W., Sommerfelt, S.T. & Vinci, B.J. 2002. Microbial biofloc and protein levels in green tiger shrimp. *Recirculating aquaculture systems*, 748.
- Valencia-Castañeda, G., Frías-Espericueta, M.G., Vanegas-Pérez, R.C., Chávez-Sánchez, M.C. & Páez-Osuna, F. 2019. Toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to *Litopenaeus vannamei* juveniles in low-salinity water in single and ternary exposure experiments and their environmental implications. *Environmental Toxicology and Pharmacology*.
- Venkat, H.K., N.P. Shau & K.J. Jain. 2004. Effect on feeding Lactobacillus-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquac. Res.* 35: 501-507.
- Van Rijn, J., Tal, Y. & Schreier, H.J. 2006. Denitrification in recirculating systems: Theory and applications. *Aquacultural Engineering*, 34(3): 364–376.
- Wasielesky, W., Atwood, H., Stokes, A., & Browdy, C. L. 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 258(1–4), 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.030>.
- Wei, Y.F., Liao, S.A. & Wang, A. 2016. The effect of different carbon sources on the nutritional composition, microbial community and structure of bioflocs. *Aquaculture*, 465: 88–93.
- Wells, M.L., Potin, P., Craigie, J.S., Raven, J.A., Merchant, S.S., Helliwell, K.E. & Brawley S.H. 2017. Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *Journal of Applied Phycology*. Springer Netherlands.
- Wilcox JA, PL Tracy & NH Marcus. 2006. Improving live feeds: Effect of a mixed diet of copepod nauplii (*Acartia tonsa*) and rotifers on the survival and growth of

firstfeeding larvae of the southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. *Journal of the World Aquaculture Society* 37: 113-120.

- White, J.N.C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, 60: 231-241.
- Xie, J.J., Liu. Q., Liao, S., Fang, H.H., Yin, P., Xie, S.W. & Niu, J. 2019. Effects of dietary mixed probiotics on growth, non-specific immunity, intestinal morphology and microbiota of juvenile pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology* 90: 456–465.
- Xu we-jie y Pan Lu-Qing. 2014. Dietary protein level and C/N ratio manipulation in zero-exchange culture of *Litopenaeus vannamei*: Evaluation of inorganic nitrogen control, biofloc composition and shrimp performance. *Aquaculture Research* 45, 1842-1851.
- Yang, M., Zhao, W. & Xie, X. 2014. Effects of nitrogen, phosphorus, iron and silicon on growth of five species of marine benthic diatoms. *Acta Ecologica Sinica*, 34(6): 311–319.
- Zar, J. 1996. *Biostatistical Analysis*, third edition. Prentice-Hall, NJ, USA.
- Zhao, P., Huang, J., Wang, X.H., Song, X.L., Yang, C.H., Zhang, X.G. & Wang, G.C. 2012. The application of bioflocs technology in high-intensive, zero exchange farming systems of *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture*, 354: 97–106.
- Zheng, C.N. & Wang, W. 2017. Effects of *Lactobacillus pentosus* on the growth performance, digestive enzyme and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture Research*, 48(6): 2767–2777.

FAO [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus\\_vannamei/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/en)

## VII. CAPÍTULO 2

### **“Efecto de tres niveles de proteína en el crecimiento y sistema inmune de *P. vannamei* cultivado en un sistema BFT inducido con microalgas y probióticos”**

#### VII.1. INTRODUCCIÓN

En los cultivos de camarón blanco *Penaeus vannamei* la alimentación es importante en el crecimiento y tolerancia a enfermedades (Cuzon *et al.*, 2004), por lo tanto, para obtener los mejores rendimientos de acuerdo con parámetros zootécnicos (Kureshy y Allen, 2002) y desempeño del cultivo se requieren los mejores. Durante el proceso de engorda del camarón se espera obtener los mejores pesos y tallas, lo cual puede ser alcanzado, sin embargo, en algunos casos se presenta una alta mortalidad, debido al inadecuado funcionamiento del sistema inmune del camarón, que los hace propensos a enfermedades bacterianas ocasionadas principalmente por virus o bacterias del género *Vibrio* o al estrés. Entonces, es necesario cultivar organismos con un sistema inmune robusto que brinde resistencia a enfermedades (Ekasari *et al.*, 2014) que garantice la sobrevivencia y las ganancias esperadas por el acuicultor.

Estudios realizados señalan que los alimentos con adecuado contenido de proteína juegan un papel importante en los cultivos (Li y Xiang 2013 y Niu *et al.*, 2018). Para *P. vannamei* se han reportado formulaciones de alimentos con diferentes contenidos de proteína, adecuados para obtener mayor crecimiento. Se han propuesto diferentes porcentajes de proteína cruda (CP), de 15%, 25%, 30%, 35%, 42% y 41% (Aranyakananda y Lawrence, 1993; Teichert-Coddinton y Arrue 1988; Colvin y Brand 1977; Koshio *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 2010), sin embargo, es importante señalar que estos porcentajes se han sugerido para cultivos con diferentes condiciones ambientales y edades del camarón y en muchos casos el agua del cultivo contiene plancton. El fitoplancton es importante por ser la base de productividad primaria en el agua, sirviendo de alimento para otros microorganismos que a su vez son alimento vivo para el camarón, el cual es un complemento al alimento comercial. Este alimento

vivo tiene un efecto diverso en los procesos fisiológicos del camarón (Maldonado *et al.*, 2012), en la generación de biomasa (Kureshy y Allen, 2002) y en la actividad del sistema inmune (Pascual *et al.*, 2004). En sistemas de cultivo donde hay alimento vivo, se debe evaluar la cantidad de proteína suministrada (Ochieng 2014), con lo cual se pueden recomendar tasas de alimentación y también, evaluar la salud de los organismos cultivados a través de la respuesta del sistema inmune.

Además de las técnicas convencionales usadas para determinar la salud de los camarones, podemos describir la transcriptómica que nos permite medir la cantidad de transcritos (ARNm) de genes codificantes para moléculas relacionadas al sistema inmune. Por ejemplo, en camarones podemos conocer el efecto de la dieta en la activación del sistema inmune (Zhao *et al.*, 2012B y Wongsasak *et al.*, 2015). Los camarones poseen mecanismos de defensa para combatir bacterias, hongos o virus que causen daño al organismo, como son los mecanismos celulares (citotoxicidad, coagulación, encapsulamiento, fagocitosis, nodulación y melanización) y humorales (enzimas lisosomales, lectinas, peroxidasa, proteína de la coagulación, péptidos antimicrobianos y la producción de radicales libres del oxígeno y el nitrógeno). Todos estos pueden ser identificados a través de la actividad de moléculas que están relacionadas a estos mecanismos de defensa y que en muchos casos la expresión específica de éstas se relaciona a una buena condición nutricional.

Las proteínas juegan un papel importante en la alimentación del camarón, por ser la materia para la generación de estructuras y biomoléculas que afectan el crecimiento, supervivencia y salud.

Para el camarón blanco se ha recomendado una concentración de proteína en la dieta de 35 y 40 %, para obtener la mejor supervivencia y biomasa de los organismos cultivados, pero en algunos casos un alimento con el 40% de proteína ha provocado una saturación de compuestos nitrogenados en los sistemas de cultivo que afecta la calidad del agua y genera mayores desechos de compuestos nitrogenados, teniendo un impacto ambiental negativo (Velasco *et al.*, 1996). Además, una alta concentración de proteína incrementa los costos de la producción camaronícola (Liti *et al.*, 2005, Haslun *et al.*, 2012). El problema de saturación de los desechos nitrogenados es más



frecuente en cultivos con altas densidades, y en los últimos años para resolver este problema es recomendable cultivar con la Tecnología biofloc (BFT), con el fin de disminuir la concentración de compuestos tóxicos nitrogenados (Kumar *et al.*, 2015), para realizar menos recambios de agua (Haslun, 2012) y obtener mejor crecimiento (Xu y Pan *et al.*, 2014). El cultivo con la BFT permite la formación de flóculos que contienen diferentes microorganismos (Yanw-Fang, 2016; Emerenciano *et al.*, 2013; Hargreaves, 2013), los cuales aportan proteína al cultivo y tienen un efecto positivo en la calidad de agua y el crecimiento del camarón. Algunos cultivos con BFT reportados indican una aportación proteica y una disminución en el factor de conversión alimenticia (FCA) (Burford *et al.*, 2004), con beneficio para los productores acuícolas, al disminuir la cantidad de alimento comercial.

En muchos sistemas BFT se desconoce su calidad nutritiva y la diversidad de microorganismos que lo integran. Las microalgas son iniciadoras en la cadena trófica como alimento para generar una mayor diversidad de microorganismos ricos en proteína, así mismo, en los flóculos son importantes por el aporte de nutrientes (proteína y lípidos). En esta investigación se propuso un sistema hiperintensivo BFT inducido con microorganismos importantes para abastecer los nutrientes requeridos por el cultivo y utilizando un alimento comercial de baja concentración de proteína.

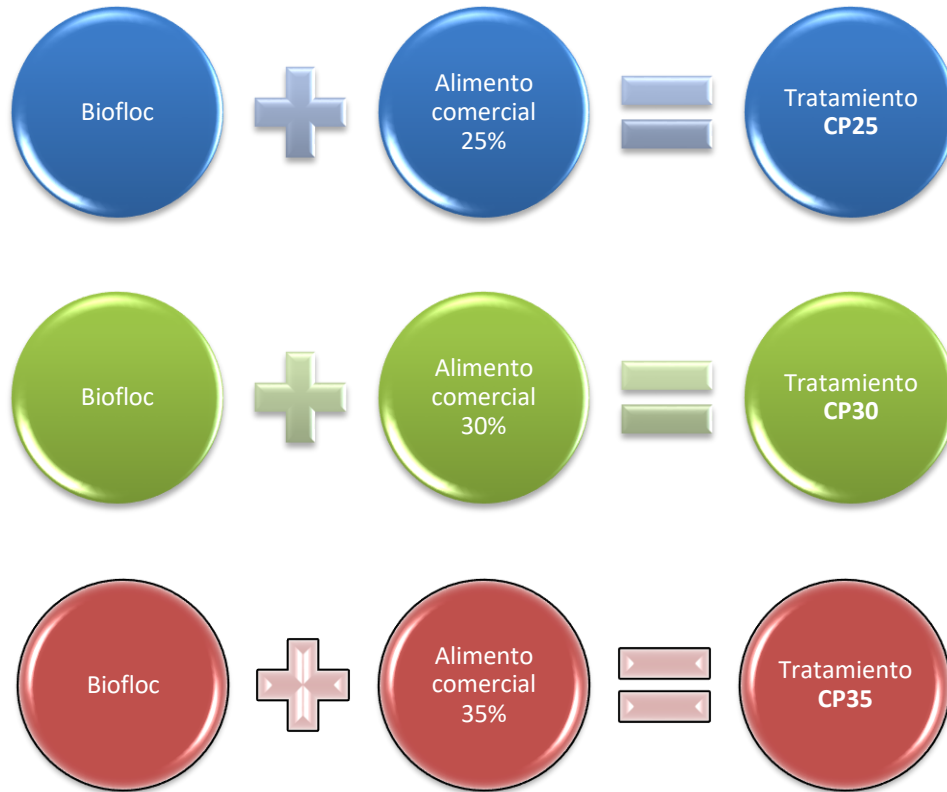
En este capítulo, se demuestra que, con un alimento comercial para camarón con baja concentración de proteína, y con un sistema BFT inducido, se obtiene un buen crecimiento de los camarones sanos e inmunológicamente estimulados.

## VII.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### VII.2.1. Material biológico y diseño experimental

Este experimento se llevó a cabo en la Unidad Pichilingue (UABCS). Se realizó la inducción de la formación de los flóculos, empleando la metodología descrita en el capítulo anterior correspondiente al biofloc **BFD1** por haber obtenido los mejores parámetros zootécnicos y calidad nutricional. Para estimular la floculación se empleó la melaza de caña a una concentración de 15 g/m<sup>3</sup> por día de acuerdo con Avnimelech (1999), medio F/2 (Guillard, 1975), inoculos de 400 L de microalgas marinas *Schizochytrium* sp., *Grammatophora* sp., y *Navicula* sp., a densidad inicial de **2 x10<sup>4</sup> cel./mL** y 20 L de la bacteria probiótica *Lactobacillus fermentum* TD19 a una densidad **3.5 x10<sup>3</sup> UFC/mL**.

Los camarones juveniles evaluados fueron obtenidos de un laboratorio comercial: Acuacultura Mahr, los cuales se mantuvieron inicialmente desde la fase PL15 en fase maternal por 25 días en **tanques con agua clara**, cuando alcanzaron un peso promedio de 0.8 ± 0.09 g, se usaron en el experimento. El experimento se llevó a cabo en tanques circulares de geomembrana con capacidad de 28 000 L, con altura de 1.5 m. Los juveniles de camarón fueron puestos a una densidad de 350 camarones/m<sup>3</sup> en los tanques experimentales con el biofloc maduro inducido con microalgas y probiótico. Los tres tratamientos, correspondieron a las dietas con proteína cruda (CP) de 25%, 30% y 35% (Figura 10). Donde se considera el tratamiento con CP35 como el grupo control por ser el alimento que se utiliza en esta etapa de la alimentación y como dietas experimentales CP25 y CP30.



**Figura 10.** Esquema del experimento. Tratamientos con alimentos conteniendo diferente porcentaje de CP: CP25, CP30 y CP35, donde CP35 fue el grupo control.

### VII.2.2. Administración del alimento

Los camarones de los tres tratamientos se alimentaron con las dietas comerciales Nutrimientos acuícolas Azteca®, Guadalajara, Jalisco, México, correspondientes a CP25, CP30 y CP35, por ocho semanas, tabla 4. Los alimentos se proporcionaron cada cuatro horas de acuerdo a una tasa inicial del 9% del peso corporal del camarón y reduciéndola gradualmente hasta finalizar el experimento con 4%, la tasa se estimó de acuerdo a las biometrías semanales.

**Tabla 4.** Composición nutrimental de los alimentos con las tres concentraciones de CP 25, 30 y 35 % empleados en los tratamientos durante las ocho semanas de experimentación.

Parámetro	Tratamientos		
	Alimento CP25%	Alimento CP30%	Alimento CP35%
Humedad (%)	10	10	10
Proteína Cruda (%)	25	30	35
Lípidos (%)	5	5	6
Ceniza (%)	10	10	10
Fibra cruda (%)	5	5	5
E.L.N (%)	45	40	34

### VII.2.2. Evaluación de los Parámetros fisicoquímicos del agua

La temperatura del agua, y oxígeno disuelto fueron monitoreados diariamente cada cuatro horas utilizando un equipo multiparámetros (YSI 55), se registró el pH con un potenciómetro (HANNA, Hi 98127) y la salinidad con un refractómetro manual (BTX – 1, VEE GEE) cada 24 horas. También fueron colectadas cada semana a las 9:00 am muestras de agua de 500 ml de cada tanque para obtener la concentración promedio de amonio, nitritos, nitratos, siguiendo la técnica del Kit comercial LYSA y utilizando el espectrofotómetro YSI®, Photometer Ecosense 9500®. Se realizaron recambios de agua del 5% cada 48 horas. El volumen de biofloc (BFV) se determinó semanalmente mediante el uso de conos Imhoff, sedimentando 1 L de agua del biofloc por 30 minutos (Avnimelech, 2009).

### **VII.2.3. Cuantificación de bacterias Ácido-Lácticas y de género *Vibrio***

Se tomaron muestras de agua del floc y de los intestinos de los camarones cada 15 días y se determinó por cuenta viable y diluciones decimales las unidades formadoras de colonia (UFC) por ml (UFC mL<sup>-1</sup>) de bacterias ácido-lácticas en Agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS; DIFCO, EE. UU.) y de *Vibrio* spp., en agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS; DIFCO, EE. UU.).

### **VII.2.5. Evaluación de parámetros de crecimiento**

Se hicieron biometrías semanales para estimar el peso promedio inicial del camarón (g), peso final (g), peso ganado (g/semana), tasa de crecimiento específico (%/días), eficiencia proteica, tasa de conversión alimenticia (%), supervivencia (%), tasa de crecimiento semanal, porcentaje del peso ganado (%), peso ganado por día y desempeño del cultivo (TCA) (Zhao *et al.*, 2012).

### **VII.2.4. Determinación de la expresión de genes relacionados con el sistema inmune**

#### **VII.2.4.1. Toma de muestras de diferentes tejidos de camarón blanco (*P. vannamei*)**

Al finalizar el experimento, diez camarones de cada tratamiento, CP25, CP30 y CP35 fueron tomados al azar y se extrajo su hepatopáncreas, las muestras fueron puestas en RNAlater y guardadas a -80 °C en el Laboratorio de Ciencia y tecnología de alimentos de la UABCS.

#### **VII.2.4.2. Extracción de RNA total por el método de Trizol**

La extracción de RNA se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología comparada y Genómica funcional del CIBNOR, por el método de Trizol, de la siguiente manera:

##### **1.- Homogenización**

Se retiró el buffer de almacenamiento (RNAlater) y se pesó de 0.05 g a 0.06 g de hepatopáncreas de cada muestra guardada, se pusieron en tubos de 1.5 mL, se les

agregaron las perlas de vidrio de 425-600  $\mu\text{m}$ , (previamente esterilizadas). Se agregó 1ml de Trizol por 50-100 mg de tejido (10 vol de Trizol /vol de muestra) a temperatura ambiente para realizar la ruptura celular en el equipo Fast Prep-24, (MP Biomedicals) a una velocidad de 4 m/s por 30 s.

## 2.- Fase de separación

Se Incubo el homogeneizado 5 minutos a temperatura ambiente, se agregó cloroformo, (0.2 ml/ml de Trizol). Se agitó manualmente durante 15 segundos e Incubó por 2 minutos a temperatura ambiente, para después centrifugar 12000 g por 15 min y 4°C, recuperando la fase superior (acuosa) cuidando de no contaminar con la fase intermedia (proteica y debris celular) o inferior (fenol y ADN).

## 3.- Precipitación del RNA

Se transfirió la fase acuosa en un tubo limpio, precipitando el RNA con alcohol isopropílico (0.5 ml/ml de Trizol), se incubó 10 minutos a temperatura ambiental y agitó manualmente para después centrifugar a 12000 g, 10 min a 4°C y obtener un RNA precipitado que podía verse algunas veces en el fondo de forma translúcida.

## 4.- Lavado del RNA

Se eliminó el sobrenadante y se lavó el RNA sedimentado con alcohol al 75% con agua DEPC (1 ml/ml de Trizol), se agitó en vortex, a la mitad de su intensidad máxima y centrifugó a 7500 g por 5 min a 4°C.

## 5.- Resuspensión

Después del lavado, se secó el tubo en la campana de extracción por 5 minutos, se tuvo cuidado de no secar completamente ya que el RNA se adhiere a los plásticos. Se resuspendió el RNA con 40  $\mu\text{l}$  de agua DEPC, para después calentar 10 min a 55-60°. Las muestras después fueron cuantificadas y verificadas de su pureza.

#### **VII.2.4.3. Cuantificación y verificación de calidad en RNA total**

El RNA resuspendido se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific™) y se evaluó la calidad por electroforesis en gel. Se mezclaron 2 µL de cada muestra de ARN ó 3 µL si fue muy baja la concentración, con un 1 µL de buffer de carga (50% glicerol, 0.1 M EDTA pH 8.0, 0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilencianol), posteriormente las muestras se inyectaron en los pozos de un gel de agarosa al 1.5 % con TAE (Tris, Ácido acético, EDTA) desnaturalizante con tiocianato de guanidina (0.06 gramos/100ml), preteñido con 1 µL de bromuro de Etidio (10mg/mL). La electroforesis se llevó a cabo durante 30 min, la imagen fue registrada en un sistema de foto documentación (GelDoc XR de BioRad).

Una vez cuantificada y verificada la pureza del RNA, se procedió a generar alícuotas. Se usaron para tratarlas con DNAsa y proceder a la obtención de cDNA. Otras alícuotas de 20-30 µl de las muestras se precipitaron con: 0.1 vol. de acetato de potasio (**2M pH 5**), 2 vol. de etanol y fueron congeladas a -80° C. para ser almacenadas.

#### **VII.2.4.4. Síntesis de cDNA**

Para la síntesis del cDNA se realizó la metodología ya estandarizada con las temperaturas óptimas sugeridas de acuerdo con el protocolo de Promega, en el Laboratorio de Fisiología comparada y Genómica funcional. Se llevó a cabo con la enzima transcriptasa reversa ImProm II (Promega) cat #A3802. Se mezcló 5 µL de RNA total con 1 µL de **oligo (dt)15 primer**, dejando incubar a 70 °C 10 min, al finalizar se dejó en hielo, mientras se incubó el RNA, se preparó la mezcla maestra (1X) con: Agua DEPC 5.3 µL, 5X Buffer para ImProm II 4.0 µL, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 2.4 µL, 10 mM dNTP's 1.0 µL, RNAsin 0.5 µL (inhibidor de RNAsas), enzima ImProm II 0.8 µL, obteniendo un total de 14 µL de la mezcla maestra por cada tubo, los cuales ya contenían el RNA + Oligo (dt)15 primer (Total 20 µL). Se incubó a temperatura ambiente 10 minutos, después a 45 °C por 60 minutos y a 90 °C por 5 minutos para después poner en hielo, se centrifugó rápidamente y se almacenó a -20 °C para después realizar la determinación de la expresión genética relacionada con el sistema inmune por medio de la qPCR tiempo real.

**VII.2.4.5. Determinación de expresión génica por qPCR**

Obtenidos los cDNAs se realizó la determinación de la expresión de los siguientes genes relacionados con el sistema inmune: Profenoloxidasa (*PROpo*), Superóxido dismutasa (*SOD*), Peneidina 2 (*PEN*) y Glutación peroxidasa (*GPO*), utilizando como gen de referencia al gen del Factor de elongación (*EF1 $\alpha$* ), éste fue evaluado en estudios previos donde se verifico que es estable y expresado al mismo nivel en diferentes muestras y condiciones experimentales, en nuestro caso, *EF1 $\alpha$*  mostro estabilidad al expresarse en cada muestra con una eficiencia cercana al 100%. Los oligonucleótidos utilizados para la qPCR se muestran en la Tabla 5. La qPCR se llevó a cabo en el equipo CFX96 Touch Real Time PCR detection system, BioRad y el software CFX manager (V3.0).

**Tabla 5.** Secuencias de primers utilizados.

<b>Primers</b>	<b>Secuencia 5' - 3'</b>
<b>Factor de elongación (<i>EF1<math>\alpha</math></i>)</b>	F 5'TCGCCGA <sup>ACTGCAGACCATGA</sup> 3'
	R 5'GCTGCCTCCTCCAGTTTACC3'
<b>Profenoloxidasa (<i>PROpo</i>)</b>	F 5'CTTGAGAACGCCAACATCGATC3'
	R TGAAGAAGAGCTGGAAAGGCAT
<b>Superóxido dismutasa (<i>SOD</i>)</b>	F 5'ATTGGGTGAGGAACGAGGTG3'
	R 5'CTCCGCCTCAACCAACTTCT3'
<b>Peneidina2 (<i>PEN2</i>)</b>	F 5'GGTCTGCCTGGTCTTCTTGG3'
	R 5'CAATTGCGAGCATCTGAGACG3'
<b>Glutación peroxidasa (<i>GPO</i>)</b>	F 5'GTCAACGGGTCAACAGCTGA5'
	R 5'TCTTAAACGGCTGCCCATCC3'

Todos los primers fueron diseñados para 60°C de alineación.



Previamente a la cuantificación para cada gen, los cDNA obtenidos de cada muestras fueron utilizados para hacer 3 pool por tratamiento, (1 pool contiene 3 muestras con volumen de 30  $\mu$ L) obteniendo 9 pools, de los cuales de cada uno se tomo 10  $\mu$ L, obteniendo un total de 90  $\mu$ L, a los cuales se les agrego 120  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O destilada esteril y se procedio a realizar diluciones: 1/4, 1/16, 1/64 y 1/256, para generar una curva estándar por gen y obtener por un lado, la eficiencia de la amplificación y por otro lado, el rango dinámico de detección de cada gen para finalmente, elegir la dilución de reacción adecuada en cada reacción de qPCR.

Para realizar esta curva estándar se realizo la reacción con 5  $\mu$ L de Sybr, 0.125  $\mu$ L de F, 0.125  $\mu$ L R de cada primers de los oligonucleótidos indicados para cada gen (Tabla 5), 1.75 de H<sub>2</sub>O destilada esteril y 3  $\mu$ L de las diluciones realizadas. Finalmente 10  $\mu$ L fueron puestos en cada pozo de la placa por triplicado y el control negativo (NTC) con H<sub>2</sub>O destilada esteril; el acomodo de las muestras con sus replicas y controles fueron colocadas en el termociclador como se indican en la Tabla 6 A. El programa de amplificación fue el siguiente; 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, mas 40 ciclos, después 5 segundos a 65°C y finalmente 5 segundos a 95°C. Obtenidas las curvas (anexo 2, 3 y 4) se selecciono la concentración final de 1/16 para la cuantificación de expresión génica.

Obtenidas las curvas de amplificación y verificando su eficiencia de amplificación, la concentración adecuada de 1/16 fue la seleccionada y se procedio a la cuantificación para cada gen en cada tratamiento. Se tomaron tres pools de cada tratamiento (total 9 pools) y se prepararon las diluciones 1/16. A un tubo para PCR se le adiciono 3  $\mu$ L del cDNA de un pool dilución 1/6 y 7  $\mu$ L de la mezcla de PCR previamente preparada, la cuantificación se hizo por cuádruplicado, incluyendo un grupo control negativo NTC (contenía en cada tubo 3  $\mu$ L de agua destilada en lugar del cDNA) y también se realizo con los primers del gen de referencia este proceso. Se colocaron 10  $\mu$ L en cada pocillo en las placas como se muestra en las Tabla 6B, C y D. El programa de amplificación fue el siguiente; la desnaturalización inicial 30 segundos a 95°C, alineamiento de 30 segundos a 60°C, mas 40 ciclos, después la extensión de 5 segundos a 65°C y finalmente 5 segundos a 95°C (ver imagen en anexo 5). La

expresión fue normalizada usando el gen de Ef1 como referencia. Se empleó el algoritmo  $\Delta\Delta Cq$  para conocer la expresión relativa al control, considerando la expresión cuantitativa de los genes mencionados en los cDNA de los camarones del tratamiento CP35 como grupo control.

**Tabla 6A.** Acomodo de las muestras con sus replicas y controles en la placa de 96 pozos para llevarla al termociclador y determinar la eficiencia de la reacción, con las diferentes concentraciones.

NTC F1	NTC F1	NTC F1	¼ F1	¼ F1	¼ F1	1/16F1	1/16F1	1/16F1	1/64F1	1/64F1	1/64F1
1/256 F1	1/256 F1	1/256 F1	NTC PEN	NTC PEN	NTC PEN	¼ PEN	¼ PEN	¼ PEN	1/16 PEN	1/16 PEN	1/16 PEN
1/64 PEN	1/64 PEN	1/64 PEN	1/256 PEN	1/256 PEN	1/256 PEN	NTC PROpo	NTC PROpo	NTC PROpo	¼ PROpo	¼ PROpo	¼ PROpo
1/16 PROpo	1/16 PROpo	1/16 PROpo	1/64 PROpo	1/64 PROpo	1/64 PROpo	1/256 PROpo	1/256 PROpo	1/256 PROpo	NTC SOD	NTC SOD	NTC SOD
¼ SOD	¼ SOD	¼ SOD	1/16 SOD	1/16 SOD	1/16 SOD	1/64 SOD	1/64 SOD	1/64 SOD	1/256 SOD	1/256 SOD	1/256 SOD
NTC GPO	NTC GPO	NTC GPO	¼ GPO	¼ GPO	¼ GPO	1/16 GPO	1/16 GPO	1/16 GPO	1/64 GPO	1/64 GPO	1/64 GPO
1/256 GPO	1/256 GPO	1/256 GPO									

NTC = Control negativo, ¼, 1/16, 1/64, 1/256 =dilución de concentraciones. Profenoloxidasas (*PROpo*), Superóxido dismutasa (*SOD*), Peneidina 2 (*PEN*) y Glutación peroxidasa (*GPO*), gen de referencia al gen del Factor de elongación (*EF1 $\alpha$* ).

**Tabla 6B.** Acomodo de las muestras con sus replicas y controles en la placa de 96 pozos para llevarla al termociclador y determinar la concentración.

<i>NTC FI</i>	<i>NTC FI</i>	<i>NTC FI</i>	<i>NTC FI</i>	<i>1 FI</i>	<i>1 FI</i>	<i>1 FI</i>	<i>1 FI</i>	<i>2 FI</i>	<i>2 FI</i>	<i>2 FI</i>	<i>2 FI</i>
<i>3 FI</i>	<i>3 FI</i>	<i>3 FI</i>	<i>3 FI</i>	<i>4 FI</i>	<i>4 FI</i>	<i>4 FI</i>	<i>4 FI</i>	<i>5 FI</i>	<i>5 FI</i>	<i>5 FI</i>	<i>5 FI</i>
<i>6 FI</i>	<i>6 FI</i>	<i>6 FI</i>	<i>6 FI</i>	<i>7 FI</i>	<i>7 FI</i>	<i>7 FI</i>	<i>7 FI</i>	<i>8 FI</i>	<i>8 FI</i>	<i>8 FI</i>	<i>8 FI</i>
<i>9 FI</i>	<i>9 FI</i>	<i>9 FI</i>	<i>9 FI</i>								
								<i>NTC PEN</i>	<i>NTC PEN</i>	<i>NTC PEN</i>	<i>NTC PEN</i>
<i>1 PEN</i>	<i>1 PEN</i>	<i>1 PEN</i>	<i>1 PEN</i>	<i>2 PEN</i>	<i>2 PEN</i>	<i>2 PEN</i>	<i>2 PEN</i>	<i>3 PEN</i>	<i>3 PEN</i>	<i>3 PEN</i>	<i>3 PEN</i>
<i>4 PEN</i>	<i>4 PEN</i>	<i>4 PEN</i>	<i>4 PEN</i>	<i>5 PEN</i>	<i>5 PEN</i>	<i>5 PEN</i>	<i>5 PEN</i>	<i>6 PEN</i>	<i>6 PEN</i>	<i>6 PEN</i>	<i>6 PEN</i>
<i>7 PEN</i>	<i>7 PEN</i>	<i>7 PEN</i>	<i>7 PEN</i>	<i>8 PEN</i>	<i>8 PEN</i>	<i>8 PEN</i>	<i>8 PEN</i>	<i>8 PEN</i>	<i>9 PEN</i>	<i>9 PEN</i>	<i>9 PEN</i>

NTC = muestras control negativo. Tratamiento CP25= 1,2 y 3. Tratamiento CP30 = 4,5 y 6. Tratamiento CP35= 6,7 y 8. FI= gen de referencia al gen del Factor de elongación (*EF1 $\alpha$* ). PEN= Peneidina 2.

**Tabla 6C.** Acomodo de las muestras con sus replicas y controles en la placa de 96 pozos para llevarla al termociclador y determinar la concentración.

NTC GPO	NTC GPO	NTC GPO	NTC GPO	1 GPO	1 GPO	1 GPO	1 GPO	2 GPO	2 GPO	2 GPO	2 GPO
3 GPO	3 GPO	3 GPO	3 GPO	4 GPO	4 GPO	4 GPO	4 GPO	5 GPO	5 GPO	5 GPO	5 GPO
6 GPO	6 GPO	6 GPO	6 GPO	7 GPO	7 GPO	7 GPO	7 GPO	8 GPO	8 GPO	8 GPO	8 GPO
9 GPO	9 GPO	9 GPO	9 GPO								
								NTC PROpo	NTC PROpo	NTC PROpo	NTC PROpo
1PROpo	1PROpo	1PROpo	1PROpo	2PROpo	2PROpo	2PROpo	2PROpo	3 PROpo	3 PROpo	3 PROpo	3 PROpo
4 PROpo	4 PROpo	4 PROpo	4 PROpo	5 PROpo	5 PROpo	5 PROpo	5 PROpo	6 PROpo	6 PROpo	6 PROpo	6 PROpo
7 PROpo	7 PROpo	7 PROpo	7 PROpo	8 PROpo	8 PROpo	8 PROpo	8 PROpo	9 PROpo	9 PROpo	9 PROpo	9 PROpo

NTC = muestras control negativo. Tratamiento CP25= 1, 2 y 3. Tratamiento CP30 = 4,5 y 6. Tratamiento CP35= 6,7 y 8. GPO= Glutación peroxidasa, PROpo = Profenoloxidasa. HOMOGENEIZAR EL ESTILO

**Tabla 6D.** Acomodo de las muestras con sus replicas y controles en la placa de 96 pozos para llevarla al termociclador y determinar la concentración.

								NTCSOD	NTC SOD	NTC SOD	NTC SOD
1 SOD	1 SOD	1 SOD	1 SOD	2 SOD	2 SOD	2 SOD	2 SOD	3 SOD	3 SOD	3 SOD	3 SOD
4 SOD	4 SOD	4 SOD	4 SOD	5 SOD	5 SOD	5 SOD	5 SOD	6 SOD	6 SOD	6 SOD	6 SOD
7 SOD	7 SOD	7 SOD	7 SOD	8 SOD	8 SOD	8 SOD	8 SOD	8 SOD	9 SOD	9 SOD	9 SOD

NTC = muestras control negativo. Tratamiento CP25= 1,2 y 3. Tratamiento CP30 = 4,5 y 6. Tratamiento CP35= 6,7 y 8. SOD= Superóxido dismutasa.

### VII.2.6. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos en el experimento y en el análisis de la expresión cuantitativa de los genes relacionados con el sistema inmune de los camarones, fueron analizados con prueba *a priori* (homocedasticidad y normalidad por medio de la prueba Barlett's y Kolmogorov- Smirnov). Se compararon los pesos, supervivencia por tratamientos con un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y una prueba de Tukey. Los resultados de la expresión diferencial de los genes *GPO* (a), *PEN* (b), *SOD* (c) y *PROpo* se ajustaron a un modelo lineal simple para determinar la correlación de la expresión de estos genes con la concentración de proteína en los alimentos

### VII.3. RESULTADOS

#### VII.3.1. Parámetros fisicoquímicos de la calidad del agua

Los valores obtenidos de los parámetros fisicoquímicos se mantuvieron de acuerdo con los requerimientos establecidos para el cultivo del camarón en los tres tratamientos, como se muestra en la tabla 7. La temperatura y el oxígeno disuelto no mostró diferencia significativa ( $p>0.5$ ), los tres tratamientos mantuvieron valores dentro del rango del nivel óptimo. La salinidad tuvo un promedio  $37.19 \pm 0.9$  ‰ y el pH se mantuvo estable durante todo el experimento con valores de  $7.8 \pm 0.17$  en los tres tratamientos.

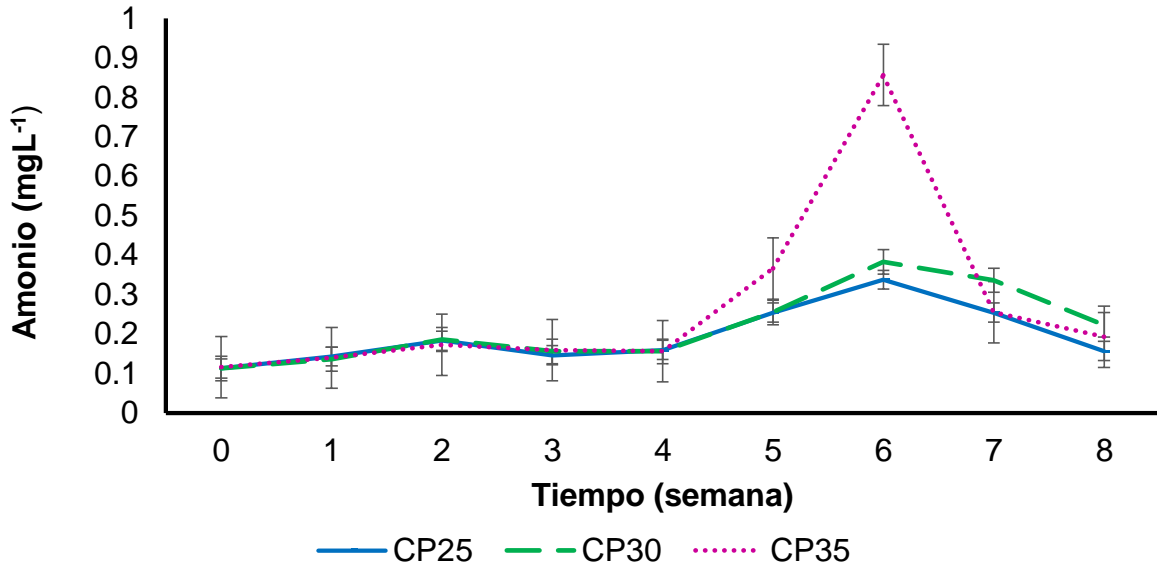
La concentración de amonio, nitritos y nitratos, durante los 30 primeros días de experimentación fueron semejantes, pero en la semana 6 se registró una diferencia significativa entre los tratamientos. Sin embargo, estos parámetros se mantuvieron dentro del nivel óptimo como se muestra en la tabla 7. Durante las cuatro primeras semanas de experimentación el amonio se mantuvo en concentraciones menores de  $0.20 \text{ mg L}^{-1}$  en los tres tratamientos, un incremento de  $0.86 \text{ mg L}^{-1}$  se registró en la semana 6 en el CP35, mientras que el CP25 y CP30 se mantuvieron en  $0.20 \text{ mg L}^{-1}$  (ver Figura 11). Al finalizar el experimento las concentraciones de amonio fueron de  $0.15$ ,  $0.22$  y  $0.19 \text{ mg L}^{-1}$  en los tratamientos CP25, CP30 y CP35 respectivamente.

La concentración de nitritos mostró durante las cinco primeras semanas de experimentación un comportamiento similar, manteniendo valores menores a  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$ . En la semana seis se registró una diferencia significativa para el tratamiento de CP35 con respecto al CP25 y CP30. ( $p<0.05$ . Ver Figura 12). La concentración de nitratos se mantuvo con los mayores valores para el tratamiento CP35 siendo significativamente diferente en la semana tres, mientras que los tratamientos CP25 y CP30 fueron similares durante el experimento. En la semana seis los tres tratamientos fueron similares en la concentración de nitratos, mientras que en la semana siete la concentración de nitratos disminuyó a  $8.3 \text{ mg L}^{-1}$  para el CP35, (ver Figura 13).

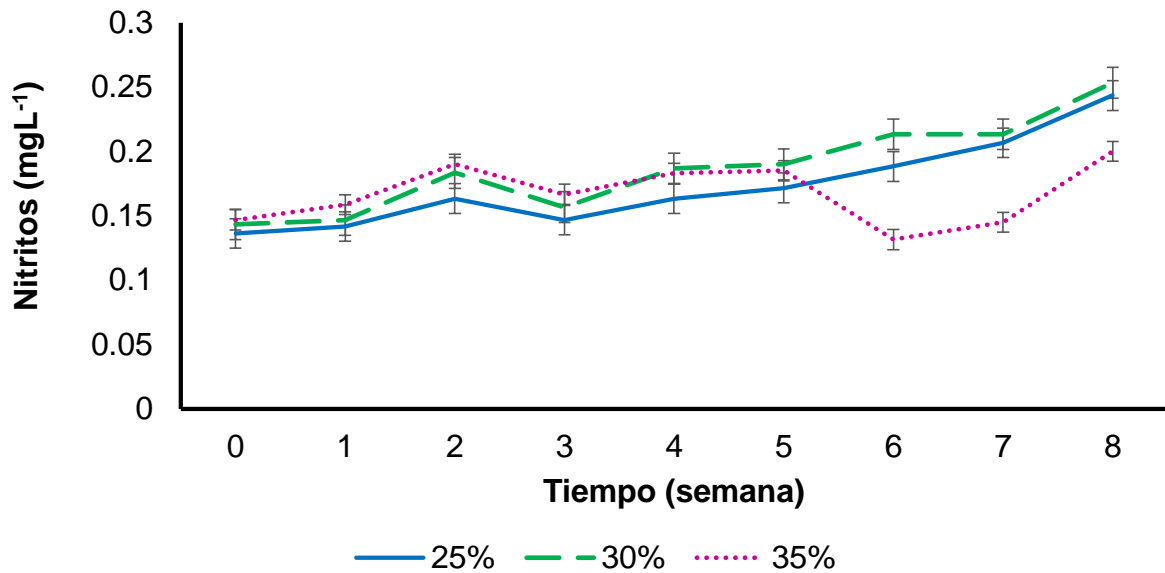
**Tabla 7.** Valores promedios  $\pm$  SD, mínimo y máximo obtenidos de los parámetros fisicoquímicos de la calidad del agua de un cultivo de *P. vannamei* durante el periodo experimental de 8 semanas en los tres tratamientos con diferentes concentraciones de proteína (CP), 25%, 30% y 35% en la dieta.

Parámetros	Tratamientos			Nivel óptimo*
	CP25	CP30	CP35	
Oxígeno Disuelto ( $\text{mg L}^{-1}$ )	6.58 $\pm$ .023	6.35 $\pm$ .021	6.45 $\pm$ .021	4.0 -10.0
Temperatura( $^{\circ}\text{C}$ )	28.19 $\pm$ .9	27.96 $\pm$ .9	28.06 $\pm$ .9	23 – 30
Salinidad( $\text{‰}$ )	37.19 $\pm$ .9	37.19 $\pm$ .9	37.19 $\pm$ .9	15 -35
Ph	7.80 $\pm$ 0.27	7.80 $\pm$ 0.27	7.80 $\pm$ 0.27	8.1-9
Amonio ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0.19 $\pm$ 0.07	0.21 $\pm$ 0.08	0.27 $\pm$ 0.22	0.1 – 1.0
Nitritos ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0.17 $\pm$ 0.03	0.19 $\pm$ 0.04	0.17 $\pm$ 0.02	<0.5
Nitratos ( $\text{mg L}^{-1}$ )	6.39 $\pm$ 5.38	6.92 $\pm$ 5.78	6.76 $\pm$ 3.15	0.4 – 0.8

PSU, Unidades prácticas de salinidad, \*Brock y Main 1994

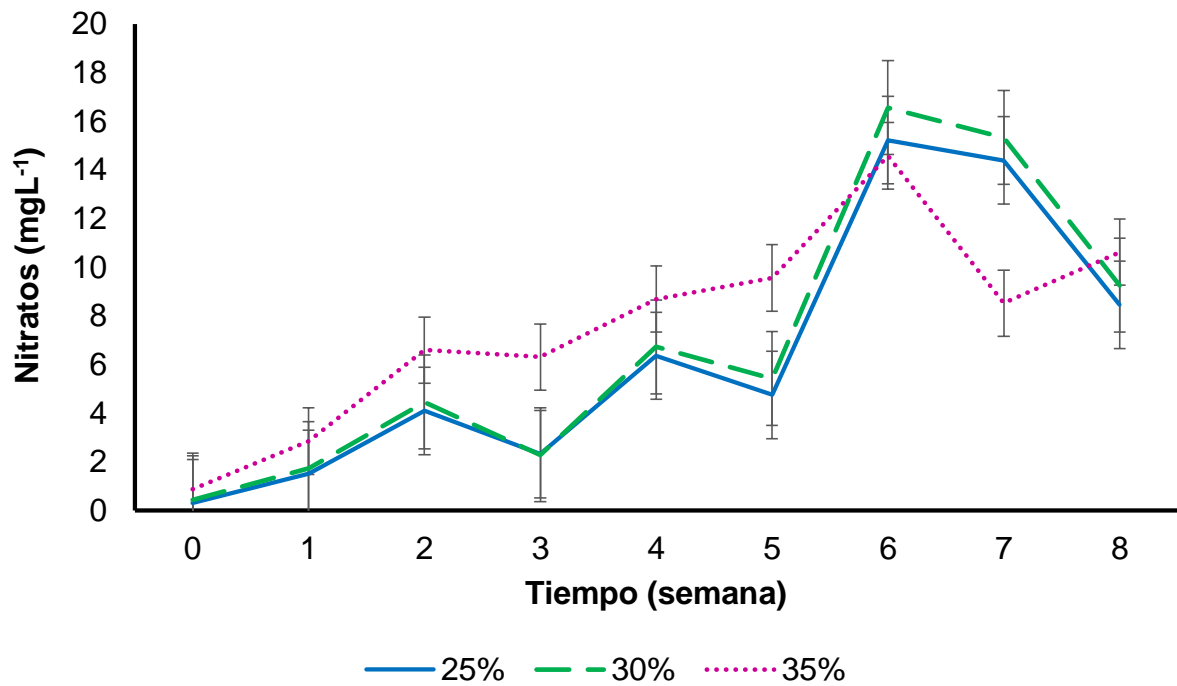


**Figura 11.** Concentración de amonio en el biofloc de tres cultivos de *P. vannamei*, alimentados con las dietas CP25, CP30 y CP35, durante 60 días de cultivo. Los valores son presentados como medias  $\pm$  desviación estándar (SD).



**Figura 12.** Concentración de Nitritos en el biofloc de tres cultivos de *P. vannamei*, alimentados con las dietas CP25, CP30 y CP35, durante 60 días de cultivo. Los valores son presentados como medias  $\pm$  desviación estándar (SD).

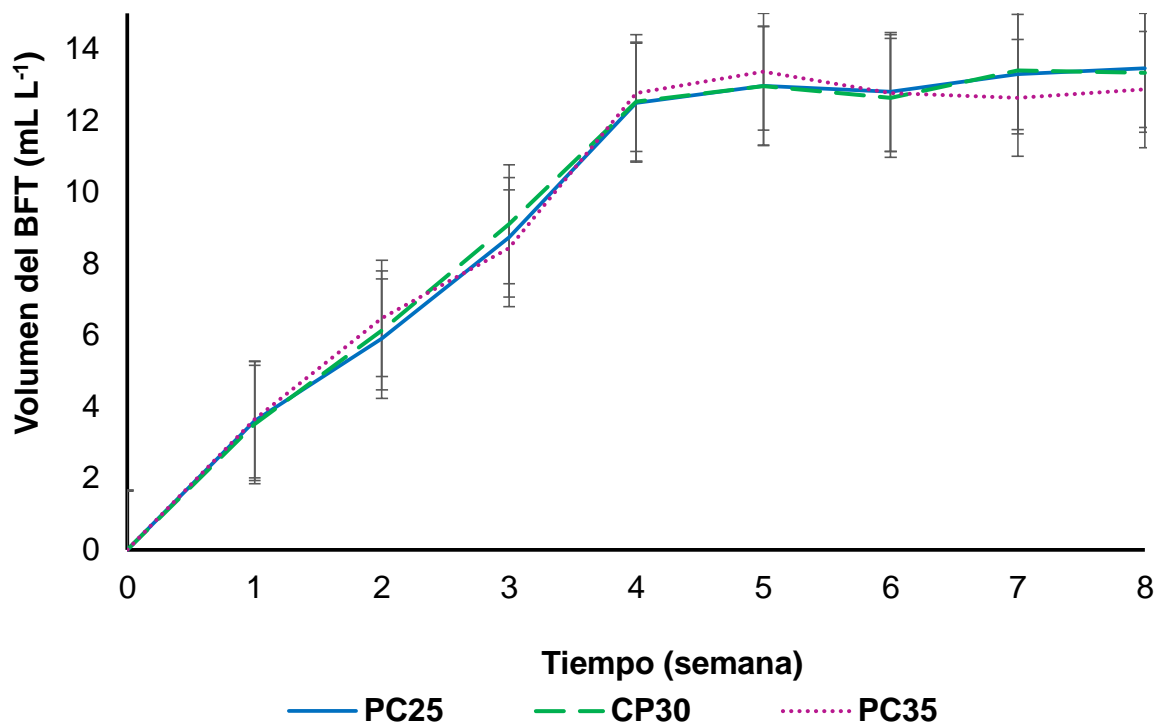




**Figura 13.** Concentración de nitratos en el biofloc de tres cultivos de *P. vannamei*, alimentados con las dietas CP25, CP30 y CP35, durante 60 días de cultivo. Los valores son presentados como medias  $\pm$  desviación estándar (SD).

### VII.3.2. Volumen del Floc

El volumen del Biofloc en los tres tratamientos, se incrementó durante los treinta primeros días de experimentación, después se mantuvo similar hasta finalizar el experimento, Figura 14. Los volúmenes de bioflocs medidos en promedio fueron: 10.40, 10.40 y 10.36 mL L<sup>-1</sup> para los tratamientos CP25, CP30 y CP35 respectivamente.

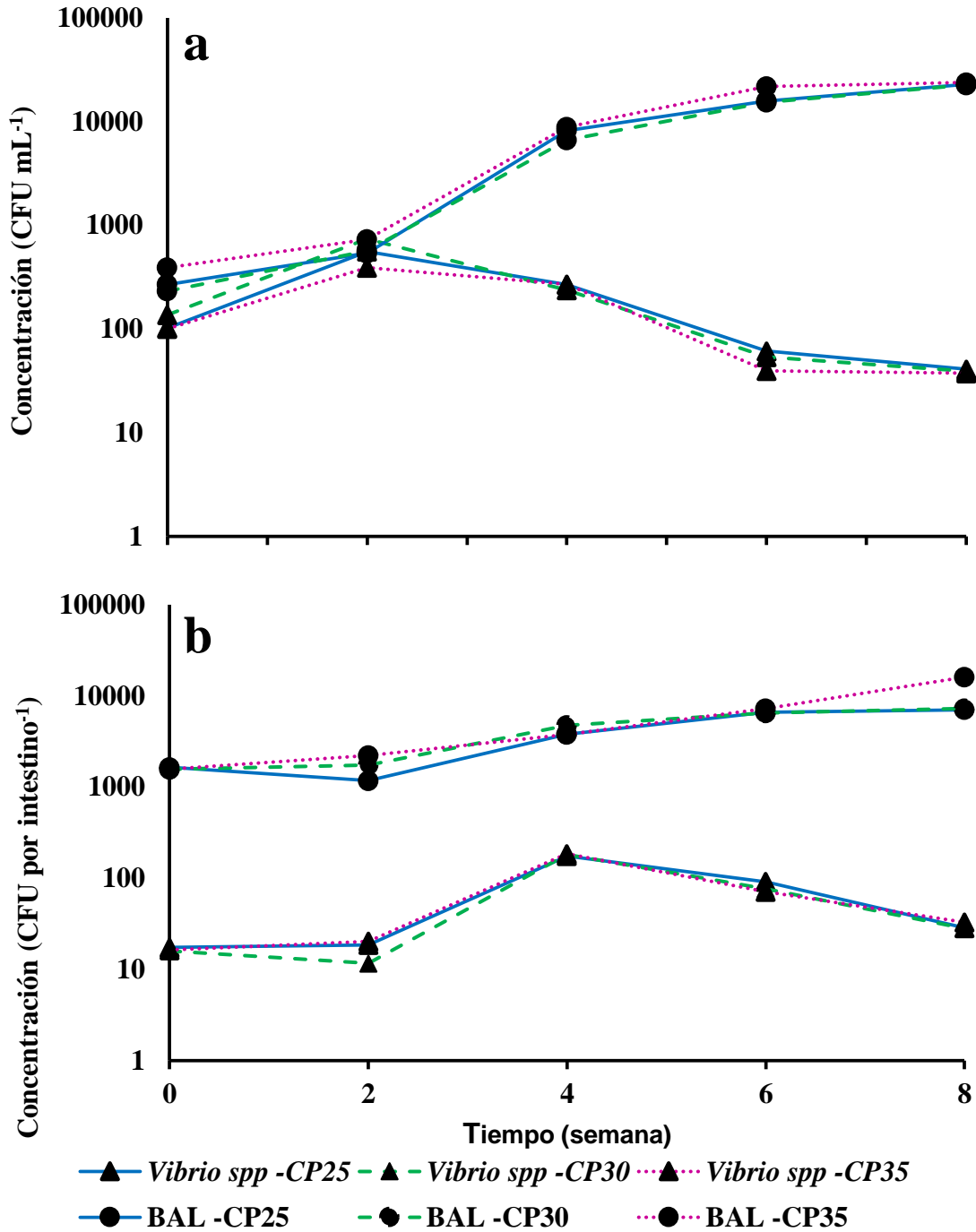


**Figura 14.** Volúmenes de biofloc de los tres cultivos de *P. vannamei*, alimentados con las dietas, CP25, CP30 y CP35, durante 60 días de cultivo. Los valores son presentados como medias  $\pm$  desviación estándar (SD).

### VII.3.3. Bacterias Ácido-Lácticas (BAL) y del género *Vibrio*

Las BAL y *Vibrio* spp., fueron cuantificadas cada quince días por cuenta viable y los resultados son mostrados como UFC por mL<sup>-1</sup> de biofloc del tanque de cultivo y como UFC por intestino de camarón en cultivo. Las BAL se cuantificaron tomando en cuenta que la bacteria probiótica que se usó para inducir el biofloc fue *L. fermentum* TD19, la cual es una BAL. Los resultados mostraron en agua inicialmente  $2.80 \times 10^2$  UFC por mL<sup>-1</sup>, esta concentración se incrementó al finalizar el experimento alcanzando cuentas de  $2.28$ ,  $2.26$  y  $2.39 \times 10^4$  UFC por mL<sup>-1</sup> en los tratamientos CP25, CP30 y CP35 respectivamente. Las cuentas viables de *Vibrio* spp., en el biofloc, fueron altas en la semana dos con  $5.62$ ,  $7.41$  y  $3.92 \times 10^3$  UFC por mL<sup>-1</sup> en CP25, CP30 y CP35 respectivamente, sin embargo al finalizar el experimento las cuentas disminuyeron a  $4.10$ ,  $3.90$  y  $3.80 \times 10^1$  UFC por mL<sup>-1</sup> en CP25, CP30 y CP35 respectivamente (Figura 15a).

En el intestino, la cuenta viable inicial de BAL fue de  $1.65$ ,  $1.56$  y  $1.57 \times 10^3$  UFC por intestino<sup>-1</sup>, y se fue incrementando ligeramente obteniendo al finalizar el experimento  $6.92 \times 10^3$ ,  $2.43 \times 10^4$  y  $7.78 \times 10^3$  UFC por intestino<sup>-1</sup>, en los tratamientos CP25, CP30 y CP35 respectivamente. Mientras que la concentración de *Vibrio* spp., alcanzó los mayores valores en la semana cuatro con  $1.76$ ,  $1.82$  y  $1.86 \times 10^2$  por intestino<sup>-1</sup> en CP25, CP30 y CP35 respectivamente, sin embargo, disminuyeron al finalizar el experimento (Figura 15b).

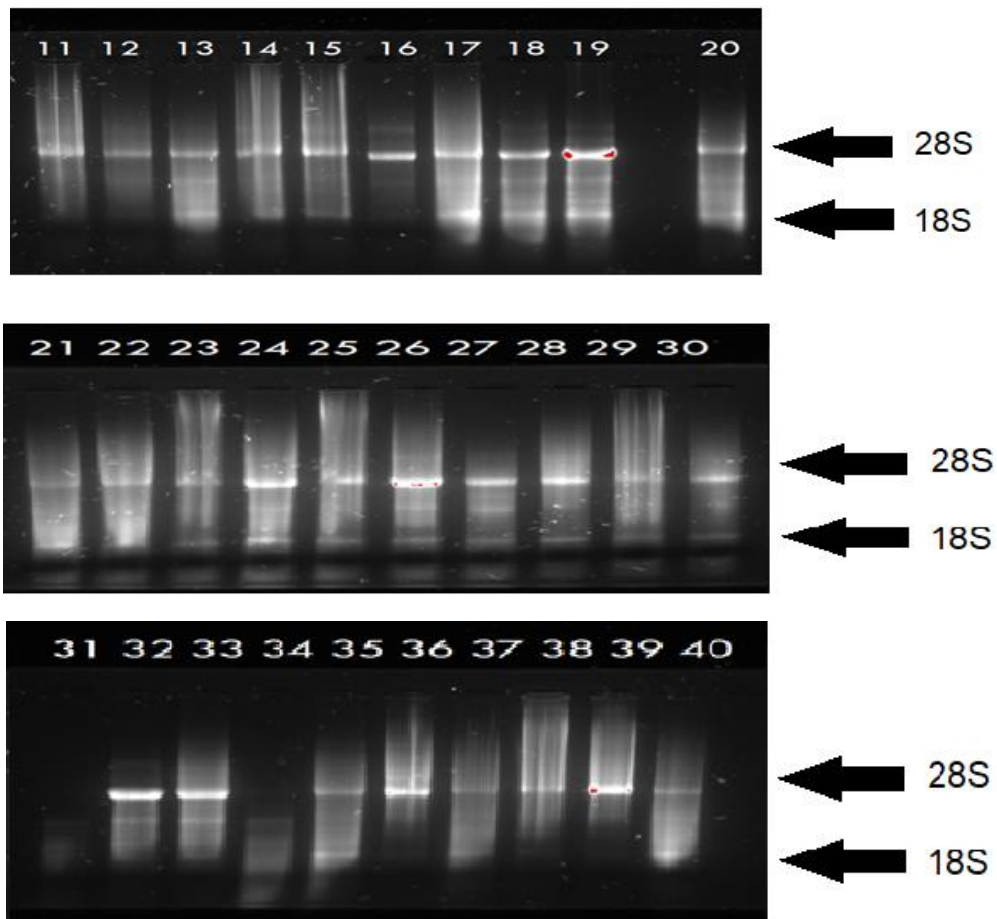


**Figura 15.** Cuenta viable de BAL y *Vibrio* spp., en agua de biofloc (a) y en intestino de camarón (b), de tres cultivos de *P. Vannamei* en biofloc alimentados con dietas que contienen proteína 25% (CP25), 30% (CP30) y 35% (CP35), durante ocho semanas de cultivo. Los valores son presentados como medias  $\pm$  desviación estándar (SD).

### VII.3.4. Expresión de genes relacionados con el sistema inmune del camarón

#### VII.3. 4.1. Concentración y calidad de la extracción de ARN total

De las 30 muestras de hepatopancreas de los camarones de donde se hizo la extracción de ARN (10/tratamiento), se obtuvieron las concentraciones necesarias para realizar el análisis de expresión génica diferencial (Tabla 8), también se muestra la calidad de los RNA extraídos, en el gel de agarosa que se corrió por electroforesis para los tres tratamientos (Figura 16). En los geles se pueden apreciar las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales de 28 y 18S, lo que indica una calidad aceptable de las muestras de ARN, sin degradación.



**Figura 16.** Electroforesis en gel de agarosa (1.5 %) que muestra las bandas de ARN total de los tres tratamientos, CP25 (muestras 11-20), tratamiento CP30 (muestras 21-30) y tratamiento CP35 (muestras de 31 al 40).

**Tabla 8.** Concentraciones del ARN extraído de hepatopancreas de camarones de los tres tratamientos experimentales (CP) 25%, (muestras 11-20), 30% (muestras 21- 30) y 35% (muestras 31-40).

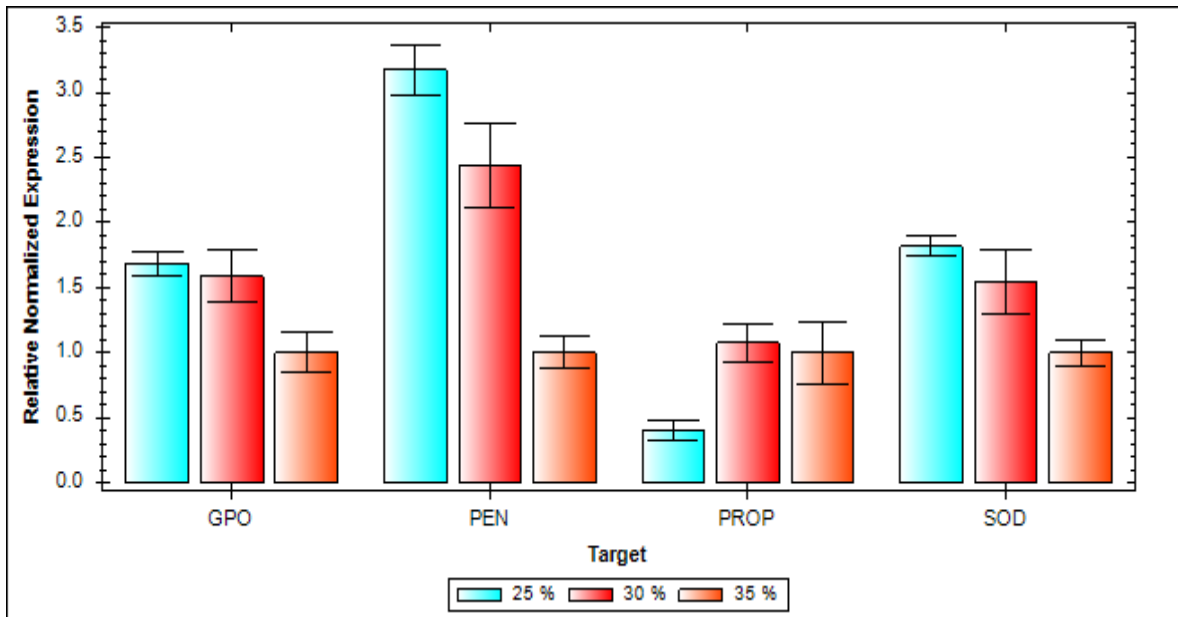
Tratamiento	Muestra	Concentración de ARN (ng/ $\mu$ L)	260/280
CP25	11	4641	2.03
CP25	12	7594	2.04
CP25	13	5012	1.98
CP25	14	12235	2.01
CP25	15	641	2.03
CP25	16	4041	2.02
CP25	17	3557	2.05
CP25	18	3106	2.05
CP25	19	4030	2.03
CP25	20	15087	1.92
CP30	21	2773	2.05
CP30	22	3295	2.04
CP30	23	4507	2.04
CP30	24	4107	2.02
CP30	25	11383	2.04
CP30	26	6607	2.06
CP30	27	4854	2.03
CP30	28	4029	2.05
CP30	29	15039	1.94
CP30	30	1986	2.04
CP35	31	2119	1.99
CP35	32	2901	2.02
CP35	33	4829	2.01
CP35	34	3473	1.99
CP35	35	8766	2.04
CP35	36	5359	2
CP35	37	13248	2
CP35	38	9494	2.05
CP35	39	4055	2.03
CP35	40	5419	1.97

#### VII.3.4.4. Resultados de expresión génica por qPCR

Las curvas estándar para los genes blanco analizados: Profenoloxidasa (*PROpo*), Superóxido dismutasa (*SOD*), Peneidina 2 (*PEN*) y Glutación peroxidasa (*GPO*), y el gen de referencia Factor de elongación (*EF1 $\alpha$* ) fueron satisfactorias (es decir, las eficiencias de amplificación de cada curva cumplieron con el valor sugerido de -3.32 para cada pendiente calculada) para realizar la comparación de la expresión de estos genes por tratamiento, junto con las curvas de desnaturalización de qPCR (ver anexo 6, 7 y 8).

Al comparar la expresión génica en el hepatopáncreas del camarón entre los tratamientos, se encontró diferencia significativa en los genes *PEN*, *SOD* y *GPO* de los camarones alimentados con las dietas CP25 y CP30 en comparación con la dieta control, CP35 ( $p < 0.05$ ). La expresión de los genes *PEN*, *SOD* y *GPO* aumentó al disminuir la concentración de proteína dietética (ver Figura 18 a, b y c), mientras que la expresión de *PROpo* mostró una tendencia a incrementar en proporción directa a la concentración de proteína (Ver Figura 18d). El gen *PEN* fue sobreexpresado 3.2 veces en el tratamiento de CP25 y 2.4 veces en el tratamiento de CP30 indicando diferencia significativa con el control CP35 ( $p < 0.05$ ). Los niveles de ARNm para *SOD* mostraron que la expresión de este gen fue 1.8 veces mayor en el tratamiento de CP25 y 1.5 veces en el CP30 ( $p < 0.05$ ) comparados con el control CP35. La expresión del gen *GPO* fue 1.7 y 1.6 veces para el CP25 y CP30 ( $p < 0.05$ ) respectivamente con respecto al control CP35, ver Figura 17.

Los niveles de ARNm de *PROpo* mostraron una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de la expresión de este gen con respecto al control CP35 de 0.35 veces en el tratamiento de CP25 y 1.1 veces en el CP30.

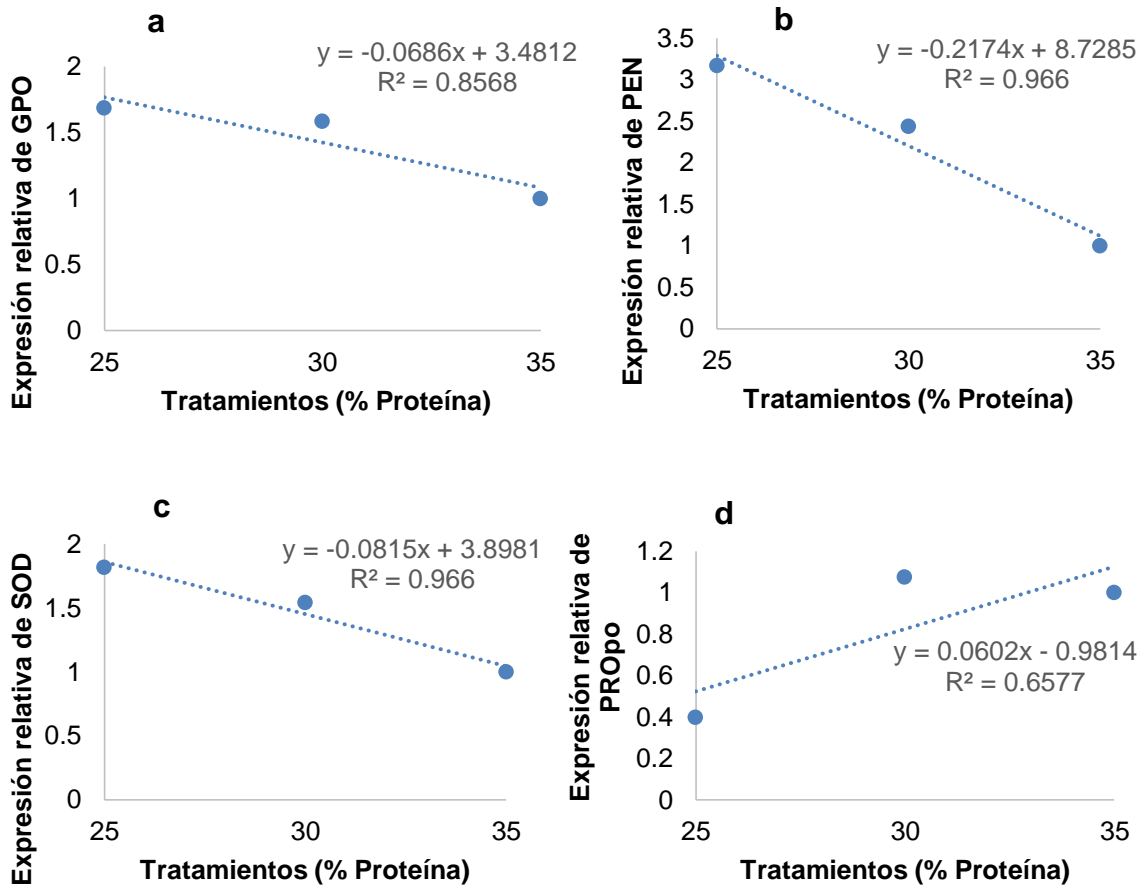


**Figura 17.** Niveles de ARNm de: *PEN*, *SOD*, *GPO* y *PROPo* en *P. vannamei* cultivado en biofloc inducido con microalgas y probiótico y con una variación de la concentración de proteína en el alimento. 25% (CP25), 30% (CP30) y un control 35% (CP35). El control equivale a 1 en cuanto al nivel de expresión relativa. Los datos son medias de la expresión de los genes evaluados (n=10).



### Ajuste a modelo lineal simple de la expresión génica

*SOD* y *PEN* mostraron las mejores correlaciones, ( $R^2$  de 0.96) con respecto al incremento de proteína en el alimento con una pendiente negativa, mientras que *GPO* presentó una  $R^2$  de 0.86, así mismo, *PROpo* no mantuvo una correlación, ya que CP30 fue similar a CP35 (Figura 18).



**Figura 18.** Ajuste a modelo lineal simple de la Expresión génica de *GPO* (a), *PEN* (b), *SOD* (c) y *PROpo* (d), en hepatopáncreas de *P. vannamei* cultivado en biofloc inducido con microalgas y probiótico y con una variación de la concentración de proteína en el alimento 25% (CP25), 30% (CP30) y un control 35% (CP35).

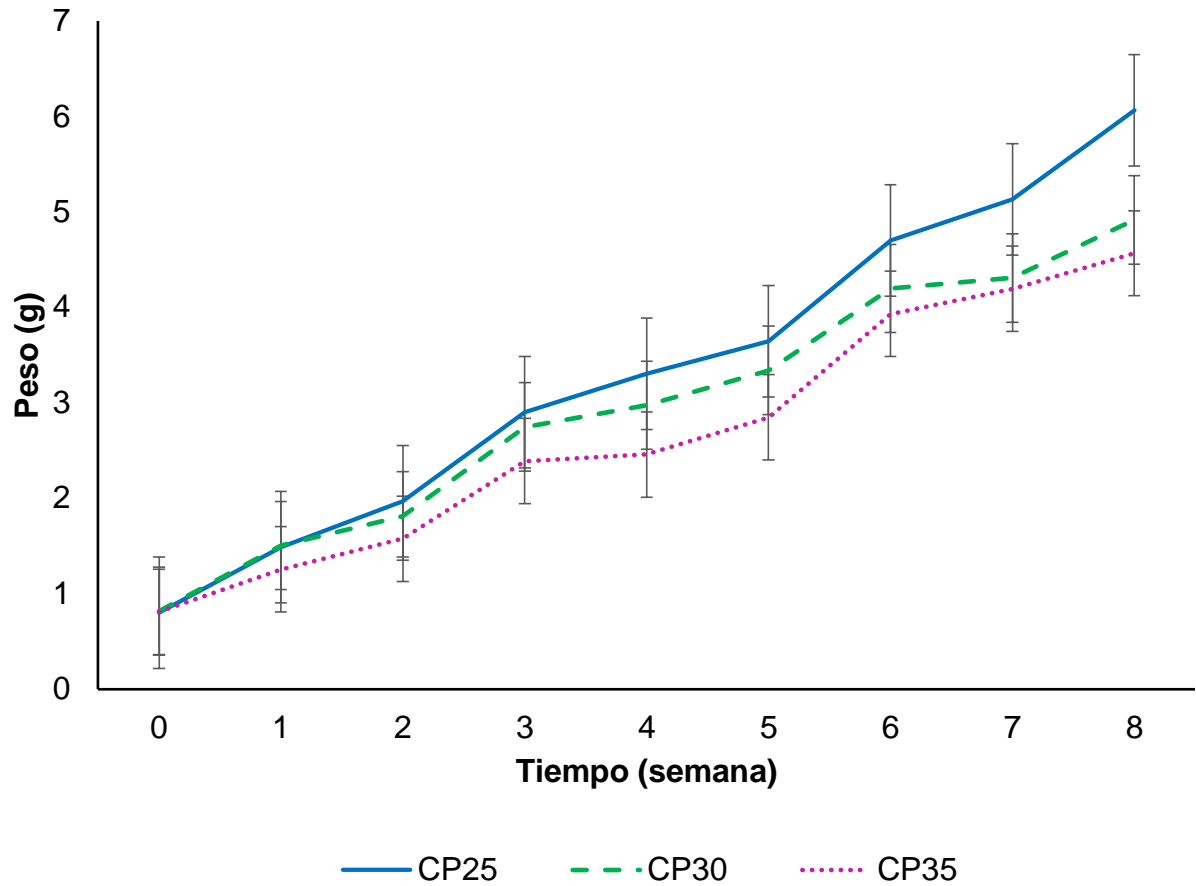
### VII.3.5. Rendimiento del cultivo

El mayor incremento de biomasa de camarones se presentó en el tratamiento CP25, con un incremento del peso promedio individual de 5.2 g, seguido del CP30 con 4.09 g y del CP35 con 3.76 g. La supervivencia en el tratamiento CP25 fue de 98.1% siendo significativamente diferente al tratamiento CP35 ( $p < 0.05$ ) que presentó una supervivencia de 75.8%. (Ver Tabla 9 y Figura 19).

**Tabla 9.** Valores promedios del rendimiento en juveniles *P. vannamei* cultivados en bioflocs inducido con *Schizochytrium* sp., *Grammatophora* sp., y *Navicula* sp., y tres concentraciones de proteína 25% (CP25), 30% (CP30) y 35% (CP35) durante ocho semanas.

	Tratamientos		
	CP25	CP30	CP35
<b>Peso inicial (g)</b>	0.80± 0.19	0.82±0.15	0.81±0.17
<b>Peso final (g)</b>	6.01±0.23	4.92±0.31	4.57±0.29
<b>Tasa de crecimiento Especifico (%/días)</b>	3.62±0.08	3.18±0.05	3.09±0.11
<b>Tasa de conversión alimenticia (%)</b>	0.87±0.04 <sup>c</sup>	0.94±0.04 <sup>b</sup>	1.07±0.06 <sup>a</sup>
<b>Supervivencia (%)</b>	98.91±0.03 <sup>a</sup>	96.20±3.02 <sup>a</sup>	75.88±0.04 <sup>b</sup>
<b>Tasa de crecimiento semanal</b>	0.75±0.06	0.58±0.03	0.54±0.05
<b>Desempeño del cultivo</b>	0.85±0.04 <sup>a</sup>	0.59±0.09 <sup>b</sup>	0.38±0.11 <sup>c</sup>

Valores promedios ± desviación estándar (SD) (n=100). Las letras superíndice diferentes en la fila indican una diferencia significativa entre los grupos de tratamientos; ANOVA de una vía, ( $P < 0.05$ ).



**Figura 19.** Curvas de crecimiento de *P. Vannamei* cultivados durante ocho semanas en biofloc e inducido con *Schizochytrium* sp., *Grammatophora* sp., y *Navicula* sp., y tres concentraciones de proteína 25% (CP25), 30% (CP30) y el control de 35% (CP35). Cada peso en g es el promedio de 100 camarones muestreados cada semana y las barras representan la desviación estándar (SD).

#### VII.4. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio mostraron que los tres tratamientos con diferentes concentraciones de proteínas mantuvieron las condiciones fisicoquímicas dentro de los valores adecuados para el cultivo del camarón blanco *Penaeus vannamei* (Brock y Main, 1994), independientemente de la temperatura que estuvo con valores cercanos al límite superior de 30°C. Los tratamientos PC25 y PC30 no fueron afectados en la supervivencia, la cual se mantuvo en 98.9 % y 96.2 % respectivamente, mientras que el tratamiento PC35 presentó una supervivencia de 75.9%. En los cultivos con mayor acumulación de amonio se produce estrés a los organismos y afecta la homeóstasis de sus procesos fisiológicos, generando sustancias que contrarrestan el estrés generado, y por consiguiente un gasto de energía y afectación de su crecimiento (Liu *et al.*, 2017). En este experimento, los tratamientos con diferentes concentraciones de proteína en los alimentos presentaron diferencias en la acumulación de compuestos nitrógenos, lo que fue más evidente a partir de la semana cinco para el CP35 que acumuló más amonio en comparación con CP30 y CP25.

Los resultados obtenidos mostraron que el mantener camarones en un biofloc inducido y administrar alimentos con 35% de proteína disminuye el crecimiento a partir de la semana cuatro, en comparación con el tratamiento CP25, donde se mantuvieron las menores concentraciones de amonio. En otros trabajos encontraron que *Penaeus vannamei* presenta tolerancia a la acumulación de compuestos nitrogenados, pero valores mayores en amonio, nitritos y nitratos de 1.45, 0.53 y 45 mg/L, respectivamente, se afecta el crecimiento y supervivencia dependiendo también de otros factores como temperatura y salinidad, (De Lourdes, 2014 y Chang, 2015). En esta investigación, se observó que el tratamiento CP35 pudo ser afectado por una pequeña acumulación de amonio, nitrito y nitratos e influir en el crecimiento del camarón, lo cual fue más notable después de la semana seis, cuando el biofloc inducido presenta microorganismos que degradan la materia orgánica y generan mayor acumulación de compuestos nitrogenados.

Se descarta la influencia de otros factores como la salinidad, ya que los tres alimentos evaluados estuvieron en el intervalo de 37‰. La tolerancia del camarón a

la salinidad está reportada en rangos de 1-40 ‰ (Menz y Blake, 1980 y Kumaran *et al.*, 2017), y el efecto de la salinidad en tasas metabólicas, masa del cuerpo y consumo de energía diaria ha sido estudiado (Lin *et al.*, 2012 y Gutiérrez *et al.*, 2011); sin embargo, en este estudio se obtuvieron diferentes pesos finales y en los tres tratamientos se mantuvieron valores similares de salinidad. Otro parámetro es el oxígeno disuelto, el cual tiene importancia por el efecto en la muda y metabolismo respiratorio del camarón (Li *et al.*, 2010), en este estudio la demanda de oxígeno (OD) se mantuvo en concentraciones de 6.5 mg/L en los tres tratamientos, estas concentraciones de OD no afectaron el cultivo hiperintensivo, tomando en cuenta que la concentración adecuada de OD, a la cual debe mantenerse, esta en el rango de 2 a 5 mg/L, valores bajos pueden afectar el crecimiento, y es crucial para obtener buenos resultados y no afectar la sobrevivencia (Licie-Brun, 1989). Por lo tanto, los valores obtenidos de OD en los tratamientos, siempre fueron adecuados para el cultivo y ayudaron al mantenimiento del floc en suspensión con lo cual no se obtuvo materia orgánica en el fondo. En el caso de CP35 los resultados no fueron los más favorables, pero al igual mantuvo la concentración de OD recomendada.

En este estudio se encontró que una alta concentración de proteína en el alimento comercial puede afectar el crecimiento. En los tanques de cultivo de los camarones alimentados con CP35, se observó la mayor concentración de amonio (0.85 mg/L), teniendo como resultado un menor crecimiento al finalizar el experimento, contrariamente, el tratamiento CP25. Por lo cual se puede mencionar que el sistema de cultivo hiperintensivo con biofloc inducido, tiene la capacidad para soportar dichas concentraciones de compuestos nitrogenados, debido a los microorganismos que constituyen el biofloc (como rotíferos y nematodos), los cuales aportan cantidades importantes de proteína viva como alimento, permitiendo tener un mejor manejo de este sistema con una densidad de 350 camarones/ m<sup>3</sup> y un alimento con 25% de proteína, lo cual es muy favorable para el acuicultor.

Por otra parte, el volumen de biofloc, es un parámetro importante de monitorear porque nos indica el día en que el biofloc mantiene un volumen estable, que en este experimento sucedió en la semana cuatro, semana en la cual se encontraron una

mayor cantidad de rotíferos, los cuales consumen materia orgánica, contribuyen al incremento de nemátodos y dan un aporte adicional de proteína. La concentración de proteína en el alimento no influyó en el volumen del biofloc, sin embargo, durante la evaluación de diferentes concentraciones de proteína, se presentaron los mayores incrementos de amonio al iniciar la semana cinco y más aún en la semana seis, lo cual coincide con una mayor concentración de nemátodos en el biofloc inducido. Los nemátodos son alimento vivo con calidad protéica preferencial para el camarón en comparación con el alimento comercial (Maehre *et al.*, 2013 y Ting Liu *et al.*, 2017). En el análisis realizado en el capítulo uno se indicó que el biofloc aportó el 28.12% de proteína, además, las microalgas incorporadas *Schizochytrium sp*, *Grammatophora sp* y *Navicula sp.*, ofrecieron un aporte de proteína de 26.3, 22.7 y 12.7 respectivamente (Pacheco-Vega *et al.*, 2015). Esos resultados sugieren que los incrementos de amonio en las semanas 5 y 6 se debieron a que los camarones consumieron alimento vivo preferencialmente y parte del alimento comercial fue consumido por bacterias heterótrofas que producen amonio.

Otros microorganismos que aportan proteína al sistema son las bacterias que integran estos flóculos, pues es conocido que bacterias marinas como *Marinobacter sp* puede aportar un 43.9 % de proteína (Bhaskar, 2003 en Berrin tansel 2017). Aunque *Vibrio spp.*, también aporta 1.8 % de proteína (Nichols *et al.*, 2004); también es una bacteria oportunista y puede causar enfermedades al camarón. Este sistema de cultivo mantuvo un número menor a  $1 \times 10^5$  UFC por ml de *Vibrio spp.*, en los tres tratamientos, lo cual no representa un riesgo de enfermedad, de acuerdo con lo reportado, concentraciones mayores a  $1 \times 10^5$  pueden indicar vibriosis o estar en un nivel no seguro para el camarón (Gómez *et al.*, 1998 y Soto-Rodríguez *et al.*, 2006). En el experimento realizado se mantuvieron las concentraciones bajas recomendadas en cultivos seguros, aunque otros autores han reportado incremento en los primeros días de maduración del biofloc (Becerril-Cortés *et al.*, 2018 y Avnimelech, 2012)

Los resultados indicados en el capítulo uno y en este segundo experimento, sugieren la misma tendencia en cuando a la composición del biofloc representada por una disminución de *Vibrio spp.* y de un incremento de BAL. Estos resultados indican

que el uso del probiótico en los cultivos evaluados juega un papel importante en la interacción con bacterias patógenas. En otros reportes se ha señalado que los probióticos del género *Lactobacillus* pueden disminuir las poblaciones de *Vibrio* spp., por lo cual son empleados en la acuicultura (Sha *et al.*, en el 2016). La presencia del probiótico pudo estar relacionado al bajo número de UFC de *Vibrio* spp., en los tres tratamientos, lo cual contribuyó a mejorar parámetros zootécnicos. Resultados similares fueron reportados recientemente (Pacheco-Vega *et al.*, 2018), quien empleó esta bacteria probiótica y mostró mejores resultados que otra bacteria probiótica comercial para el cultivo de camarón, manteniendo bajo número de *Vibrio* sp.

En este estudio se mostró la aportación de nutrientes que hizo el biofloc al camarón y nos permitió confirmar lo sugerido previamente: ofrecer al camarón un alimento comercial bajo en proteína, lo cual será un beneficio para el acuicultor. Por otro lado, también se confirmó que la disminución de proteína no afecta la salud de los camarones cultivados, esto a través de la expresión diferencial de genes relacionados con su sistema inmune, se mostró que los camarones no son vulnerables a estrés o enfermedades por lo que no se afecta el cultivo. Respecto a la expresión de genes relacionados con el sistema inmune, los mejores resultados fueron para el tratamiento CP25 del cultivo hiperintensivo, lo cual garantiza la nutrición y la salud del camarón, sugiriendo la activación y generación de moléculas que pueden actuar antagónicamente con patógenos (Luna- González *et al.*, 2013) y la respuesta positiva contra factores de estrés ambiental (Tassanakajon *et al.*, 2018). Estos resultados mostraron que el biofloc tiene también una aportación de nutrientes que complementa el alimento comercial para el camarón y mantiene la salud. El tratamiento CP30 y CP35 mostraron resultados menos favorables y pudieran estar relacionados con el incremento de compuestos nitrogenados, sin embargo, se requiere de otros experimentos para probar esta hipótesis.

El biofloc inducido con microalgas y probióticos tiene un papel importante para la nutrición y la salud en cultivos hiperintensivos de camarón blanco, se a señalado que los alimentos pueden funcionar como inmunoestimulantes (Campa- Cordoba *et al.*, 2002) e incrementar la expresión de genes relacionados con el sistema inmune, y

por lo tanto, mejorar la salud, lo cual redundó en un mejor crecimiento. Existen resultados favorables en postlarvas de *P. vannamei* tratados con biofloc y un incremento en la expresión de genes relacionados con el sistema inmune (Kim *et al.*, 2014). Otro estudio menciona que el biofloc contiene un número abundante de bacterias, que tienen una pared celular formada por varios componentes, como el lipopolisacárido bacteriano y el peptidoglicano, los cuales pueden actuar como estimulantes de la actividad inmune no específica del camarón (Panigrahi *et al.*, 2019). Por lo tanto, se reconoce que los bioflocs aumentan la inmunidad del camarón porque lo consumen como fuente de alimento vivo además por tener una comunidad microbiana muy diversa en el sistema BFT.

Los genes evaluados *SOD*, *PROpo*, *PEN*, *GPO*, en este estudio tienen una relación importante con la actividad del sistema inmune. La *SOD* es una molécula que cataliza alternativamente aniones superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrogeno (Fridovich, 1995), además, juega un papel importante en las vías de defensa antioxidante. También la *SOD* está relacionada con la actividad metabólica y por lo tanto con factores nutricionales, organismos con adecuada nutrición poseen un buen crecimiento, el metabolismo está activo, existe una adecuada homeostasis y son menos vulnerables a enfermarse (Flores-Miranda *et al.*, 2015). En este experimento la expresión diferencial del gen *SOD* en el hepatopancreas del camarón, fue más alta (1.8 veces) en el tratamiento CP25, este tratamiento mantuvo además el mejor crecimiento, lo cual confirma la relación de este gen con la actividad metabólica. De igual manera los resultados de CP30 mostraron un buen crecimiento, y una expresión del gen *SOD* mayor que el tratamiento CP35.

Se observó una correlación negativa en la expresión del gen *SOD* con respecto al incremento de proteína en el alimento, esto pudo deberse a que, existe mayor producción de compuestos nitrogenados, al incrementar la proteína en el sistema por lo tanto lo descrito anteriormente para *SOD* explica la correlación negativa, ya que la proteína juega un papel importante en la nutrición, su déficit o saturación puede afectar su crecimiento (Kureshy y Allen en el, 2002). El hecho de que haya más proteína en el alimento comercial, y por lo tanto un aporte mayor de compuestos nitrogenado genera



estrés a los camarones, explicado con la correlación negativa obtenida en la expresión de *SOD*.

Los niveles de *PEN* fueron similares a los de la *SOD* con una correlación negativa, es decir a medida que se incrementó la concentración de proteína la expresión de *PEN* disminuyó. Además, el nivel de transcripción de *PEN* en el ARNm fue de 3.2 veces mayor en el tratamiento de CP25, la cual fue similar para el tratamiento CP30. Se conoce que las Penaeidinas son péptidos antimicrobianos (AMPs), producidas y almacenadas en hemocitos, células clave del sistema inmune del camarón, (Somboonwiwat *et al.*, 2005). Son una familia única de AMP específicos de camarones, que presentan actividad antifúngica y son anti-Gram positivas (Tassanakajon *et al.*, 2013), son importante para controlar la actividad microbiana, lo que permite al camarón mantener una buena salud. Por lo tanto, los resultados sugieren que la protección que les permitió a los camarones ser menos vulnerables y tener la mejor supervivencia en los tratamientos evaluados, estuvo relacionada con el fortalecimiento del sistema inmune debido al biofloc inducido y al alimento con 25% de proteína.

Para *GPO* los resultados fueron similares a *SOD* (25CP>30CP>35CP), *GPO* esta relacionada con la función de proteger al organismo del efecto oxidante de los hidroperóxidos de forma endógena (Fridovich, 1995). Este gen también mantuvo una correlación negativa, y su nivel de transcripción dentro del ARNm fue el mayor para CP25 y disminuyó al incrementar la concentración de proteína en la dieta.

El gen *PROPo* tuvo la mayor expresión en CP30 y no se encuentra una tendencia con relación a la concentración de proteína en la dieta. Para este gen se sugiere que su expresión puede estar relacionada por la relación descrita, lo cual indica que se activa con bacterias Gram positivas como respuesta a su sistema de defensa (Soderhall y Cerenis 1992). Los valores de *PROPo* pueden incrementarse por el aumento de defensas humorales en relación con mecanismo activos de coagulación, **melanización** y actividad de la defensa celular (Amparyup *et al.*, 2012), en este estudio no se observó melanización en los camarones, el CP25 tiene los menores valores para *PROPo*, lo cual sugiere que las bacterias Gram positivas presentes en el cultivo y en

el intestino del camarón indujeron esta reacción de defensa. En CP30 y CP35 PROPo estuvo más sobre expresado, se sugiere que la mayor concentración de compuestos nitrogenados pudo modificar la diversidad de bacterias, hongos u otros microorganismos que se encuentran en el biofloc y que pudieron estar activando a *Propo*. Para explicar mejor es necesario conocer la microbiota bacteriana que se encuentra en el agua e incluso relacionarla con la del tubo digestivo del camarón para ver si estos pueden estar realizando la activación de estos genes.

Este estudio mostró una expresión mayor de *SOD*, *PEN* y *GPO* para el CP25, lo que se relaciona con el adecuado balance de biofloc, con este nivel de proteína del alimento. Se sugiere que el incremento de proteína de CP30 y CP35 pudo influir en la calidad del agua y composición de la microbiota bacteriana del biofloc. Estudios realizados de sistemas con biofloc donde varían la concentración de proteína muestran resultados diferentes a este estudio. Los resultados de ese estudio son diferentes a los reportados (Panigrahi *et al.*, en el 2019), donde evaluaron a *L. vannamei* en tanques de 7.5 m<sup>3</sup>, con densidad de 150 camarones por m<sup>3</sup>, utilizaron una concentración de proteína de 24, 32 y 40% mas biofloc y un control de condiciones autotróficas con un 40% de proteína, evaluaron los genes *SOD* y *PROPo*. Sus resultados mostraron que los compuestos nitrogenados incrementaron conforme incrementó la concentración de proteína, con diferencias significativas, esto al igual que en este estudio, pero los resultados mejores de FCR y supervivencia fueron para el 40%, contrario a los resultados obtenidos en este estudio que fue el 25%, donde atribuimos los mejores resultados al biofloc inducido con microalgas y probiótico, para mantener los mejores parámetros inmunológicos. En este estudio atribuimos estos resultados a la aportación de proteína del biofloc, la cual es mayor a 20%, mientras que en el reporte mencionado no se indica la calidad del biofloc y se atribuyen los buenos resultados a los alimentos proporcionados. Sin embargo, resultados similares que se deben considerar son la expresión de los genes *SOD* que en ambos estudios se observó la mayor expresión relativa para los tratamientos con el mejor crecimiento, supervivencia y una tasa metabólica que corresponde a 40% (Paniagri, 2018) y el CP25 en este estudio. Otra diferencia observada con el estudio mencionado esta en señalar los resultados de expresión de RNAm de *PROPo*, donde ellos encuentran que es similar en sus

tratamientos evaluados de 24, 32 y 40%, mientras que en este estudio no hay una tendencia.

Los resultados del sistema inmune pueden estar relacionados con otros nutrientes como los carbohidratos, se ha mostrado que en tratamientos con diferentes carbohidratos para *L. vannamei*, relacionan al mejor tratamiento con la expresión de SOD y su mejor supervivencia. Además de mostrar una actividad inmuomoduladora al activar los sistemas de defensa y antioxidante PROpo (Paniagri *et al*, en el 2018), este estudio puede mostrar la calidad del biofloc no solo por su aporte proteico sino también de carbohidratos que al no estar presente en concentraciones adecuadas podrían haber afectado la supervivencia y salud.

En este estudio, el biofloc inducido con microalgas y probióticos y la baja concentración de proteína evaluada no comprometió los parámetros inmunológicos. En otro estudio se reportó el efecto de la proteína en la dieta sobre la supervivencia, la eficiencia de asimilación y la condición inmunológica de los juveniles de *L. vannamei* usando niveles de proteína de 15% y 40% y uno extremadamente bajo 5%, sin empleo biofloc (Pascua *et al.*, 2004), en este reporte mostraron resultados optimos para el 40% de proteína e indicaron que los camarones pueden adaptarse a bajas concentraciones de proteína, con sus respuestas fisiológicas pero compromete la producción de biomasa, y las condiciones inmunológicas y consecuentemente la salud del camarón. Lo cual es congruente con otro estudio donde postularon que en *L. vannamei*, juveniles alimentados con 16% de proteína, genera un pobre crecimiento y sugirieron que se debe dar una mayor cantidad de alimento para cumplir con los requerimientos diarios de aminoácidos, es decir que el 16% es para cubrir los requerimientos básicos y sugirieron que el 40% de proteína es adecuado para el crecimiento, y que el 16% reduce el crecimiento por que pierden energía en buscar alimento (Kureshy y Allen, 2002), sin embargo, en nuestro sistema con biofloc hay alimento disponible en todo momento y no afecta el crecimiento ni la expresión de SOD, PEN y GPO. Estos resultados muestran el beneficio del biofloc inducido con las microalgas y bacterias probióticas que pueden estar jugando un papel importante en la estimulación,

generación de nutrientes y moléculas que dan un beneficio al cultivo de camarón blanco al ser cultivado en densidades altas.

## VII.5. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Amparyup, P., Charoensapsri, W., & Tassanakajon, A. (2013). Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. *Fish and Shellfish Immunology*, 34(4), 990–1001.
- Aranyakananda, P y A.L. Lawrence. 1993. Dietary protein and energy requirements of the White- legged shrimp, *Penaeus vannamei* and the optimal P/E ration. En Pascual c., E. Zenteno, G. Cuzon, A. Sanchez, G, Gaxiolo, G, Taboada, J, Suarez. *Aquaculture* 236: 431-480.
- Avnimelech Y, M. Kochba. 2009. Evaluation of Nitrogen utake and excretion by tilapia in biofloc tank, using 15N tracing, *Aquaculture* 287 (1) 163-168).
- Avnimelech, Y. 1999. Carbon/Nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 176: 227–235.
- Avnimelech, Y. 2009. *Biofloc technology. A practical guide book*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge.
- Avnimelech, Y. 2012. *Biofloc technology a practical guide book*, The World Aquaculture Society, Baton Rouge, 272 pp.
- Becerril-Cortés, D., Del, M., Monroy-Dosta, C., Gustavo, M., Emerenciano C., Sofia, B. & Schettino-Bermúdez, B.S. 2018. 6(2): 541-547 Effect on nutritional composition of produced bioflocs with different carbon sources (Molasses, coffee waste and rice bran) in Biofloc system. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. 6(2): 541–547.
- Bhaskar, P.V. 2003. *Estudies on some Aspects of Marine Microbial Exopolysaccharide*. Ph.D. Thesis, T. 281. Goa University, Goa.
- Brock, J y K. L. Main. 1994. *Aguide to the common problems and diseases of cultured Penaeus vannamei*. World Aquacultured society, Baton Rouge Louisiana 242 pp.
- Burford MA, Thompson PJ, McIntosh RP, Bauman RH, Pearson DC. 2004. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a highintensity, zero-exchange system. *Aquaculture* 232:525–537.

- Campa-Córdova A.I., Hernández-Saavedra N.Y., Philippis R. De, Ascencio F. 2002 Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to  $\beta$ -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology* 12, 353-366.
- Cerenius, L., Jiravanichpaisal, P., Liu, H. P., & Söderhäll, I. 2010. Crustacean immunity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 708, 239–259.
- Chang, Z. W., Chiang, P. C., Cheng, W., and Chang, C. C. 2015. Impact of ammonia exposure on coagulation in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 118, 98–102.
- Colvin, L.B., Brand, C.W., 1977. The protein requirement of penaeid shrimp at various life cycle stages in controlled environment systems. *J. World Maricult. Soc.*, 8, 821-840.
- Cuzon G. A. Lawrence, G. Gaxiola, C. Rosas, J. Guillaume. 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture*, 235 (1–4). pp. 513-551.
- De Lourdes Cobo, M., Sonnenholzner, S., Wille, M. & Sorgeloos, P. 2014. Ammonia tolerance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) larvae. *Aquaculture Research*, 45(3): 470–475.
- Ekasari J, Muhammad, Enang H, Surawidjaja, Sri Nuryaty, Peter De Shchryver y Peter Bossier. 2014. Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. Vol 41, pp 332-339.
- Emerenciano M, Gaxiola G, and Cuzon G. 2013. Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. Chapter 12.
- Flores-Miranda, M. del C., Luna-González, A., Cortés-Espinosa, D. V., Álvarez-Ruiz, P., Cortés-Jacinto, E., Valdez-González, F. J., González-Ocampo, H. A. 2015. Effects of diets with fermented duckweed (*Lemna* sp.) on growth performance and gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*, 23(2), 547–561.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide radical and superoxide dismutase. *Annu. Rev. Biochem.* 15, 17–26.

- Gómez B, Gila L, Tron M. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. Vol 163. pp 1-9.
- Guillard, R.R. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *Culture of Marine Invertebrate Animals*, 3: 29 –60.
- Gutiérrez, J. S., Masero, J. A., Abad-Gómez, J. M., Villegas, A., and Sánchez-Guzmán, J. M. 2011. Understanding the energetic costs of living in saline environments: Effects of salinity on basal metabolic rate, body mass and daily energy consumption of a long-distance migratory shorebird. *The Journal of Experimental Biology*, 214 (5): 829–835.
- Hargreaves John A. 2013. Biofloc production Systems for aquaculture Southern Regional Aquaculture Center. SRACPublication No. 4503 1-12.
- Haslun J.A, E. Correia, K. Strychar, T. Morris, T. Samocha. 2012. Characterization of bioflocs in a no water exchange super-intensive system for the production of food size pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Int. J. Aquac.*, 2 (1).
- Juan M. Pacheco-Vega, Marco A. Cadena-Roa, Felipe Ascencio, Carlos Rangel-Dávalos & Maurilia Rojas-Contreras. 2015. Assessment of endemic microalgae as potential food for *Artemia franciscana* culture. *Aquat. Res.*, 43(1): 23-32.
- Kim, S. K., Pang, Z., Seo, H. C., Cho, Y. R., Samocha, T., & Jang, I. K. (2014). Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture Research*, 45(2), 362–371.
- Koshio, S., S. Teshima A, Kanazawa, T. Watase. 1993. The effect of dietary protein content on growth digestion efficiency and nitrogen excretion of juvenile Kuruma prawns *Penaeus japonicus*, *aquaculture*, 113; 101- 114.
- Kumar M, Pandey P, Aravin R, Purushothaman Cs. 2015. Effect of different biofloc system on water quality, biofloc composition and growth performance in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Acuaculture Research* 47(11).

- Kumaran M, Anand PR, Kumar JA, Ravisankar T, Paul J, Vimala DD, Raja KA. 2017. Is Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) farming in India is technically efficient?—A comprehensive study. *Aquaculture* 468:262–270.
- Kureshy, N., & Allen Davis, D. 2002. Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific White shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Acuaculture* 204, 125-143.
- Li, F., & Xiang, J. 2013. Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China. *Developmental and Comparative Immunology*.pp. 11-26.
- Li, Y., Wang, F., Dong, S. L., and Sun, H., 2010. Effects of salinity fluctuation on the molt and respiratory metabolism of juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Periodical of Ocean University of China*, 40 (7): 47–52 (in Chinese with English abstract).
- Lin, Y. C., Chen, J. C., Li, C. C., Morni, W. Z., Suhaili, A. S. N., Kuo, Y. H., and Huang, C. L., 2012. Modulation of the innate immune system in white shrimp *Litopenaeus vannamei* following long-term low salinity exposure. *Fish and Shellfish Immunology*, 33 (2): 324–331.
- Liti D., Kerogo L., Munguti J. and Chhorn L. 2005. Growth and economic performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed on two formulated diets and two locally available feeds in fertilized ponds. *Aquacult. Res.* 336: 746752.
- Liu, G., Zhu, S., Liu, D., Guo, X., & Ye, Z. (2017). Effects of stocking density of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) on immunities, antioxidant status, and resistance against *Vibrio harveyi* in a biofloc system. *Fish and Shellfish Immunology*, 67, 19–26.
- Lucien-Brun, H. 1989. Guía para la producción de camarón en el Ecuador. 1a. Edición. 58 pp.
- Luna-González Antonio, Jesús T. Moreno-Herrera, Ángel I. Campa-Córdova, Héctor A. González-Ocampo, Jesús A. Fierro-Coronado, Píndaro Álvarez-Ruíz & Mario A. Bueno-Ibarra. 2013. Respuesta inmune y expresión de genes en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) inducida por inmunoestimulantes microbianos. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* vol.41 no.5 Valparaíso.



- Maehre, H, Hammre K, Elvevoll E. 2013, Nutrient evaluation of rotifers and zooplankton: Feed for marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition* Vol. 19. Pp 301-311.
- Maldonado. C. S. Guillen, O Pantoja, L, Arena, M Ezquerro- Bauer, C A Alvares-Gonzalez, G. Cuzon y G. Gaxiola. 2012. Effect of plant protein concentrates on nutrition physiology of *Litopenaeus Vannamei* (Boone, 1883) juveniles. *Aquaculture Research*. 2012. 43. 1209-1222.
- Menz A, Blake BF. 1980. Experiments on the growth of *Penaeus vannamei* Boone. *J Exp Mar Biol Ecol* ;48:99 e 111.
- Nichols, C, M, Lardiere, S, G., Bowman, J. P. Nichols, P.D., Gibso J.A. E., 2005. Chemical characterization of exopolysaccharides from antarctic marine bacteria. *Microb. Ecol.* 49 (4), 578-589.
- Niu Shengwen, Linwei Yang, Hongliang Zuo, Jiefu Zheng, Shaoping Weng Jianguo He and Xiaopeng Xu. 2018. A chitinase from pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* involved in immune regulation. *Developmental & comparative immunology*. Vol 85. Pp 161-169.
- Ochieng Ogello Erick, Safina M. Musa, Christopher Mulanda Aura, Jacob O. Abwao and Jonathan Mbonge Munguti. 2014. An Appraisal of the Feasibility of Tilapia Production in Ponds Using Biofloc Technology: A review. *International Journal of Aquatic Science*. Vol 5, No. 1, 21-39.
- Pacheco-Vega, J. M., Cadena-Roa, M.A., Leyva-Flores, J.A., Zavala-Leal, O.I., Pérez Bravo, E. & Ruiz-Velazco, J.M.J. 2018. Effect of isolated bacteria and microalgae on the biofloc characteristics in the Pacific white shrimp culture. *Aquaculture Reports*, 11: 24–30.
- Panigrahi, A., Saranya, C., Sundaram, M., Vinoth Kannan, S.R., Das Rasmi, R., Satish Kumar, R., Rajesh, P., Otta, S.K., 2018. Carbon:Nitrogen (C:N) ratio level variation influences microbial community of the system and growth as well as immunity of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in biofloc based culture system. *Fish Shellfish Immunol.* 81, 329–337.
- Panigrahi, A., Sundaram, M., Saranya, C., Satish Kumar, R., Syama Dayal, J., Saraswathy, R. Gopal, C. 2019. Influence of differential protein levels of feed on

production performance and immune response of pacific white leg shrimp in a biofloc-based system. *Aquaculture*, 503, 118–127.

- Pascual C, Zenteno E, Cuzon G, Suárez J, Sánchez A, Gaxiola G, Taboada G, Maldonado T y Rosa C. 2004. *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary proteins. *Aquaculture* 239, pp. 375-395.
- Sha, Y., Wang, B., Liu, M., Jiang, K., & Wang, L. 2016. Interaction between *Lactobacillus pentosus* HC-2 and *Vibrio parahaemolyticus* E1 in *Litopenaeus vannamei* in vivo and in vitro. *Aquaculture*, 465, 117–123.
- Sha, Y., Wang, L., Liu, M., Jiang, K., Xin, F., & Wang, B. 2016. Effects of lactic acid bacteria and the corresponding supernatant on the survival, growth performance, immune response and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 452, 28–36.
- Somboonwiwat K, Marcos M, Tassanakajon A, Klinbunga S, Aumelas A, Romestand B. 2005. Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol* ;29:841e51.
- Soto-Rodríguez S, Nuno S, Roque A. Gomez B. 2006. Pathoheneity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminescent *Vibrio*. *Aquaculture* 258 pp 109-115.
- Tassanakajon, A., Rimphanitchayakit, V., Visetnan, S., Amparyup, P., Somboonwiwat, K., Charoensapsri, W., & Tang, S. 2018. Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization. *Developmental and Comparative Immunology*, 80, 81–93.
- Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., Supungul, P., & Tang, S. 2013. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish and Shellfish Immunology*, 34(4), 954–967.
- Teichert- Coddington, D.R. y M Arrue, 1988. Efecto de las proteínas de la dieta y la densidad de siembra en la producción de *Penaeus vannamei* en tanques de tierra. *Revista Latinoamericana de Acuicultura*. 35: 29-33. En Pascual, C., E, Zenteno, G. Cuzon, A. Sánchez, G, Gaxiola, G, Toboada, J, Suárez, T,

- Maldonado, C. Rosas. 2004. *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary protein. *Aquaculture*. 236: 431-450.
- Ting Liu, Li YU, Jingjing Xu, Xiaomei Yan, Huixin Li, Joann K, Whalen y Feng Hu. 2017. Bacterial traits and quality contribute to the diet choice and survival of bacterial-feeding nematodes. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol 115. Pp 467-474.
  - Velasco, M., A.L. Lawrence and W.H. Neill (1996). Effects of dietary protein and phosphorous on aquacultural water quality. Tercer simposium internacional de nutrición acuícola. 11-13 Nov. 1996. México. pp 1-21.
  - Wongsasak, U., Chaijamrus, S., Kumkhong, S., & Boonanuntanasarn, S. (2015). Effects of dietary supplementation with  $\beta$ -glucan and synbiotics on immune gene expression and immune parameters under ammonia stress in Pacific white shrimp. *Aquaculture*, 436, 179–187.
  - Xu, W.J. and Pan, L.Q. 2012. Effects of bioflocs on growth performance, digestive enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange tanks manipulating C/N ratio in feed. *Aquaculture* 356357:147-152.
  - YanFang Wei, Shao-An Liao, An-li Wang, 2016, The effect of different carbón sources on the nutritional composition microbial community and structure of bioflocs. Elsevier *Aquaculture* 465, 88- 93.
  - Zhao, H. X., Cao, J. M., Wang, A. L., Huang, Y. H., Li, G. L., & Lan, H. B. 2012B. Effects of Dietary  $\beta$ -1,3-Glucan on Expression of Immune-related Genes of *Litopenaeus vannamei* Exposed to Nitrite-N. *Journal of the World Aquaculture Society*, 43(3), 400–410.
  - Zhao, P., Huang, J., Wang, X.H., Song, X.L., Yang, C.H., Zhang, X.G. & Wang, G.C. 2012. The application of bioflocs technology in high-intensive, zero exchange farming systems of *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture*, 354: 97–106.
  - Zhu., X. Z., Y-J, Lui, L. X. Tian, K. S. Main, S. X. Zheng, Q. J., Pan, M. C. Q. Zhang y, Hu. 2010. Effects of dietary protein and lipid levels on growth and

energy productive value of pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at different salinities. Aquaculture Nutrition. 16:392-399.

### **VIII. CAPITULO 3. Evaluación de la comunidad bacteriana de camarón blanco, *Penaeus vannamei* en un cultivo hiperintensivo con biofloc inducido y macroalgas.**

#### **VIII.1. INTRODUCCIÓN**

La microbiota intestinal está compuesta por una gran variedad y cantidad de bacterias las cuales juegan un papel importante en la salud del huésped (Zhang *et al.*, 2014), contribuyen en la protección contra patógenos (Isolauri *et al.*, 2001) y proporcionan una adecuada absorción de nutrientes con un beneficio en actividades fisiológicas (Hooper *et al.*, 2002). La microbiota intestinal es considerada como un ecosistema complejo vital para promover la salud del hospedero y participar en la respuesta inmune, por lo que teniendo el adecuado establecimiento y balance de microorganismos intestinales, se mejora la resistencia a enfermedades, (Lin, 2014). Para *Penaeus vannamei* se conoce que la colonización de microorganismos en su tracto intestinal ocurre en su etapa nauplio, cuando el poro anal comienza a moverse (Simoes *et al.*, 2002), de esta forma, las bacterias contribuyen en procesos digestivos y en su crecimiento. En el cultivo de camarón el incremento de masa corporal se relaciona con los hábitos nutricionales y la dieta contribuye a una adecuada ganancia de peso, así mismo, esta variable está relacionada con la comunidad microbiana. Estudios de la diversidad del gen 16S rRNA de comunidades bacterianas asociadas al tracto gastrointestinal del crustáceo *Nephrops norvegicus* alimentado con diferentes dietas, mostraron que el alimento promueve el establecimiento de comunidades bacterianas específicas, predominando especies que han sido encontradas en poblaciones naturales de *N. norvegicus*, representando posibles simbiosis residentes (Meziti *et al.*, 2012).

La comunidad microbiana en la actualidad es estudiada en organismos marinos importantes para la acuicultura (Holt *et al.*, 2020). En el camarón blanco es necesario conocer aspectos relacionados con la alimentación y con la microbiota que está dentro del sistema de cultivo, como en sedimentos, agua y en el intestino de los camarones (Qiao *et al.*, 2016 y Fan 2019). Además, es importante detectar la presencia de bacterias patógenas que pudieran afectar el crecimiento y la supervivencia del

hospedero (Ferreira *et al.*, 2020, Rodríguez-Camacho *et al.*, 2013, Cuellar-Angel *et al.*, 2010 y Gómez, 2003).

En el cultivo de camarón, la calidad del agua es importante para la obtención de una buena cosecha, se ha investigado a través de análisis metagenómicos del agua, los sedimentos y efluentes del cultivo (Martínez-Porchas y Vargas-Albores 2017). Los estudios metagenómicos consisten en el análisis de ADN genómico de una comunidad microbiana con la aplicación de técnicas moleculares y con la ventaja de estudiar las comunidades microbianas directamente de sus ambientes naturales sin la necesidad del aislamiento, cultivo y la observación de dichos organismos (Zhang *et al.*, 2014b, Martínez-Porchas y Vargas-Albores 2017).

La Metagenómica provee información que hace algunos años era difícil obtener, como lo indica en su definición el informe del instituto Americano de Microbiología 2002 , que la señala como la secuenciación a gran escala del material genómico agrupado en una comunidad microbiana, ya sea como aproximaciones aleatorias o específicas, ensamblando secuencias de genomas únicos o grupos de genomas, la determinación de la variación en genes de la comunidad y el contenido del genoma en tiempo y espacio, la influencia de las actividades antropogénicas, la función, la diferenciación y la evolución del genoma de la comunidad (Nagamani-Balagurusamy, 2014). La Metagenómica busca también caracterizar la estructura taxonómica de una comunidad microbiana, ya sea mediante el empleo de marcadores moleculares como es el gen 16s ARNr o el uso de la secuenciación aleatoria (Nagamani-Balagurusamy 2014). Con esta herramienta se busca evaluar la diversidad microbiana y sus funciones en los diferentes hábitats, y caracterizar la estructura taxonómica de la comunidad microbiana. Los resultados metagenómicos son de gran utilidad en la acuicultura y tienen un gran potencial para mejorar los cultivos acuícolas (Martínez-Porchas y Vargas-Albores, 2017).

La caracterización de la microbiota de *Penaeus vannamei* en diferentes ecosistemas ha sido estudiada (Zeng *et al.*, 2017; Holt *et al.*, 2020; Cornejo- Granados *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2019 y Fan y Li, 2019), se destaca el rol vital que juegan los microorganismos en el ciclo de nutrientes o biotransformación en los cultivos

acuícolas, mediante el balance de ciclos de C, N, P y S, los cuales son vitales para el manteniendo de la salud del ecosistema (Xu *et al.*, 2020, Cardona *et al.*, 2016 y Schweitzer *et al.*, 2020). Aunque se contempla la importancia de estos elementos y el conocimiento de las comunidades, no se han encontrado reportes donde se explique con detalle y con la especificidad que se requiere estos ciclos, por lo cual la aportación de información relacionada con alguno de estos elementos es importante el Nitrógeno por ejemplo es de interés por su toxicidad al acumularse en forma de amonio, nitritos y nitratos (Valencia-Castañeda *et al.*, 2019).

En el sistema biofloc existe la necesidad de conocer los grupos de microorganismos que intervienen en estos cultivos, con el fin de implementar el manejo adecuado y disminuir la cantidad de compuestos tóxicos o dar mejor circulación al N en su ciclo (Van *et al.*, 2006). En este trabajo, se analizaron las comunidades bacterianas de un sistema de biofloc inducido con microalgas y probiótico, es de interés la relación de la microbiota con los compuestos nitrogenados y es importante conocer los cambios de la comunidad bacteriana asociada al cultivo al variar la concentración de proteína en el alimento, además se analizó la estructura de la comunidad bacteriana en el cultivo de biofloc inducido con las microalgas, las cuales pueden estar contribuyendo en ciclos de N, ya que es conocido que estas intervienen en el ciclo de los compuestos nitrogenados (Xian Liu *et al.*, 2019), además las microalgas también puede tener actividad antimicrobiana, e inhibir el crecimiento de especies del género *Vibrio* (Kokou *et al.*, 2012), con lo cual contribuyen a cambios en la estructura microbiana. En esta investigación contemplamos a las microalgas como parte del alimento, base primaria de la cadena alimenticia de microorganismos que se encuentran en el floc y su importancia en el ciclo de nitrógeno. Así mismo tomó interés su relación con la comunidad bacteriana en comparación con camarones en biofloc con macroalgas.

Existen antecedentes de estudios donde las bacterias mejoran los cultivos de camarón, investigaciones recientes comparan comunidades de microorganismos que contribuyen en calidad del agua, señalan grupos de bacterias del biofloc, explican la importancia relativa de bacterias quimioautotroficas y la asimilación que realizan las

bacterias heterotróficas (Luo, G *et al.*, 2020). Estudios metagenómicos indican el papel de las bacterias en el desarrollo y fisiología de *L. vannamei* en camarones de 30 y 60 días en aguas claras, mostraron la dominancia de los grupos bacterianos en cada etapa del cultivo evaluada, estos estudios se sugieren por la necesidad para proponer bacterias que beneficien a los cultivos, (Gao *et al.*, 2019). Otros estudios de camarones en estadios de postlarvas se han realizado, donde se analizó la calidad del agua monitoreando amonio, nitritos y nitratos en fase de maternización, señalaron la influencia de fuentes de carbono en la relación de bacterias del género *Vibrio*, lo cual es necesario conocer para controlar estas vías de acceso a *Vibrio* (Ferreira *et al.*, 2020).

Otras investigaciones comparan las concentraciones totales de bacterias en sistemas de biofloc con agua clara, y encuentran más alta concentración en sistemas de biofloc (Kaya *et al.*, 2020), con lo cual resaltan los benéficos del biofloc. Un estudio a gran escala y en altas densidades mostró que las comunidades bacterias que intervienen en procesos nitrificantes, indican abundancias bajas pero eficientes en sistemas superintensivos con intercambio de agua limitado en biofloc (Xu *et al.*, 2021). Por lo tanto sigue el interés en conocer el manejo y control de las características de las comunidades bacterianas para el biofloc, y se plantea que éstas varían al realizar cambios en sus fuentes de carbono para la generación del biofloc, por ejemplo hay antecedentes donde evalúan granos de amaranto y trigo para mostrar la variación de las comunidades microbianas donde mostraron perfiles taxonómicos en ambos biofloc diferentes al inicio pero al finalizar semejantes y sugieren que no brindan la misma aportación de nutrientes, (Martínez-Cordova *et al.*, 2018). Mientras que otros estudios indican que diferentes granos brindan diferentes microambientes y detectaron un total de 22 phyla en las muestras de biofloc, pero la estructura taxonómica se basó en cuatro phyla principales (*Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes*), determinan una diferencia de la microbiota inicial pero cambios al finalizar por lo cual dicen que hay diferentes rutas y terminan en grupos taxonómicos semejantes los bioflocs de diferentes granos (Vargas-Albores *et al.*, 2019). La adición de otros componentes como probióticos también ha sido puesto en evaluación para conocer la influencia en la diversidad bacteriana en biofloc para camarón, un estudio para ver



como influyen un probiótico comercial y consorcios microbianos endémicos naturales mostró diferencias significativas en los biofloc (Huerta- *Rabango et al.*, 2019)

En este capítulo se presenta el estudio metagenómico de un experimento donde se analizaron las comunidades bacterianas del intestino de camarón de tratamientos con variación del porcentaje de proteína y con la adición de macroalgas. Las macroalgas son descritas por los beneficios obtenidos, en un estudio reciente se mostró interés en conocer los grupos microbianos en sistema con biofloc adicionado con alga, indicando que la administración de algas pardas a camarones ayudaron en tener camarones resistentes a enfermedades de mancha blanca, en conjunto un análisis metagenómico reveló que los niveles crecientes de la adición de una macroalga en la dieta reduce la riqueza microbiana del intestino de camarón, en conclusión indicaron que las algas afectan la microbiota intestinal lo que benefició al camarón al presentarse una menor mortalidad (Schleder *et al.*, 2020). En otro estudio se implementó a *Navicula* en el biofloc de un sistema heterotrofo y otro fotoheterótrofo, los beneficios fueron semejantes en la calidad del agua, y en el sistema fotoheterotrofo mejoró la supervivencia y FCR (Martínez-Porchas *et al.*, 2020).

Por lo tanto, es necesario en los sistemas con biofloc propuestos con altas densidades y la adición de probióticos y macroalgas conocer sus comunidades bacterianas. Debe haber adecuada concentración de microorganismos para eliminar compuestos nitrogenados, relacionados con la cantidad de proteína en alimentos y se confirma la participación de bacterias al conocer las Unidades Taxonómicas Operaciones (OTUs) de las comunidades bacterianas. Otras evaluaciones indican que la variación de la relación C:N influye en la presencia de varios géneros de bacterias, por ejemplo la presencia de *Vibrio* o de bacterias benéficas para el crecimiento del camarón y fortalecimiento del sistema inmune (Panigrahi, *et al.*, 2018). Por lo cual es necesario mostrar si el biofloc propuesto contribuye a tener camarones saludables. También se conoce que la Influencia de restringir las dietas influye en la relación de bacterias (Simon, C. J., *et al.*, 2020). Por lo tanto, actualmente la abundancia de microorganismos que integran el biofloc no está clara en la descripción de las claves taxonómicas, por lo cual la técnica de alto rendimiento y cuantificación del ARNr 16s

sigue siendo útil, para el estudio de este tipo de ecosistemas (Wei *et al.*, 2020). Otro estudio propuesto contribuyó con información para conocer grupos taxonómicos en biofloc que brindan beneficios al cultivo del camarón, tomando en cuenta que las comunidades microbianas están ligadas a la productividad, la salud. (Holt *et al.*, 2020).

En este estudio mostraremos si el biofloc inducido con probiótico, microalgas y macroalgas, contribuye a la obtención de una microbiota intestinal con grupos taxonómicos benéficos como el phylum Proteobacteria, para avanzar en el entendimiento del microbioma del camarón que en un futuro será implementado en la acuicultura.

En este tercer capítulo iniciaremos mostramos los beneficios de la adición de macroalgas como; alimento, mejoras en las concentraciones de compuestos nitrogenados y la disminución del género *Vibrio* que puede influir en las cargas bacterianas del biofloc y en la microbiota intestinal del camarón, dando lugar a un gran interés para su evaluación usando herramientas metagenómicas. Se mostrará el análisis metagenómico del intestino de camarón alimentado con las dietas evaluadas en el capítulo 2, CP25, CP30 y CP35, donde se observó la mejora de los parámetros zootécnicos. Además se plantea el análisis metagenómico del intestino de camarones alimentados con macroalgas adicionadas en fresco, las cuales, juegan un papel importante en la salud, como se ha mencionado en otros reportes donde se ha sugerido que influyen en las asociaciones bacterianas que existen en la microbiota intestinal (Pérez *et al.*, 2010 y Holt *et al.*, 2020).

## VIII.2. Materiales y Métodos

### VIII.2.1. Preparación de las dietas

En este capítulo se analizaron muestras de intestinos de camarones de los tratamientos mencionados en el capítulo 2: CP25, CP30 y CP35 del sistema de biofloc inducido con las microalgas y probióticos y también un tratamiento adicional al cual se le agregaron macroalgas. En el capítulo 2 el análisis de los tratamientos de tres dietas con diferentes % de proteína fue realizado desde un punto de vista zootécnico e inmunológico y en este capítulo se analizará desde un punto de vista metagenómico. Se iniciará mencionando la preparación del biofloc empleado en la adición de macroalgas al biofloc con monitoreo de parámetros zootécnicos.

#### VIII.2.1.1. Generación del biofloc

La generación del biofloc se describe detalladamente en el capítulo dos, brevemente, el biofloc fue inducido con melaza de caña a una concentración de 25 g/m<sup>3</sup> por día (Avnimelech 1999), medio F/2, microalgas marinas *Schizochytrium* sp, *Grammatophora* sp y *Navicula* sp a densidad inicial de 50 000 cel. /mL provenientes del Laboratorio de microalgas de la Unidad Pichilingue y 40 L de la bacteria probiótica TD19 (*Lactobacillus fermentum*) aislada del tracto digestivo de *P. vannamei*, obtenida del Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos (UABCS), el método de cultivo fue el indicado en el capítulo uno del tratamiento BFD1 (por la calidad en su composición nutricional). La generación de los flóculos se llevó acabo en un tanque de 28 000 litros, y éstos fueron usados como inóculo (200 Litros/Tanque) para los tanques de 15 000 litros. Se procedió nuevamente a agregar melaza de caña (25 g/m<sup>3</sup> por día).

#### VIII.2.1.2. Obtención de macroalgas

Para la evaluación de las macroalgas en los cultivos de camarón con biofloc inducido con microalgas y probióticos, se colectó *Ulva* spp., y *Gracilaria* sp., (Figura 20) en la playa La bruja perteneciente a La Paz, B.C.S, se trasladó a la Unidad Pichilingue en hieleras de plástico, después fueron limpiadas, para retirar los organismos que se

encontraban en su superficie y posteriormente fueron lavadas y sumergidas en hipoclorito de sodio (Cloralex) a una concentración de 1ml por Litro de agua de mar, se enjugaron y cortaron a un tamaño homogéneo de 1cm<sup>2</sup> para ser agregadas al biofloc 2 k por tanque.



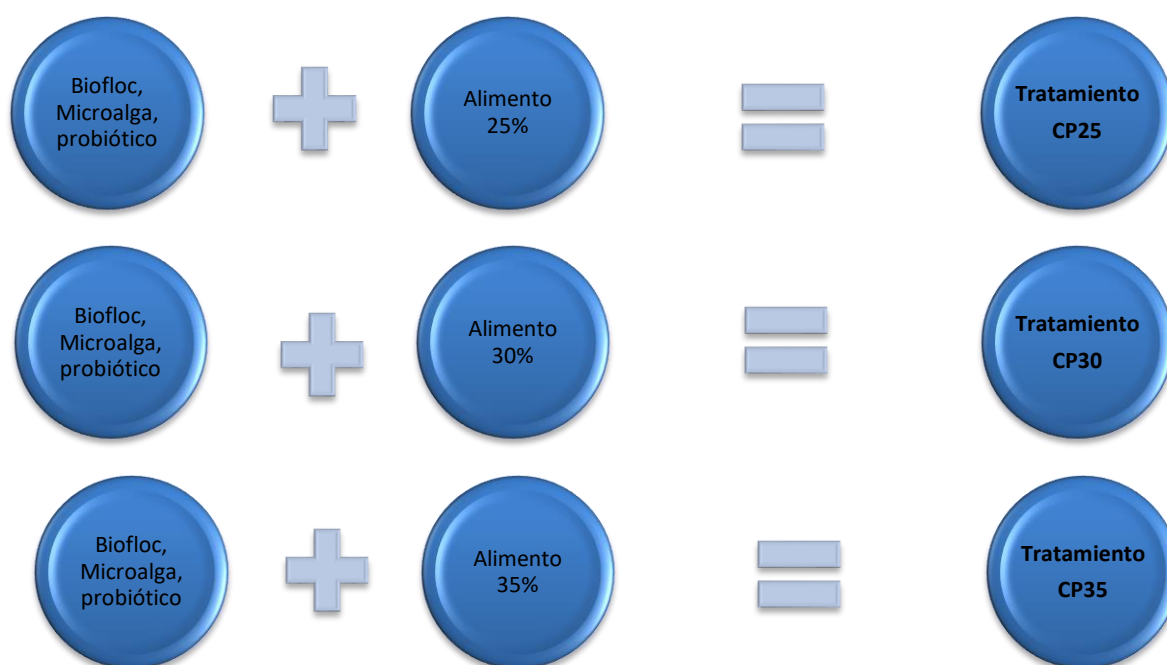
**Figura 20.** Macroalgas adicionadas al biofloc. a) Dos tipos de *Ulva* spp y b) *Gracilaria* sp.

### **VIII.2.1.3. Concentración de proteína en las dieta**

Los alimentos empleados fueron de marca comercial (Nutrimientos acuícolas Azteca®, Guadalajara, Jalisco, México). En los tratamientos con y sin macroalga se utilizó el alimento con 25% de proteína y en los otros tratamientos sin macroalgas, se emplearon las muestras del estudio realizado en el capítulo dos, donde se usaron dietas con 25, 30 y 35% de proteína. La alimentación inicial en todos los tratamientos fue de un 8% y finalizó con un 3% del peso corporal del camarón.

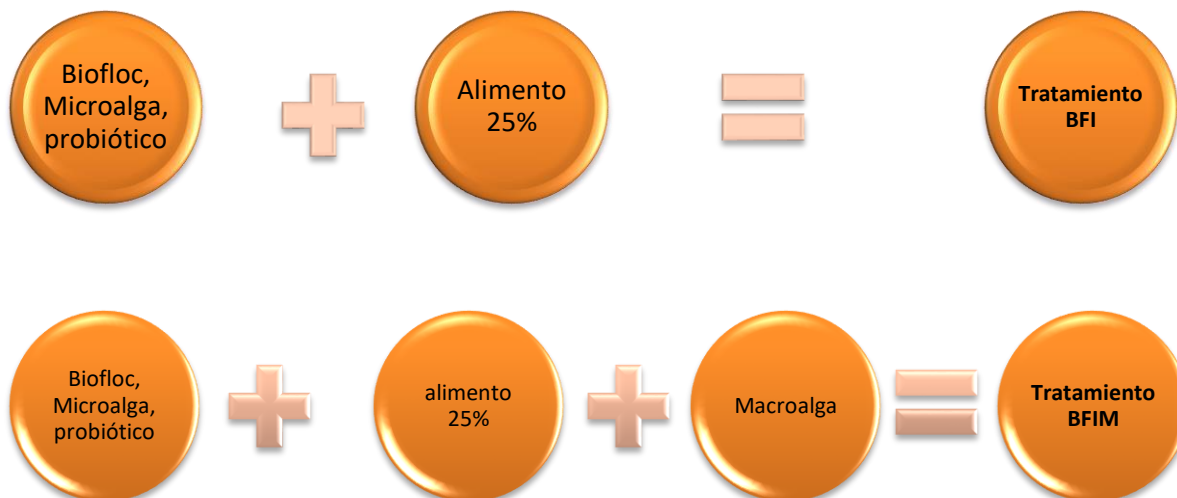
### VIII.2.2. Diseño experimental y organismos cultivados

Los camarones empleados para el estudio metagenómico fueron tomados de los tratamientos CP25, CP30 y CP35, correspondientes a la variación de la concentración de la proteína (Figura 21) cuyo diseño experimental fue explicado en el capítulo 2, los intestinos colectados fueron obtenidos al final del proceso de engorda en cada tratamiento del experimento.



**Figura 21.** Esquema de los tratamientos con la variación en sus dietas analizadas. Los tres tratamientos varían en la concentración de proteína CP25, CP30 y CP35.

Para la evaluación de la adición de la macroalga en el BF, también se siguió el mismo proceso de cuidado maternal hasta obtener el peso cercano a 0.1 g para iniciar la engorda, descrito en el capítulo 2. Los dos tratamientos fueron, el **BFI** como el biofloc inducido con microalgas y probiótico, y el segundo como **BFIM** el biofloc inducido con la adición de macroalgas (Figura 22), estos en tanques de 15,000 Litros.



**Figura 22.** Esquema de los tratamientos con la variación en sus dietas analizadas, el **BFI** es el biofloc inducido y el **BFIM** es el biofloc inducido más macroalgas.

### VIII.2.3. Parámetros zootécnicos evaluados a los tratamientos BFI y BFM sin y con adición de macroalga

#### VIII.2.3.1 Calidad del agua

Para determinar los parámetros fisicoquímicos en los cultivos de evaluación de adición de macroalgas la temperatura del agua y oxígeno disuelto fueron monitoreadas diariamente cada cuatro horas utilizando un multiparametro (YSI 55). Se registró el pH con un potenciómetro (HANNA, Hi 98127) y salinidad cada 24 horas con un refractómetro manual (BTX – 1, VEE GEE). Se tomaron muestras de agua de cada tanque para obtener la concentración promedio de amonio, nitritos y nitratos, siguiendo la técnica de Kits comerciales LYSA, realizando las lecturas de espectrofotometría con un YSI®, Photometer Ecosense 9500®. Se registró el volumen de biofloc (BFV) semanalmente mediante el uso de conos Imhoff, sedimentando 1 L de agua del biofloc por 30 minutos (Y. Avnimelech, 2009).

### **VII.2.3.2. Monitoreo de bacterias ácido-lácticas y del género *Vibrio***

Se realizaron conteos de UFC, empleando medios de cultivo Agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS; DIFCO, EE.UU) para bacterias ácido lácticas y en medio tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS; DIFCO, EE.UU) para *Vibrio* spp, se tomaron tres muestras de cada tanque de agua del biofloc y de tres intestinos de camarón por tanque, cada quince días, y dos días previos de cada muestreo, hasta finalizar el experimento, se estimó la concentración de UFC por mL<sup>-1</sup> en el agua del biofloc y de UFC en intestino del camarón, para cada tratamiento.

### **VIII.2.3.3. Crecimiento del camarón**

Una Biometría semanal se realizó para determinar el peso promedio del camarón por tanque y se determinó el peso ganado al finalizar el experimento, estos fueron realizados semanalmente con un mínimo de 10 muestreos aleatorios por tanque con 10 camarones por muestreo, se estimó la biomasa final (kg por m<sup>3</sup>), supervivencia (%) y tasa de conversión alimenticia (TCA) de acuerdo a Zhao *et al.*, 2012.

### **VII.2.3.4. Observaciones de la alimentación del camarón blanco con macroalgas**

Adicional al experimento con la adición de macroalgas se colocaron tres peceras de 500 L con 200 camarones, con un peso promedio de  $1.5 \pm 0.09$  g, estos camarones se alimentaron con el 5% de su peso corporal con macroalgas sin alimento comercial. Estas observaciones se realizaron para mostrar si existía una aceptación de la macroalga como alimento, se registraron las observaciones de su hábito al tener este como alimento durante tres semanas.

### **VIII.2.3.5. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos de la comparación del tratamiento BFI y BFIM, fueron analizados para indicar homocedasticidad y normalidad (Bartlett's and Kolmogorov-Smirnov tests). Se expresaron como media los resultados, los cuales fueron sometidos a un análisis, analysis paired comparison t-test: (P-level significance=0.05). Este análisis se hizo empleando Statistical ver. 8 software for Windows.

#### **VIII.2.4. Análisis de las comunidades microbianas en los cultivos de biofloc**

Para el análisis de las comunidades microbianas se realizó una colecta de muestras de los intestinos de los camarones de cada uno de los 5 tratamientos analizados.

##### ***VIII. 2.4.1. Colecta de muestras de biofloc e intestinos de camarón***

Muestreo de intestinos de camarón. Al finalizar el experimento, se verificó que los camarones no estuvieran en proceso de muda y fueron tomados al azar, todos en un mismo tiempo. Se realizó la disección con instrumentos estériles de al menos cinco camarones de cada tanque para la extracción de los intestinos con todas las precauciones asépticas se colocaron en camas de hielo. Los intestinos se mantuvieron en tubos eppendorf de 1.5 ml que contenían 0.5 ml con buffer RNAlater, los tubos fueron guardados en un ultracongelador a -80°C hasta la extracción de ADN metagenómico.

##### ***VIII.2.4.2. Extracción del ADN metagenómico***

El sistema digestivo del camarón (de la boca al ano) cultivado en el sistema hiperintensivo con biofloc y guardado en RNAlater fue transferido con unas pinzas a un tubo estéril y adicionado con 0.5 ml de buffer STE (Sucrosa 12.5%, Tris-HCL 50 mM pH 8.0, EDTA 100mM), rápidamente fue cortado con tijeras estériles en pequeños trozos, se homogeneizó con un micro-homogeneizador para liberar todo el contenido fecal del tejido y se agregó 1 ml más de STE, se homogeneizó vigorosamente en el vortex y se centrifugó a 500 rpm por 2 min para sedimentar tejido y partículas. El sobrenadante se pasó a otro tubo y se volvió a centrifugar a 10,000 rpm por 2 min, se tiró el sobrenadante y el pellet fue re suspendido en 300 µl de STE (Este proceso se repitió en caso de que quedaran partículas en la suspensión), se homogeneizó y se adicionó con 200 µL de lisozima (10 mg/ml), se homogenizó con movimiento de campana y después se incubó 1 hora a 37°C en el termo mezclador. Después de la incubación se centrifugó por 2 min a 10,000 rpm, se tiró el sobrenadante y se adicionaron 600 µl de la solución Nucleic lysis solution del kit de promega, se incubó a 80°C por 5 min y se enfrió a temperatura ambiente. Se agregaron 3 µl de RNase solution del mismo kit al lisado de células, se invirtió el tubo 5 veces para mezclar y se incubó a 37°C por 60 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente y se agregaron



200µl de Protein Precipitation solution al lisado celular tratado con RNasa, se agitó vigorosamente a alta velocidad por 20 segundos para mezclar la solución de precipitación con el lisado celular. Se incubó la muestra en hielo por 5 minutos, se centrifugó a 15,000 rpm por 3 minutos, se transfirió el sobrenadante (800ml) que contiene el ADN a un tubo estéril que contenía 600 µl de isopropanol se mezcló con cuidado por inversión, de tal forma que se pudiera observar una masa visible de ADN. Posteriormente se centrifugó a 15 000 rpm a temperatura ambiente durante 10 min y cuidadosamente se decantó el sobrenadante, se adicionaron 600 µl de etanol al 70 % y con cuidado de no desprender el pellet se invirtió el tubo varias veces con la finalidad de lavar el pellet de ADN, se centrifugó a 15 000 rpm por 3 min. Cuidadosamente se desechó el etanol, se colocó el tubo con la boquilla hacia abajo y luego hacia un lado sobre un papel limpio absorbente para permitir que el pellet seque perfectamente, se dejó en reposo 4 hrs. Finalmente se adicionaron 30 µl de agua destilada desionizada libre de nucleasas, (dependiendo del rendimiento de ADN) y se esperó entre 2 a 3 horas hasta que el pellet se disolvió a temperatura ambiente y se guardó a -20 °C para su conservación.

Realizada la extracción se verifico su pureza mediante un gel de agarosa al 1 % y se procedió a verificar la cuantificación del ADN extraído por medio de un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Fisher Scitific Inc.).

#### **VIII.2.4.2.1. Reacción de PCR para confirmar la presencia de ADN de bacterias**

Se prepararon a partir de todas las muestras de ADN metagenómico alícuotas de 20 µL a una concentración de 100 ng/µL para amplificar por PCR el gen 16S ARNr, la mezcla de reacción para la amplificación fue preparada con Buffer de enzima Taq (5X), MgCl<sub>2</sub> (25 mM), dNTP's mix (10 mM/100µL) OligoA (117pM/ µL) Oligo pH(131pM/ µL), Taq polimerasa (5U/ µL) ADN genómico (0.1 µg/ µL), H<sub>2</sub>O bi-destilada libre de DNAsas, todo para un volumen final de 12.5 µL por reacción. La reacción de PCR se llevó acabo en un termociclador para 35 ciclos a 95°C por 4 min, 94 °C por 45 seg, 56 °C por 45 seg, 72 °C por 1 min, 72 °C por 5 min y 4 °C en ∞, los oligonucleótidos utilizados fueron; pA: 5´- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG – 3´ y pH: 5´- AAG GAG GTG ATCCAG CCG CA - 3´ (Broda *et al.*, 1999).

#### **VIII.2.4.3. Amplificación y secuenciación NGS de las muestras de ADN- meta**

El ADN-meta de las muestras de intestinos de camarón fueron enviadas para su secuenciación (Next Generation Sequencing Core) a la empresa Argonne National Laboratory, IL, USA para la secuenciación de amplicones. La región V4 del gen 16S rRNA mitocondrial, fue amplificada usando los sets de primers 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') Y 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAA-3'), Siguiendo el método descrito por Kozich *et al.* (2013). Los amplicones de 16S (paired: 150 x 150bp) fueron secuenciados usando el kit Illumina MiSeq 500-cycle con el sistema de secuenciación illumina MySeq.

##### **VIII.2.4.3.1. Procesamiento de las secuencias**

Las secuencias del gen 16S rRNA bacteriano fueron ensambladas usando el ensamblador Data Base Project (Proyecto de base de datos ribosomales, RDP; <http://rdp.cme.msu.edu>), de acuerdo con Cole (2014), con lecturas de entre 250-280 pares de bases (I-250-L280). Las secuencias ensambladas fuera de este rango fueron no microbianas de acuerdo con BLAST. Las secuencias ensambladas con un error máximo esperado ajustado de Q score menos de 25 sobre la secuencia completa fueron eliminadas. Para remover chimeras de novo fue usada la paquetería Vsearch (2.4.3, 64 bit) de acuerdo con Rognes (2016), seguida por la remoción de chimeras por referencia usando la base de datos RDP 16S rRNA gene training set sequences (No.15). Secuencias con alta calidad y libres de chimeras fueron agrupadas a 97% de similitud de secuencia por CD-Hit (4.6.1) (Fu *et al.* 2012), resultando en la identificación de unidades taxonómicas operacionales únicas (OTUs) y su abundancia en cada muestra. Estos resultados constituyeron la base para la determinación y comparación de la estructura de las comunidades bacterianas del intestino de camarón de los tratamientos de cultivo con biofloc inducido.

### VIII.2.5. Análisis metagenómico

La composición taxonómica de los metagenomas de las comunidades bacterianas del intestino de camarón en cada uno de los tratamientos de cultivo fue primero evaluada a través de blastall (ncbi-blast-2.2.18+.exe), con base en el programa Phyloseq (McMurdie & Holmes 2013). El análisis se llevó a cabo en RStudio, para lo cual se cargaron las librerías phyloseq, plyr, vegan 2.5-6 y ggplot2. Se creó un objeto con la tabla de OTUs generada previamente, esta tabla contiene todas las categorías taxonómicas de cada OTU, posteriormente se generó la tabla de taxa, donde se observa cada categoría taxonómica y luego relacionamos las dos tablas dentro del objeto phyloseq en forma de matriz. Paralelamente se elaboró en Excel la tabla de metadatos, la cual contiene información sobre las muestras y es a partir de ésta que se hacen las pruebas estadísticas para agrupar o encontrar diferencias entre tratamientos. Esa tabla se importó a R y se confirmó que el número de muestras de los metadatos sea igual al número de muestras de la tabla de OTUs y que tengan el mismo nombre. Los tres objetos principales: tabla de OTUs, Taxa y metadatos se unieron en un solo objeto Phyloseq y se inició el análisis.

Primeramente, se quitaron las OTUs potencialmente erróneas y de baja calidad, se evaluó la profundidad de secuenciación y cobertura, ya que el número de secuencias por muestra y cobertura de cada OTU puede sesgar el análisis de comunidades. Para comparar las muestras con diferentes profundidades de secuenciación se estandarizó la cuenta de OTUs basado en la profundidad de secuenciación de dos maneras: 1) Abundancia relativa y 2) Rarefacción.

La abundancia relativa convierte el número total de secuencias de cada muestra en 1 (100%) y todas las cuentas de OTUs se convierten en una fracción de 1 en cada muestra. La Rarefacción es un método que hace un submuestreo de las OTUs para la misma profundidad de secuenciación, para esto hay que hacer un nuevo objeto phyloseq que submuestra todas las OTUs de cada muestra.

Tomando en cuenta que todas las OTUs son importantes para este estudio, se estimó la abundancia relativa.

#### **VIII.2.5.1. Estimación de la abundancia relativa en las comunidades microbianas**

Se seleccionaron las OTUs más abundantes y después se graficó en barra la abundancia de éstos. Para ello el primer paso fue convertir el objeto phyloseq (data.phy) en un objeto de dos dimensiones, una tabla larga. Después se hizo una sumatoria de las abundancias por OTU en las muestras y se ordenaron de la OTU más abundante al menor para graficar los más abundantes. Ya seleccionadas las OTUs más abundantes se les extrajo con toda su información de la tabla larga que se generó del objeto phyloseq, se agruparon las OTUs para ver cuál fue la más abundante y también se mantuvo la información de Phylum.

#### **VIII.2.5.2. Análisis de componentes principales (PCA)**

Esta herramienta se empleó para comparar las abundancias entre grupos y para visualizar las correlaciones entre los datos y las diferencias entre los grupos. Comparando la estructura de la comunidad bacteriana de acuerdo con parámetros zootécnicos y la variación en las dietas evaluadas de los tratamientos.

#### **VIII.2.6. Análisis estadístico para las comunidades bacterianas**

Para conocer las diferencias entre los tratamientos se calculó la distancia de las comunidades y se determinaron los factores experimentales usando la PERMANOVA, la cual usa los OTUS estandarizados y se determinó el efecto de cada factor para calcular F, R<sup>2</sup> y P-level.

### VIII.3. RESULTADOS

#### VIII.3.1. Resultados del cultivo de camarón con biofloc inducido más macroalga

##### VIII.3.1.1. Calidad del agua

Los parámetros fisicoquímicos obtenidos del experimento de Biofloc **BFI** y **BFIM** se mantuvieron dentro de los rangos de tolerancia establecida para los cultivos de camarón como se indica en la tabla 10. El oxígeno disuelto, temperatura, pH y salinidad fueron semejantes entre ambos tratamientos ( $P > 0.05$ ), solo el pH del tratamiento con macroalgas presentó un valor poco menor a 7.8 no siendo significativo (Tabla 10). La salinidad se incrementó después de la tercera semana, por lo que se realizaron recambios de agua al 5% cada dos días para mantenerla en el rango de concentración adecuada. Los compuestos nitrogenados, se mantuvieron a las concentraciones más bajas de todos los experimentos realizados en esta investigación, sin embargo el **BFIM** presentó diferencia significativa en concentración de nitritos y nitratos ( $P < 0.05$ ) comparado con **BFI**, mientras que la concentración de amonio en ambos tratamientos fue semejante, (Tabla 10).

##### VIII.3.1.2. BAL y del género *Vibrio* en el cultivo con biofloc y macroalgas

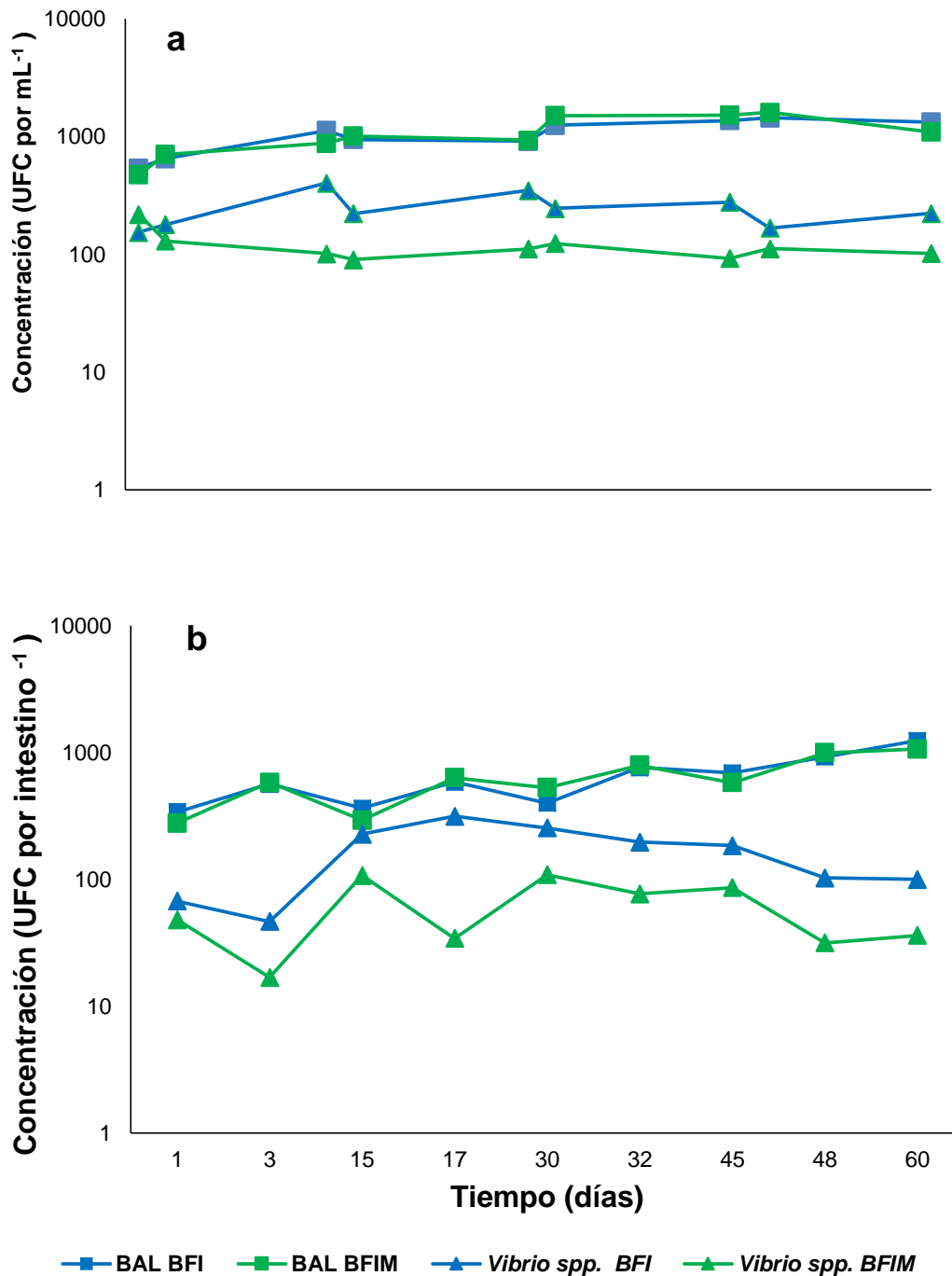
Los resultados de las cuentas viables del género *Vibrio* spp., en el biofloc del cultivo mostraron diferencia significativa entre los dos tratamientos en **BFI**  $2.47 \times 10^2$  UFC por  $\text{mL}^{-1}$  y en **BFIM**  $1.20 \times 10^2$  UFC por  $\text{mL}^{-1}$ , mientras que las cuentas viables de intestinos del camarón mostraron en **BFI**  $1.65 \times 10^2$  UFC por  $\text{intestino}^{-1}$  y en **BFIM**  $0.06 \times 10^2$  UFC por  $\text{Intestino}^{-1}$ . El tratamiento con la adición de las macroalgas mantuvo las más bajas concentraciones durante todo el experimento, mientras que en el **BFI** se registraron disminuciones después de la adición del probiótico en el agua (Figura 23).

Las cuentas viables de BAL no mostraron diferencias significativas entre los dos tratamientos analizados ni en el biofloc ni en el intestino de los camarones, en **BFI** se contaron  $1.06 \times 10^3$  UFC por  $\text{mL}^{-1}$  en el biofloc y  $6.50 \times 10^2$  UFC por  $\text{intestino}^{-1}$  y en **BFIM** se contaron  $1.00 \times 10^3$  UFC por  $\text{mL}^{-1}$  en el biofloc y  $6.37 \times 10^2$  UFC por  $\text{intestino}^{-1}$  de los camarones (Figura 23).

**Tabla 10.** Valores de calidad del agua de cultivos de *P. vannamei* en biofloc inducido con microalgas *Schizochytrium* sp., *Grammatophora* sp., y *Navicula* sp., y probiótico *L. fermentum* TD9 (BFI) y más macroalgas *Ulva* y *Gracilaria* (BFIM), durante 60 días de cultivo.

	BFI	BFIM
<b>Oxígeno disuelto (mgL<sup>-1</sup>)</b>	6.26 ± 1.02	6.24 ± 1.18
<b>Temperatura °C</b>	28.19 ± 2.01	28.19 ± 2.01
<b>Ph</b>	7.8 ± 0.18	7.68 ± 0.15
<b>Salinidad</b>	39.71 ± 1.62	39.41 ± 1.63
<b>Amonio (mgL<sup>-1</sup>)</b>	0.14 ± .06	0.11 ± .01
<b>Nitritos (mgL<sup>-1</sup>)</b>	0.16 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.02 <sup>b</sup>
<b>Nitratos (mgL<sup>-1</sup>)</b>	6.65 ± 0.40 <sup>a</sup>	5.41 ± 0.15 <sup>b</sup>

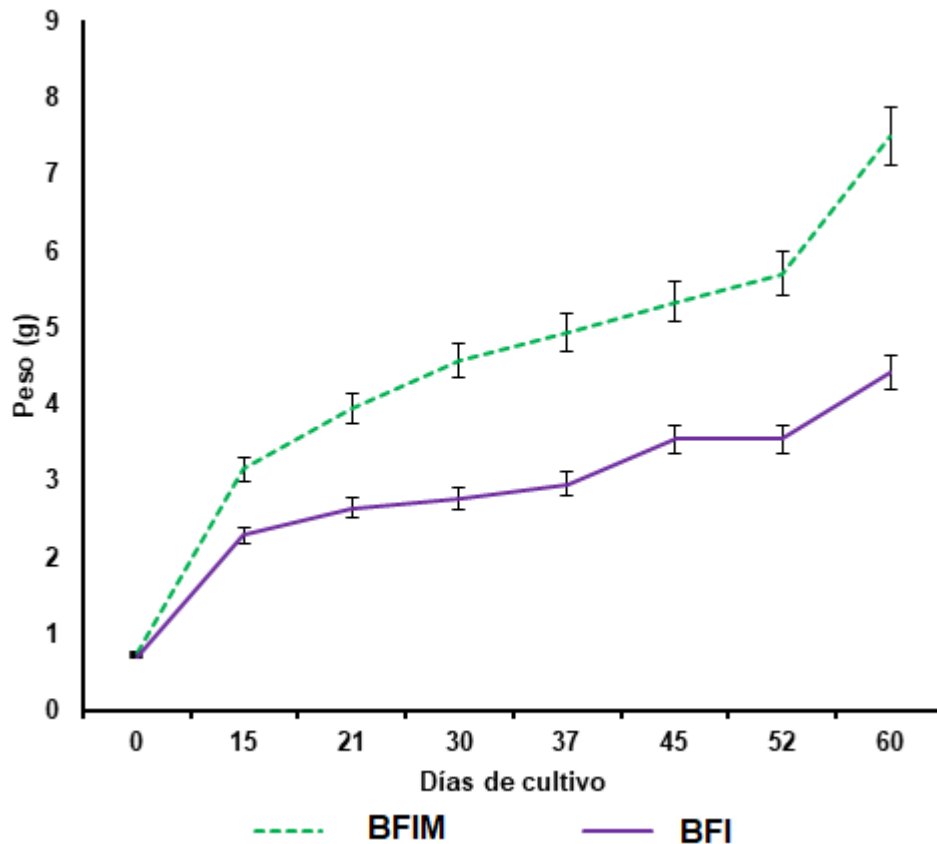
Valores promedio ± desviación estándar (SD). La ausencia de subíndices indica que no hay diferencia significativa entre los tratamientos (analysis paired comparison t-test).



**Figura 23.** Concentración de BAL y *Vibrio* spp., en agua con biofloc (a) y en intestino de camarón (b), en un cultivo de *P. vannamei* con biofloc inducido sin macroalga (BFI) con macroalga (BFIM), durante seis semanas de cultivo.

### VIII.3.1.3. Rendimiento en el cultivo de camarón blanco con biofloc inducido más macroalga

El rendimiento en *P. vannamei* alimentado con o sin macroalgas además del alimento peletizado, mostró diferencias significativas favorables para el cultivo adicionado con las macroalgas, respecto a el peso final, a la tasa de crecimiento semanal, a la tasa de conversión alimenticia y al desempeño del cultivo ( $P < 0.05$ ) como se muestra en la Tabla 11. El tratamiento con macroalgas mostró mayor ganancia de peso desde la segunda semana, obteniendo un promedio de 6.7 g al finalizar el experimento mientras que en el cultivo sin macroalgas se obtuvo un promedio final de 3.7 g como se muestra en la figura 24.



**Figura 24.** Pesos promedio de *P. vannamei* cultivado en biofloc inducido con microalgas *Schizochytrium* sp., *Grammatophora* sp., y *Navicula* sp., y probiótico *L. fermentum*, sin macroalgas (BFI) y con macroalgas *Ulva* y *Gracilaria* (BFIM), durante 60 días de cultivo.



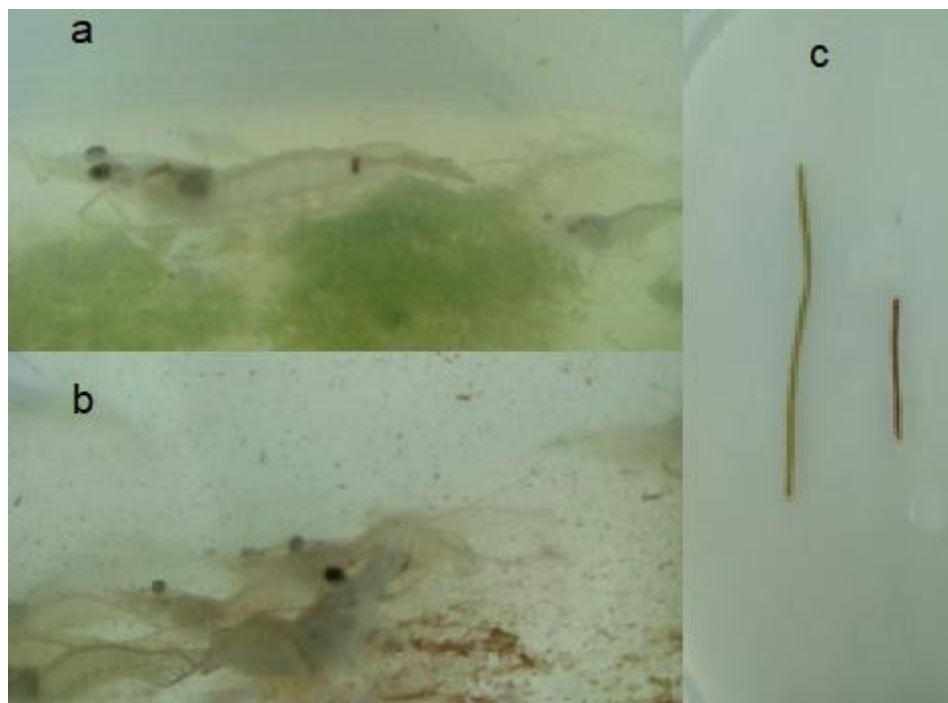
**Tabla 11.** Valores promedios del rendimiento de juveniles *P. vannamei* en cultivo con biofloc inducido con microalgas y probiótico, sin macroalgas (BFI) y con macroalgas (BFIM), durante seis semanas.

	BFI	BFIM
<b>Peso inicial (g)</b>	0.8± 0.19	0.8±0.19
<b>Peso final (g)</b>	4.42±0.21 <sup>b</sup>	7.5±0.22 <sup>a</sup>
<b>Tasa de crecimiento Especifico (%/días )</b>	3.05 ±0.05 <sup>b</sup>	5.75±0.05 <sup>a</sup>
<b>Tasa de conversión alimenticia (%)</b>	1.49±0.02	1.34±0.02
<b>Supervivencia (%)</b>	90.00±1.02 <sup>b</sup>	94.27±3.64
<b>Tasa de crecimiento semanal</b>	0.52±0.04 <sup>b</sup>	1.03±0.04 <sup>a</sup>
<b>Desempeño del cultivo</b>	0.33±0.06 <sup>b</sup>	0.69±0.04 <sup>a</sup>

Valores promedios ± desviación estándar (SD). La letra superíndice diferente en la fila indica una diferencia significativa entre los grupos de tratamientos; ANOVA de una vía, (P <0.05).

### VIII.3.2. Observaciones de la alimentación del camarón blanco con macroalgas

Observaciones realizadas durante treinta días a camarones puestos en peceras alimentados solo con macroalgas, indicaron 100% de sobrevivencia en ambos tratamientos. Los camarones mantuvieron una alimentación continúa teniendo un ligero cambio de coloración en tubo digestivo y urópodos de acuerdo a la macroalga administrada, verde con la *Ulva* sp. (Figura 25a) y café con *Gracilaria* sp. (Figura 25b), se observaron tractos digestivos llenos sin interrupción, lo cual se muestra con las líneas fecales (Figura 25c). Los camarones mostraron tener una buena aceptación de ambas macroalgas, mantuvieron condiciones saludables de acuerdo con las características morfológicas monitoreadas como intestinos llenos, estructuras como telson, musculo y antenas con coloración normal de acuerdo a Morales, 2008.



**Figura 25.** Camarones *P. vannamei* alimentados solo con las macroalgas (a) *Ulva* sp., y (b) *Gracilaria* sp. (c) heces fecales desechadas constantemente.

### VIII.3.3. Análisis metagenómico de intestinos de camarón cultivados con biofloc inducido por bacterias probióticas, microalgas y macroalgas

#### VIII.3.3.1. Concentraciones de ADN metagenómico en Intestino de camarón

Las 90 muestras de intestinos de camarón procesadas para la extracción de ADN metagenómico dieron concentraciones adecuadas. De éstas, se seleccionaron 40 muestras, tomando como criterio la integridad, la pureza y la concentración que se muestra en la tabla 12. Las muestras consideradas para su análisis metagenómico fueron las extraídas de los tratamientos que corresponden a los diferentes niveles de proteína y a la adición o no de macroalgas.

**Tabla 12.** Concentración de ADN metagenómico en muestras de intestino de camarón de cultivos con biofloc inducido con microalgas y probióticos, con dietas de tres niveles de proteína CP25 muestra 11i- 20i, CP30 muestras 21i- 30i y CP35 muestras 31i-40i, adicionado con macroalga BFIM muestras 41i-45i y Control sin su adición BFI Muestras 41i- 50i.

MUESTRA	Tratamiento	Concentración		Volumen ( $\mu$ L)
		ng/ $\mu$ L	A260/A280	
11i	CP25	100	1.44	20
12i	CP25	100	1.76	20
13i	CP25	86	1.66	20
14i	CP25	84	1.49	20
15i	CP25	100	1.81	20
16i	CP25	87	1.48	20
17i	CP25	68	1.5	20
18i	CP25	88	1.71	20
19i	CP25	86	1.54	20
20i	CP25	97	1.62	20
21i	CP30	100	1.68	20
22i	CP30	100	1.49	20
23i	CP30	100	1.86	20

BFT mejorado por bacterias, microalgas y macroalgas para el Cultivo de *Penaeus vannamei*

24i	CP30	100	1.5	20
25i	CP30	100	1.56	20
26i	CP30	100	1.87	20
27i	CP30	100	1.5	20
28i	CP30	100	1.63	20
29i	CP30	100	1.79	20
30i	CP30	100	1.72	20
31i	CP35	100	1.66	20
32i	CP35	100	1.83	20
33i	CP35	100	1.91	20
34i	CP35	100	1.92	20
35i	CP35	81	1.6	20
36i	CP35	100	1.54	20
37i	CP35	100	1.68	20
38i	CP35	100	1.64	20
39i	CP35	82	1.61	20
40i	CP35	100	1.59	20
41i	BFIM	100	1.86	20
42i	BFIM	100	1.86	20
43i	BFIM	93	1.63	20
44i	BFIM	100	1.59	20
45i	BFIM	59	1.51	20
46i	BFI	100	1.5	20
47i	BFI	80	1.68	20
48i	BFI	100	1.72	20
49i	BFI	100	1.62	20
50i	BFI	100	1.43	20

### **VIII.3.3.2. Análisis Metagenómico en muestras de intestino de camarón**

Las muestras de ADN bacteriano de los intestinos de camarón blanco, de los diferentes tratamientos, secuenciadas, dieron lugar a una base de datos de secuencias del gen 16S rRNA bacteriano con un tamaño de entre 250-280 pares de bases y con lecturas de (I-250-L280), el ensamblado (Data Base Project) relizado con un error máximo esperado ajustado de Q score mayor de 25, nos permitió seleccionar secuencias con calidad alta, agrupadas a 97% de similitud de secuencia por CD-HIT (4.6.1) de acuerdo con Fu *et al.*(2012) e identificar las unidades taxonómicas operaciones únicas (OTUs) y su abundancia en cada muestra.

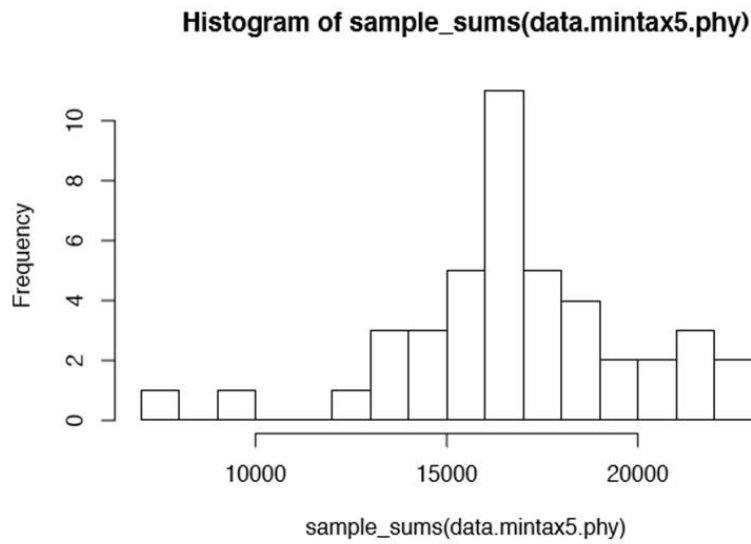
Despues de unir los tres objetos principales: tabla de OTUs, Taxa y metadatos en un solo objeto Phyloseq, el análisis realizado mostró los siguientes resultados.

### **VIII.3.3.3 Cobertura y profundidad**

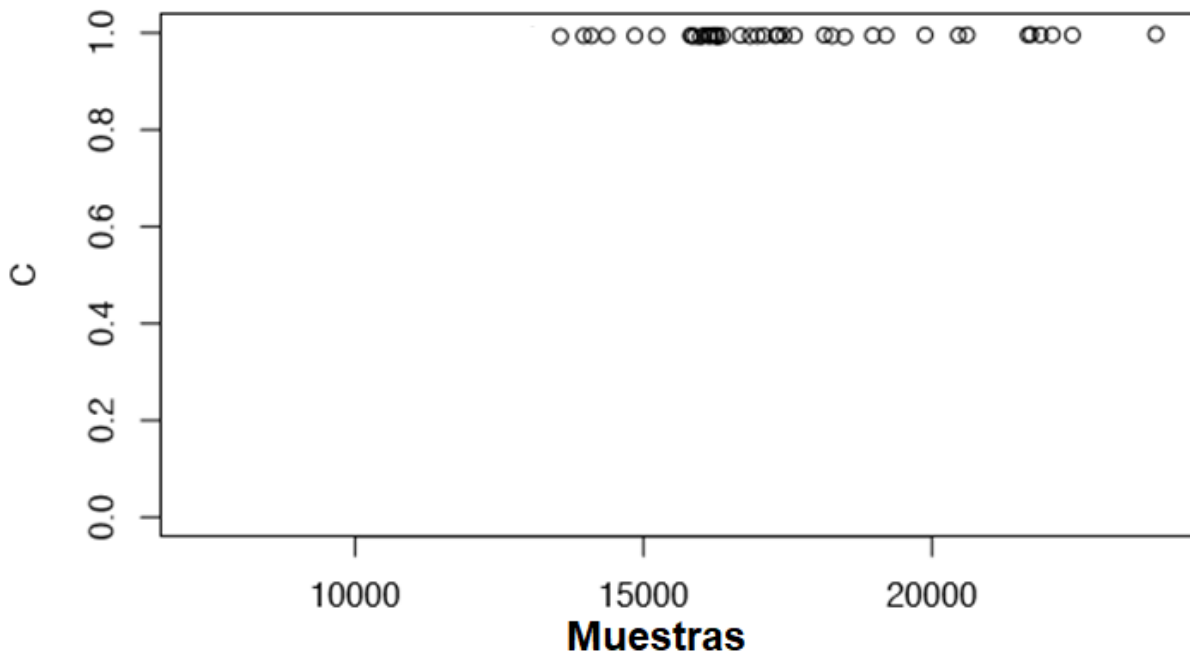
Los resultados del análisis de la profundidad de secuenciación y cobertura se observan en la Figura 26 A y B. En A) se muestra un histograma donde se observa la distribución de la profundidad de secuenciación de cada muestra, algunas muestras presentan un menor numero de secuencias y una baja frecuencia, de profundidad, la mayoría de las muestras obtuvieron ~17k de secuencias.

Tomando en cuenta que la determinación de C esta basada en que tantas OTUs con solo una cuenta (singleton) hay en una muestra, y que por lo tanto cuando la profundidad de secuenciación es baja, puede dar una cobertura buena pero falsa, se graficó la cobertura contra profundidad de secuenciación, Figura 26 A y B. Para evitar un sesgo en el análisis de comunidades, debido al número de secuencias por muestra y cobertura de cada OTU, se emplearon para el análisis las muestras con secuencias mayores a 10 K y se excluyeron 4 muestras para obtener la mejor cobertura y/o mayor profundidad de secuenciación (Figura 26B). En esta figura se observa que las muestras consideradas para el análisis tienen igual cobertura y estan en el rango de profundidad aceptable.

A)



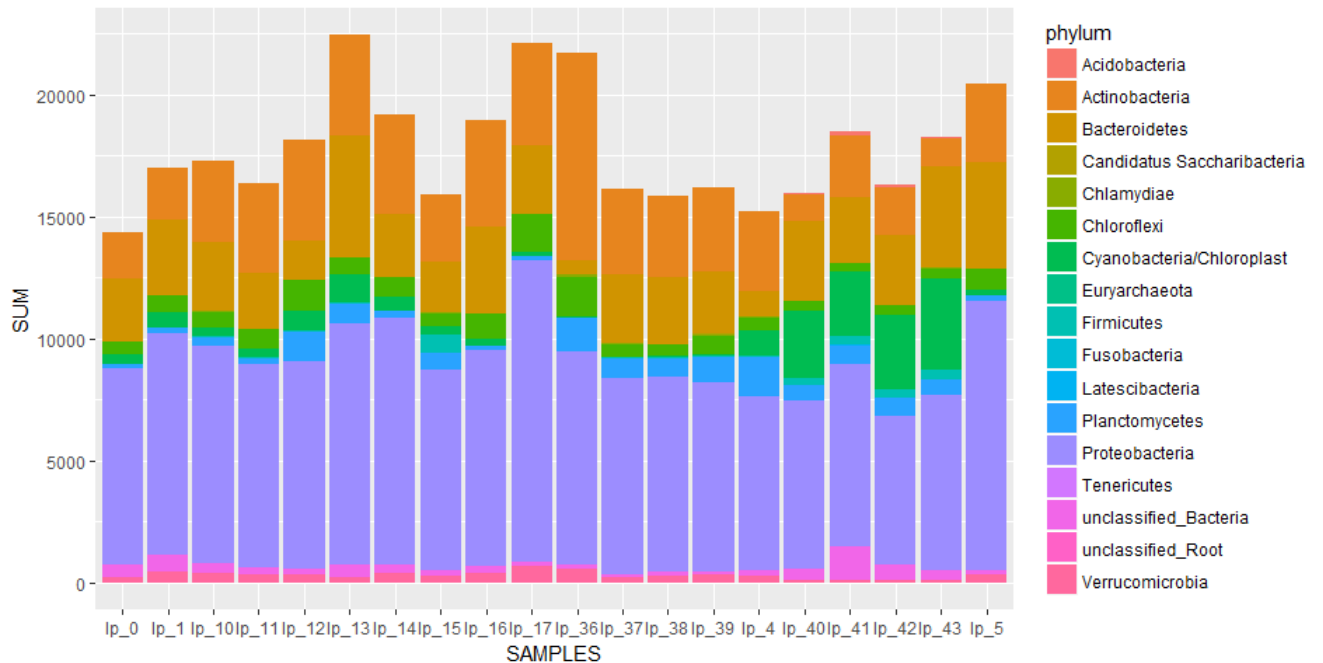
B)



**Figura 26.** Cobertura vs profundidad de secuenciación, A) Distribución de la profundidad de secuenciación de cada muestra. B) Rango de cobertura y profundidad de las muestras aceptables para el análisis.

### VIII.3.3.4. Composición de la comunidad bacteriana del intestino de camarón en cultivo hiperintensivo con biofloc

Los resultados de las 40 muestras de intestino de camarón analizadas, mostraron una representación de 17 phylum: Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Candidatus Saccharibacteria, Chlamydiae, Chloroflexi, Cyanobactrias/Cloroplast, Euryarchaeota, Firmicutes, Fusobacteria, Latescibacteria, Planctomycetes, Proteobacteria, Tenericutes, y Verrucomicrobia, los cuales fueron considerados para el análisis metagenómico por presentar la mejor cobertura y profundidad, Figura 27.



**Figura 27.** Secuencias de OTUS obtenidos > a 10000 K en las muestras analizadas, mostrando 17 phylum.

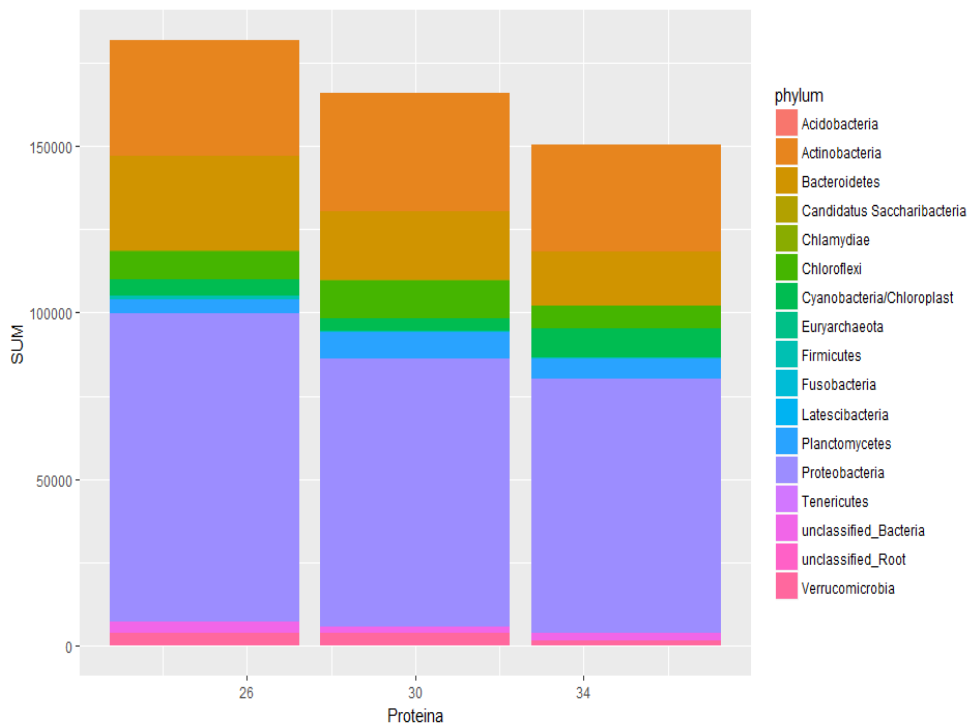
Como se observa en la figura 27, el phylum mayormente representado en todas las muestras, es Proteobacteria, seguido de Bacteroidetes y Actinobacteria. Es importante hacer notar la presencia de Cyanobacteria que es una de las procariontas más diversas y ampliamente distribuidas, ocupando muchos nichos con habitats terrestres, planctónico y bénticos. Tienen una amplia heterogeneidad, pueden ser fotosintéticas o no, de vida libre, simbióticas, tóxicas y predadoras, etc.

Planctomycetes, phylum al que pertenece la familia planctomycetes, que son bacterias anaeróbicas autótrofas que pueden oxidar amonio a dinitrógeno sin oxígeno y juegan una parte importante en el ciclo global de nitrógeno. Firmicutes es un phylum que representa la porción más grande del microbioma de tracto gastrointestinal de humanos y ratones y ahora sabemos esta presente en camarones.



### VIII.3.3.5. Efecto de la variación de la concentración de proteína de la dieta en la comunidad bacteriana intestinal de camarón cultivado con biofloc

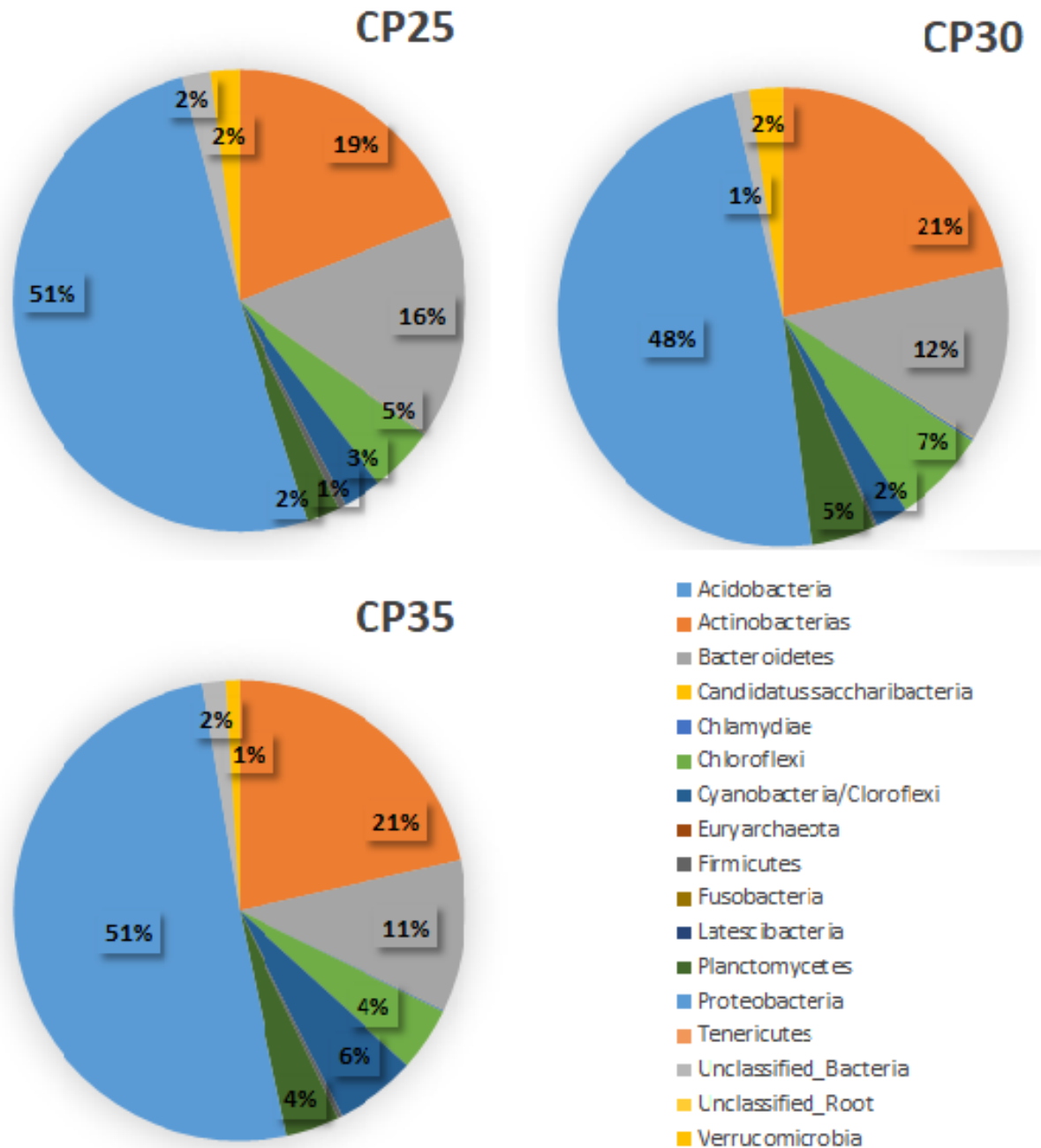
Las comunidades bacterianas que habitan el intestino de camarones cultivados en un sistema con biofloc inducido con microalgas y probiótico, y alimentados con dietas de diferente concentración de proteína, variaron en abundancia, Figura 28. Una mayor abundancia se observó en el intestino de camarones del tratamiento CP25, y a medida que aumentó la concentración de proteína (CP35), la abundancia de bacterias encontradas en los intestinos de los camarones disminuyó. El análisis también reveló que la comunidad bacteriana intestinal asociada a las dietas de CP25 y CP30 presentó más similitud entre estas por las cantidades de las secuencias de los OTUs, que la comunidad bacteriana de CP35 como lo muestra la Figura 28, las diferencias son descritas con las abundancias relativas que se indican a continuación.



**Figura 28.** Abundancia de OTUs en los intestinos de camarón *P. Vannamei* alimentado con biofloc inducido con microalgas; *Schizochytrium* sp., *Grammatophora* sp., y *Navicula* sp., y probiótico *L. fermentum* TD9 (BFI) bajo tres tratamientos con diferente concentración de proteína 25%, 30% y 35%.

### VIII.3.3.6. Abundancia relativa

El phylum Proteobacteria fue el más abundante con 50.83% y se presentó en el tratamiento CP25. Le siguió con 48.45% el tratamiento CP30 y con 50.73% en CP35. Actinobacteria fue el segundo phylum en abundancia en los tres tratamientos, el 19.10% en CP25, 21.47% en CP30 y 21.46% en CP35. Bacteroidetes fue el tercer grupo más abundante también, en los tres tratamientos, en CP25 la abundancia fue de 15.62%, en CP30 de 12.36%, mientras que en CP35 fue de 10.62%. Cloroflexi fue el cuarto grupo más abundante con 4.61% y 6.76% en CP25 y CP30 respectivamente, mientras que en el CP35 el cuarto grupo más abundante con 5.81% fue Cyanobacteria/Cloroflexi, este mismo phylum se presentó en el quinto lugar más abundante en CP25 y CP30 en un 2.32% y 4.66% respectivamente. Plactomicetes es el séptimo phylum en CP25 CP30 y CP35 avarcando el 2.32%, 4.66% y 3.79% respectivamente. Verrucomicrobia es un sexto phylum en abundancia en CP25 y CP30 con 2.05% y 2.35%, mientras que en CP35 el valor fue de 0.98%. Los resultados en los menores porcentajes esta *Firmicutes* con valores de 0.53%, 0.19% y 0.31% en CP25, CP30 y CP35 respectivamente. En los tres tratamientos se encuentran los menores porcentajes de *Chlamidiae* > a 0.17%, *Candidatus* > a 0.07%, y *Fusobacterias* > 0.002% (Figura 29).



**Figura 29.** Abundancia relativa de las OTUs, en camarón *P. Vannamei* cultivados en biofloc inducido con microalgas; *Schizochytrium* sp., *Grammatophora* sp., y *Navicula* sp., y el probiótico *L. fermentum* TD9. Siendo CP la variación de concentración de proteína 25%, 30% y 35% en la dieta.

**VIII.3.3.7. Comunidades bacterianas con respecto a los parámetros zootécnicos**

Los resultados del análisis estadístico al comparar las comunidades bacterianas que habitan el intestino de los camarones en los tratamientos evaluados, mostraron diferencias con respecto a las CP, nitratos, peso final, pH, y salinidad, la diferencia fue significativa entre los tres grupos con  $p < 0.01$  (Tabla 13).

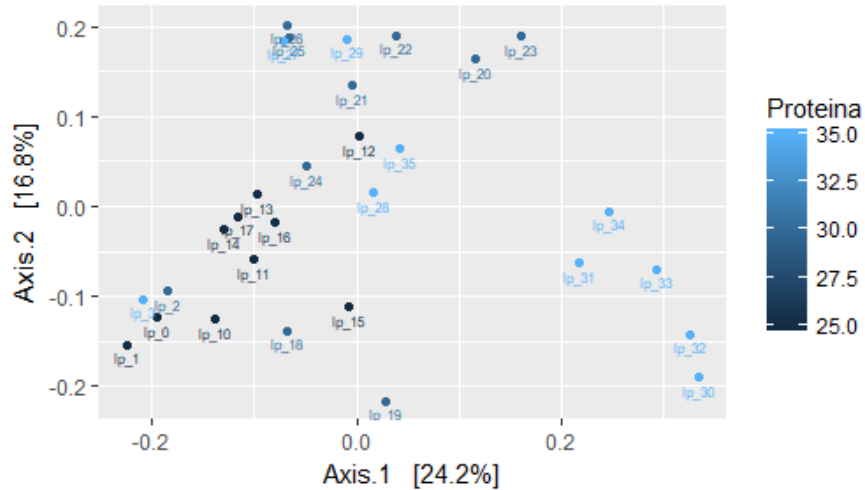
**Tabla 13.** Valores de P-leven obtenidos al comparar las comunidades bacterianas de los tres tratamientos CP25, CP30 y CP35, con respecto a los factores evaluados.

Factor evaluado	Pr(>F)
Proteína	0.0004***
Amonio	0.0009 ***
Nitritos	0.1362
Nitratos	0.0128 *
Peso	0.0008 ***
Biofloc	0.0722
pH	0.0009***
Salinidad	0.0011**
Temperatura	0.1551

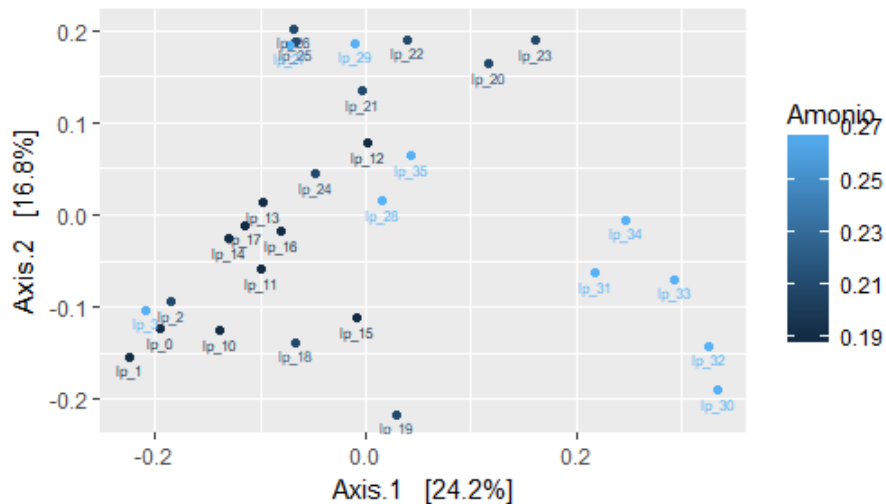
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

El Análisis de componentes principales (PCoA) mostro la agrupación de las comunidades bacterianas del intestino de los camarones dentro de cada tratamiento y su interacción entre tratamientos. El análisis sugiere una mayor cercanía entre las comunidades pertenecientes a los tratamientos CP25 y CP30 con respecto al eje X que corresponde a la componente principal 1(PC1). La matriz de similitud obtenida de las muestras por PCoA fue con PC1= 24.2% y para la componente principal 2 (PC2)= 12.8%, el análisis indica una mayor separación de los grupos en el eje X y un mayor traslape entre las muestras de las comunidades bacterianas en el eje Y correspondiente al PC2. Las muestras de cada grupo se agruparon más cerca que los intergrupales, teniendo CP25 y CP30 más cercanos que CP35. Las muestras pertenecientes al tratamiento PC35 se encuentra más alejadas, incluso en el cuadrante opuesto en relación con el CP25, siendo más diferente cuando se evaluaron con respecto a la concentración de proteína, amonio y pH (Figuras 30, 31 y 32). Los resultados obtenidos con respecto al parámetro peso final también se observó un

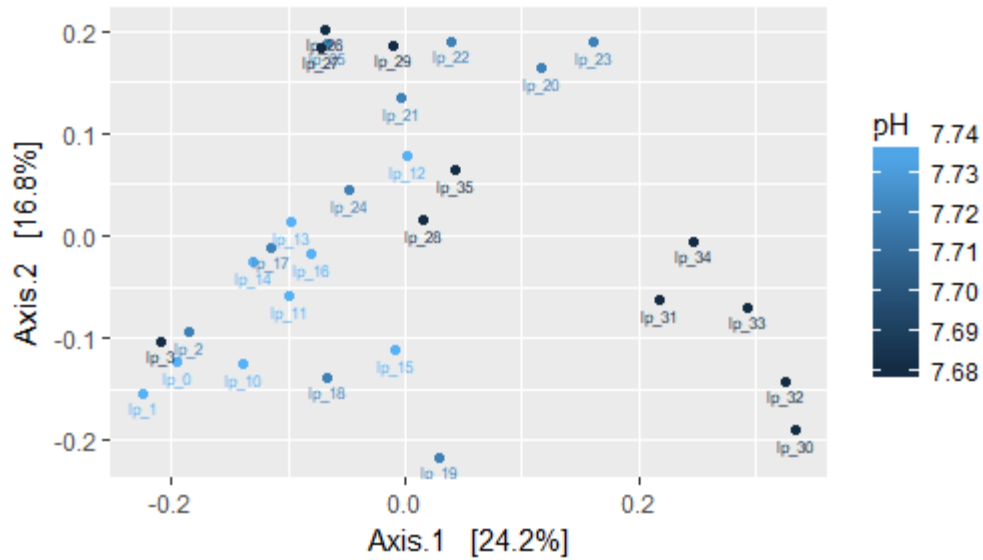
traslape entre los tratamientos, aunque tienen pesos más similares CP30 y CP35, como se muestra en la Figura 33.



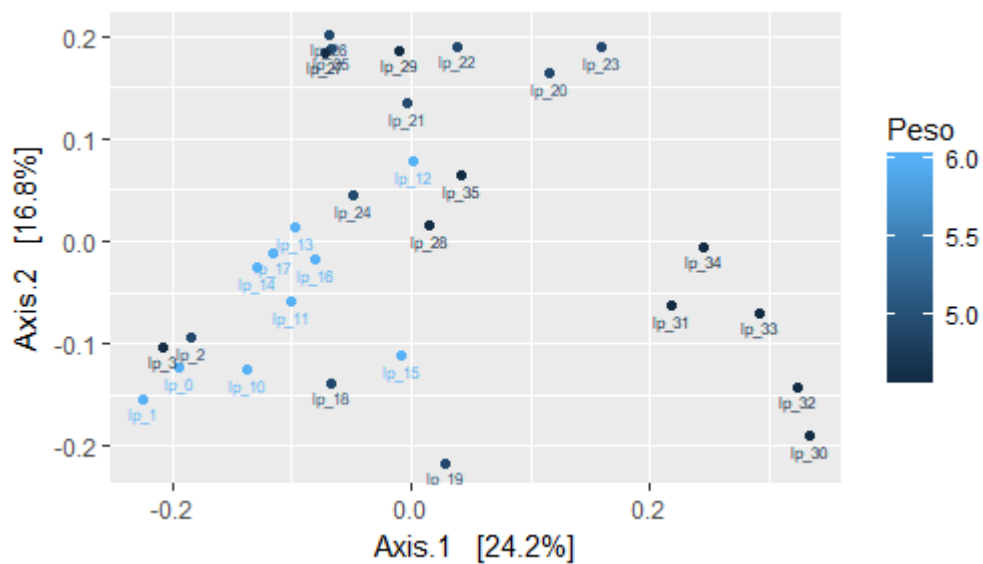
**Figura 30.** Análisis de componentes principales (PCoA) de la interacción entre comunidades bacterianas de intestino de camarón *P. vannamei* cultivados en biofloc con respecto al tratamiento. CP25 (muestras lp\_0, 1,10-17) y CP30 (muestras lp\_2,18-26) presentaron mayor cercanía que CP35 (muestras lp\_3, 27-35).



**Figura 31.** Análisis de componentes principales (PCoA) de la interacción entre comunidades bacterianas de intestino de camarón *P. vannamei* cultivados en biofloc con respecto a su concentración de amonio. CP25 (muestras lp\_0,1, 10-17) y CP30 (muestras lp\_2,18-26) mostraron mayor cercanía que CP35 (muestras lp\_3,27-35).



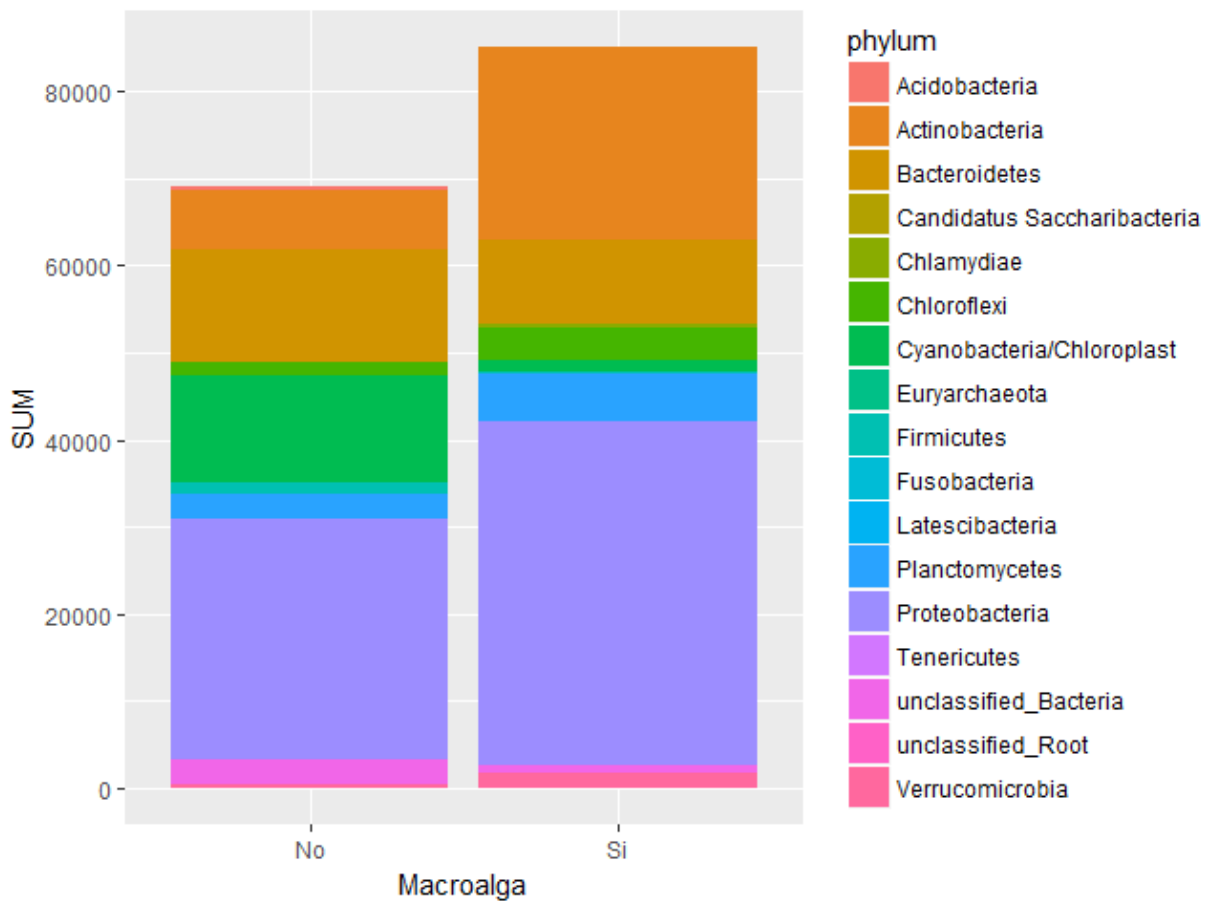
**Figura 32.** Análisis de componentes principales (PCoA) de la interacción entre comunidades bacterianas de intestino de camarón *P. vannamei* cultivados en biofloc con respecto a su pH. CP25 (muestras Ip\_0, 1, 10-17), CP30 (muestras Ip\_2,18-26) y CP35 (muestras Ip\_3,27-35).



**Figura 33.** Análisis de componentes principales (PCoA) de la interacción entre comunidades bacterianas de intestino de camarón *P. vannamei* cultivados en biofloc con respecto a su peso. CP25 (muestras Ip\_0, 1,10-17), CP30 (muestras Ip\_2,18-26) y CP35 (muestras Ip\_3,27-35).

**VIII.3.3.8. Efecto de la adición de macroalga en la comunidad bacteriana intestinal de camarón cultivado con biofloc**

Los resultados mostraron que la abundancia de OTUs en los phylum dominantes del intestino de camarón cultivado con sistema de biofloc inducido fueron mas abundantes en el tratamiento con la adición de las macroalgas que en el tratamiento sin adición, Figura 34, ambos tratamientos muestran diferencias significativas en ciertos phylum de sus comunidades bacterianas como se muestra en la tabla 14 y anexo 10 de las tablas de los resultados de las pruebas de Tukey.



**Figura 34.** Abundancia de las OTUs en las comunidades bacterianas de camarón *P. Vannamei* alimentado con biofloc inducido con microalgas y probióticos (BFI) y biofloc inducido más las macroalgas *Ulva* spp y *Gracilaria* spp (BFIM).

**Tabla 14.** Phylum en las comunidades bacterianas del intestino de camarón cultivado en un sistema con biofloc inducido con microalgas; *Schizochytrium* sp., *Grammatophora* sp., y *Navicula* sp., y el probiótico *L. fermentum* TD9 (BFI) y más macroalgas *Ulva* y *Gracilaria* (BFIM) que mostraron diferencia significativa al comparar los tratamientos.

	Pr(>F)
<b>Acidobacteria</b>	0.0000
<b>Chlamydiae</b>	0.0000838 ***
<b>Cyanobacteria/Chloroplast</b>	6.93E-06 ***
<b>Euryarchaeota</b>	2.20E-16 ***
<b>Firmicutes</b>	2.20E-156 **
<b>Latescibacteria</b>	1.180595 -e7**
<b>Planctomycetes</b>	0.0038451
<b>Tenericutes</b>	2.254***
<b>Verucomicrobia</b>	0.007545**

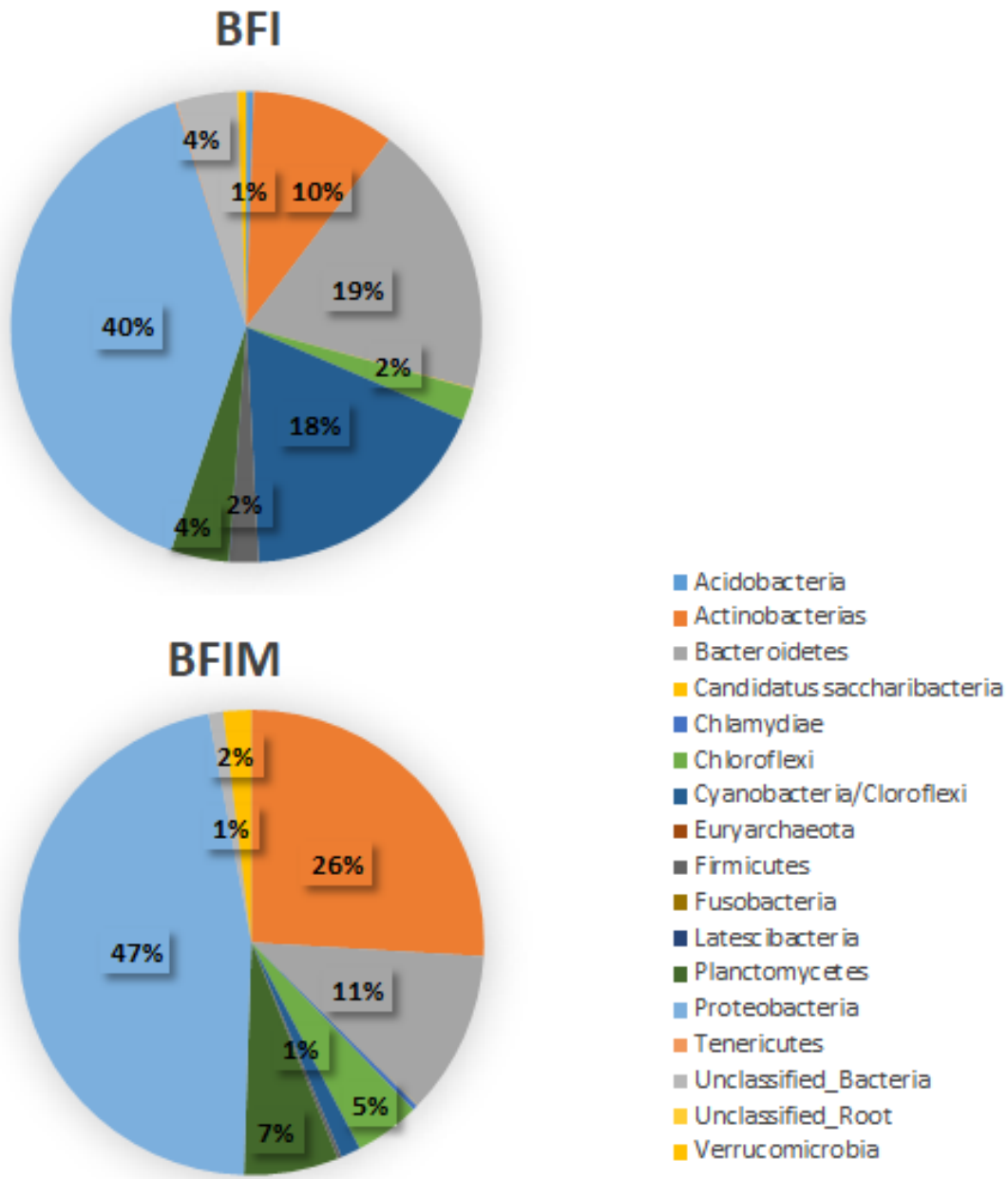
Signif. codes: 0 '\*\*\*\*' 0.001 '\*\*\*' 0.01 '\*\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

### VIII.3.3.9. Abundancia relativa

El phylum Proteobacteria fue el más abundante, con respecto a los demás phylum, representó una abundancia relativa de 39.94% en el tratamiento BFI y de 46.54 % en BFIM. Mientras que los phylum Actinobacteria con un 9.8% en BFI y 25.4% en BFIM. Bacteroidetes presentaron una abundancia relativa de 18.8% en BFI y 11.4% en BFIM.

Otros seis phylum se posicionaron en las mayores abundancias relativas entre el 10% y 1%, solo en el tratamiento BFI Cyanobacteria/Chloreflexi 17.7%, ya que Unclassified Bacteria fue de 4.10%, Plactomycetes 3.9% y Cloreflexi 2.1%, Firmicute 1.95% Verrumicrobia 0.57%, mientras que en el BFIM se encontraron, Cyanobacteria/Chloreflexi en menor cantidad con 1.4%, plactomycetes 6.5%, Chloreflexi 4.5% y Verrumicrobia 1.9%. Los mínimos en ambos tratamientos con valores > a 0.1% fueron Tenericutes, Latescibacteria y para Fusobacterias > a 0.002% (Figura 35).





**Figura 35.** Abundancia relativa de las comunidades bacterianas del intestino de camarones *P. Vannamei* cultivados con biofloc inducido con microalgas; *Schizochytrium* sp., *Grammatophora* sp., y *Navicula* sp., y el probiótico *L. fermentum* TD9 (BFI) y con el biofloc inducido más macroalgas (BFIM).

### VIII.3.3.10. Análisis de las comunidades bacterianas con respecto a los parámetros zootécnicos de los tratamientos adicionados o no con macroalgas

El análisis de las comunidades bacterianas de los intestinos de camarones de los tratamientos con o sin macroalgas mostró diferencias significativas con respecto a las concentraciones de nitritos, nitratos, amonio, peso y adición de macroalga. Las comunidades bacterianas variaron con respecto a los parámetros mencionados, con diferencia significativa entre los dos tratamientos con  $p < 0.05$  (Tabla 15).

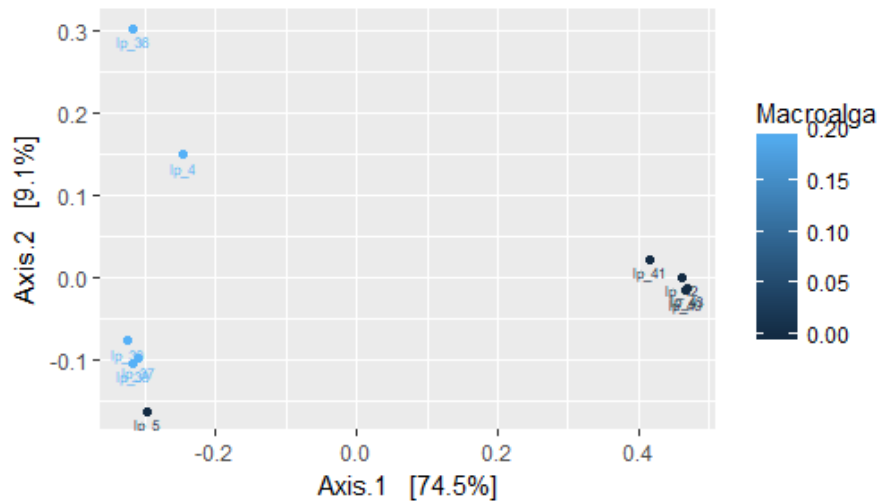
**Tabla 15.** Valores de P-leven al comparar las comunidades bacterianas de un cultivo con biofloc y macroalga y otro sin macroalga, con diferencia significativa  $p < 0.05$ .

	Pr(>F)
<b>Amonio</b>	0.0180 *
<b>Nitratos</b>	0.0176 *
<b>Nitritos</b>	0.0155 *
<b>pH</b>	0.0150 *
<b>Peso</b>	0.0134 *
<b>Biofloc</b>	0.0180 *
<b>Macroalga</b>	0.0172 *

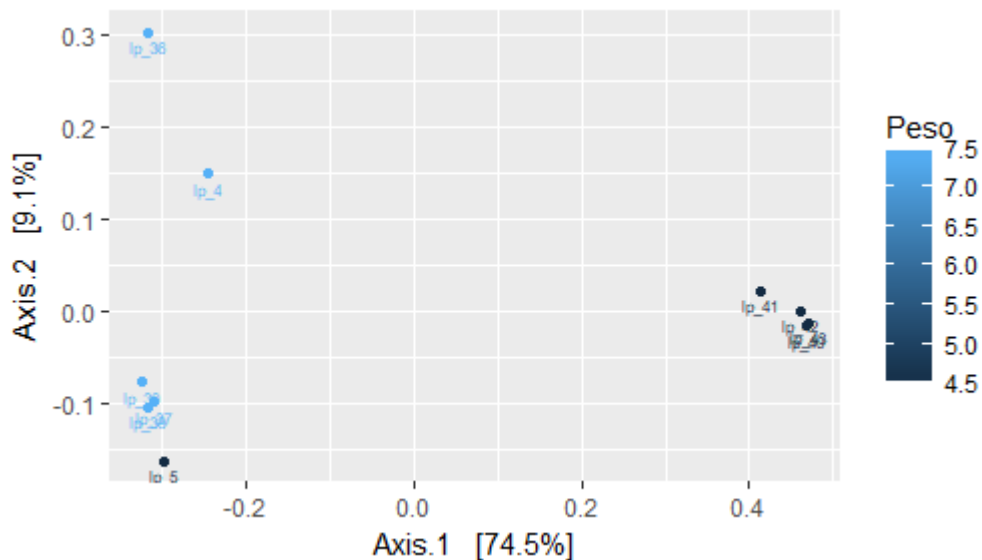
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

La separación de estos dos grupos se muestra en el análisis de componentes principales (PCoA), donde las comunidades bacterianas del intestino de camarón están diferenciadas, lo cual indica que existe una mayor similitud dentro de cada tratamiento en los diferentes parámetros evaluados como se muestra en las Figuras 36 y 37. Así mismo se observaron bien diferenciadas las comunidades de los dos tratamientos. Los resultados de este análisis mostraron mayor diferencia que el análisis realizado al comparar los tratamientos con las tres concentraciones de proteína. La Matriz de similitud obtenida de las muestras de los dos tratamientos BFI y BFIM por PCoA fue para la componente principal 1 (PC1) = 74.5% que es mayor a la componente principal 2 (PC2) = 9.1%, por lo tanto el análisis indica una mayor separación de los grupos de las muestras de las comunidades microbianas en el eje X de 74.5%. Estos resultados indican que, al adicionar la macroalga en el cultivo de camarón blanco, obtenemos diferencias en sus comunidades microbianas del intestino

de 74.5% (Figura 36), además también lo podemos explicar respecto al peso que es diferente entre ambos tratamientos Figura 37.

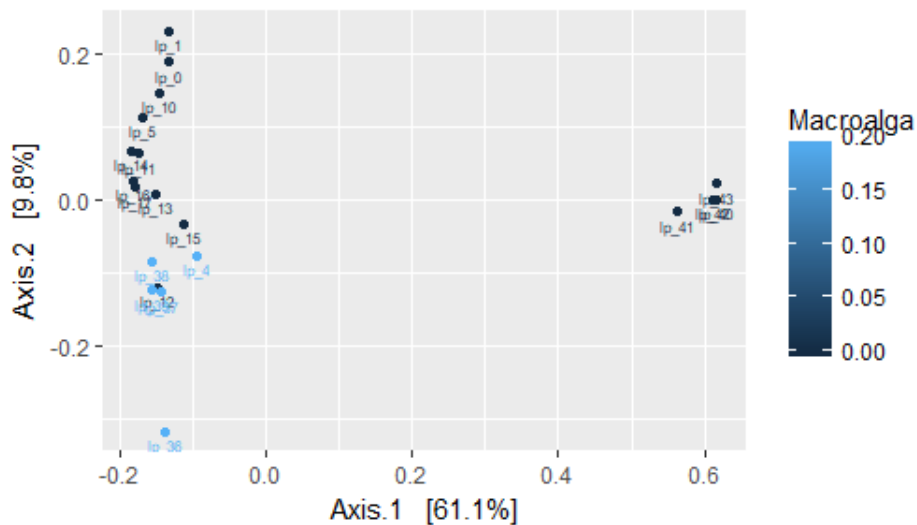


**Figura 36.** Análisis de componentes principales (PCoA) de las comunidades bacterianas de intestino de camarón *P. vannamei* cultivados en biofloc respecto a su concentración de macroalga. BFI sin macroalgas (muestras Ip\_5, 40-43) y BFIM con macroalgas (muestras Ip\_4, 36-39).

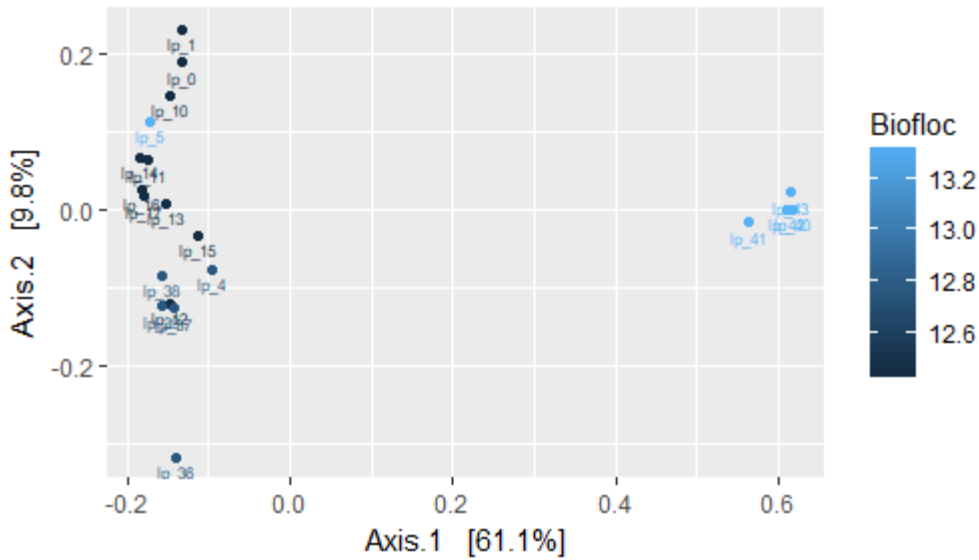


**Figura 37.** Análisis de componentes principales (PCoA) de las comunidades bacterianas de intestino de *P. vannamei* cultivados en biofloc respecto al peso obtenido. BFI sin macroalgas (muestras Ip\_5,40- 43) y BFIM con macroalgas (muestras Ip\_4, 36-39).

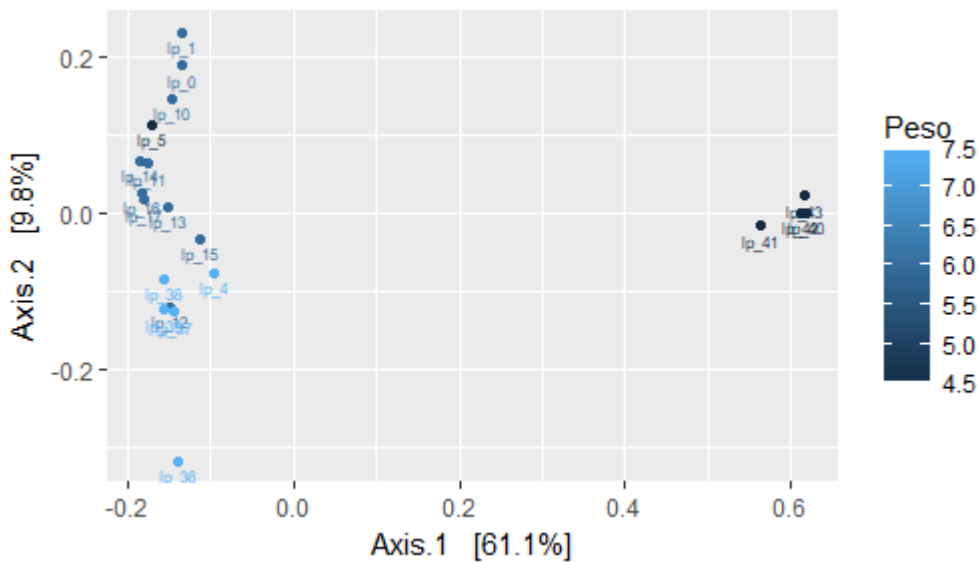
Es importante hacer notar que el tratamiento con la adición de la macroalga mostró diferencias claras con respecto al tratamiento CP25, el cual empleo el mismo nivel de proteína, pero con la diferencia de ser un cultivo de mayor volumen. Los resultados de PCoA sugieren una mayor similitud entre las comunidades bacterianas de los camarones de BFIM y CP25, donde ambos experimentos tuvieron los mejores crecimientos. Al incluir CP25 en el análisis tenemos una matriz de similitud de las muestras en la componente principal 1(CP1) = 61.1, en este eje X, el tratamiento con macroalgas BFIM y CP25 estas en un extremo opuesto al tratamiento sin macroalgas BFI. Aunque BFIM Y CP25 son similares con respecto a PC1 su variabilidad se puede separar en dos tratamientos con las componentes principales 2(CP) que solo explica un 9.8% como se observa en las Figuras 38, 39 y 40 que corresponde a las agrupaciones respecto a macroalga, biofloc y peso.



**Figura 38.** Análisis de componentes principales (PCoA) de las comunidades bacterianas de intestino de *P. vannamei* cultivados en biofloc respecto a la concentración de macroalga agregada. CP25 (muestras Ip\_0, 1,10-17), BFI sin macroalgas (muestras Ip\_5, 40-43) y BFIM con macroalgas (muestras Ip\_4, 36-39).



**Figura 39.** Análisis de componentes principales (PCoA) de las comunidades bacterianas de intestino de *P. vannamei* cultivados en biofloc respecto a a la concentración del volumen de Biofloc. CP25 (muestras Ip\_0, 1, 10-17), BFI sin macroalgas (muestras Ip\_5, 40-43) y BFIM con macroalgas (muestras Ip\_4, 36-39).



**Figura 40.** Análisis de componentes principales (PCoA) de las comunidades bacterianas de intestino de *P. vannamei* cultivados en biofloc respecto a a los pesos del camarón. CP25 (muestras Ip\_0, 1, 10-17), BFI sin macroalgas (muestras Ip\_5, 40-43) y BFIM con macroalgas (muestras Ip\_4, 36-39).

## VIII. 4. DISCUSIÓN

### VIII. 4. 1. Benéficos de la adición de macroalgas al biofloc inducido

En esta investigación, se muestran los beneficios que aportan las macroalgas al biofloc inducido por obtener mejores parámetros zootécnicos. Es conocido que las algas marinas son importantes en el mantenimiento y la expansión de la acuicultura marina sostenible (Chopin *et al.*, 2001 y Neori, 2008). Las macroalgas son incorporadas en cultivos de camarón por mejorar la calidad nutricional (Brito *et al.*, 2014a y Wong *et al.*, 2000). En el caso del grupo de clorofitas, como la *Ulva* adicionada en este estudio, existe información que sugiere la adición de *Ulva clathrata*, la cual mantiene la calidad del agua con bajas concentraciones de amonio y fosfatos en cultivos con diferentes densidades de camarón (Peña-Rodríguez *et al.*, 2017) con lo cual puede reducir el recambio de agua a un 10%. Los resultados obtenidos en todos los tratamientos con biofloc inducido están de acuerdo con este reporte, sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron en los cultivos adicionados con macroalgas. Anteriormente se describieron los beneficios del sistema de cultivo con el biofloc inducido con microalgas y probiótico donde se destaca el mantenimiento de las concentraciones de los compuestos nitrogenados adecuadas, ahora mencionamos que la adición de las macroalgas mejora dicha calidad del agua relacionada con la concentración de compuestos nitrogenados.

En este último experimento se pudo no realizar recambios de agua con este sistema de biofloc inducido más macroalgas, porque los compuestos nitrogenados no alcanzaron los niveles tóxicos (Cobo, 2014 y Chang, 2015), los recambios de agua se realizaron al 5%, tomando en cuenta la evaporación e incremento de la salinidad. El tratamiento **BFIM** obtuvo los valores más bajos de amonio, nitrito y nitratos, lo cual sugiere que las macroalgas tienen un papel importante en la limpieza de materia orgánica del agua como ha sido descrito (Samocho *et al.*, 2015). En esta investigación se adicionaron juntas las macroalgas *Ulva* y *Gracilaria*, y no se evaluaron por separado para conocer cual macroalga ayuda en la calidad del agua para mantener bajos los valores de los compuestos nitrogenados. Sin embargo, en una investigación alterna realizada (Ruiz Cortés, 2019), se evaluó el sistema hiperintensivo de camarón blanco con la adición de diferentes cantidades y especies de macroalgas y se reportó que los

niveles más bajos de amonio durante todo el experimento fueron para un tratamiento con las macroalgas *U. lactuca* y *U. clathrata*, lo cual sugiere que las Ulvas agregadas en nuestro experimento tienen esta principal función en comparación con *Gracilaria*.

Resultados obtenidos en un estudio donde implementaron 28 días de experimento con *P. vannamei* en un biofloc y evaluaron la adición de *Gracilaria birdiae* y *Gracilaria domingensis* en cultivos de 425 camarones m<sup>3</sup>, adicionando 2 Kg m<sup>3</sup> de *Gracilaria* (Brito *et al.*, 2014a), mostraron buen crecimiento del camarón y concentraciones adecuadas de amonio, nitritos y nitratos (0.10, 0.5 y 1.64 mL<sup>-1</sup>), las cuales son semejantes a las obtenidas en esta investigación, sin embargo ellos mantuvieron mortalidades por partículas suspendidas que afectaron la respiración en branquias de los camarones y en nuestro caso no se observó esta mortalidad, ya que el biofloc propuesto **BFIM** incluyo además de *Gracilaria* spp, *Ulva* spp, esta última, sugerida como un biofiltro (Neori *et al.*,1991). Macroalgas *Ulva*les que son de importancia en esta investigación, tienen alta tolerancia y afinidad a la absorción de amonio (Lehnberg y Schramm, 1984), su morfología proporciona área superficial al volumen y tejido fotosintético a la estructura; (Littler y Littler 1980) y presenta altas tasas de crecimiento específico. El uso de *Ulva lactuca* en sistemas biológicos redujo los sólidos totales suspendidos en un 12.9% (Brito *et al.*, 2014b). *Ulva clathrata* fue altamente eficiente en la eliminación de los principales nutrientes inorgánicos, eliminando 70-82% del nitrógeno de amonio total TAN en 15 h, lo cual ayudó en el crecimiento del fitoplancton y la asimilación de residuos por las bacterias (Copertino *et al.*, 2009). En esta investigación, el género *Ulva* no solo sirvió como biofiltro sino además proporcionó nutrientes importantes para el camarón y para la comunidad microbiana del biofloc. Estudios previos realizados con estas macroalgas de la región en cultivos hiperintensivos con biofloc, señalaron su calidad nutritiva y el nivel de proteína con el valor más alto de *U. clathrata* 16.67%, seguida de *U. Lactuca* 5.63%, *Gracilaria* 6.33% y *U. intestinalis* 3.14% (Ruiz Cortés, 2019). Lo anterior sugiere que las macroalgas *Ulva*les además de asimilar residuos inorgánicos, proporcionan nutrientes y de acuerdo a los resultados en esta investigación se mejoró la sobrevivencia, crecimiento, y FCA en **BFIM**, si bien no se realizaron análisis bromatológicos del biofloc inducido con macroalgas, en el estudio de Ruiz Cortés,

2019, que incluye las macroalgas evaluadas en esta investigación muestra que aportan un 29.19% de proteína al adicionar el 2% de macroalgas de acuerdo al peso del camarón, dato similar al empleado en este estudio.

La adición de las macroalgas se ha estudiado ampliamente y se han señalado los benéficos que le proporciona a la acuicultura, sin embargo, se han encontrado pocos estudios que describan a profundidad su participación en el mejoramiento o selección de la microbiota del cultivo, la cual es de gran interés en estudios para la acuicultura (Martínez-Cordoba, 2017). Es importante contar con comunidades de bacterias productoras de sustancias importantes o por intervenir en los procesos para mantener un biofloc ideal con mayor número de bacterias benéficas al sistema.

Referente al grupo de bacterias no benéficas, los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que bajas concentraciones del genero *Vibrio* spp. no perjudica al cultivo. El tratamiento **BFI** que no incluye macroalgas, pero si probiótico muestra como su adición puede bajar la concentración del *Vibrio*, pero el **BFIM** mantuvo durante todo el cultivo baja y constante la concentración de esta bacteria en el agua del biofloc, desde los primeros días de cultivo. Esta baja concentración de *Vibrio* en BFIM, se puede atribuir a *Gracilaria* que tiene antecedentes por generar sustancias antimicrobianas, (Samocho *et al.*, 2015), lo cual sugiere que el BFIM tiene las mejores características deseables con mínimas bacterias patógenas al incorporar la macroalga *Gracilaria*. Un estudio donde se incorporó de 2.5 y 5 kg de peso húmedo m<sup>3</sup> de algas redujo las densidades de *Vibrio* en un 54 a 83% (Brito *et al.*, 2016). Los componentes bioactivos producidos por algas como son los b-glucanos, carotenoides, tocoferoles, polifenoles y polisacáridos promueven la bioactividad contra *Vibrio* (Peso-Echarri *et al.*, 2012 y Silva *et al.*, 2013). Los resultados del análisis microbiológico del agua de biofloc del cultivo de camarón, reportados como UFC/ml, confirmaron que la presencia de macroalgas confiere una ventaja al cultivo, la seguridad sanitaria y una mejor sobrevivencia. El contabilizar baja concentración de *Vibrio* durante todo el experimento nos permite sugerir que el cultivo con biofloc inducido y con macroalgas excluye al género *Vibrio* en general que incluye las especies *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus* y *V. splendidus*, las cuales son peligrosas y



causan mortalidad. Cuando llegan a encontrarse en altas concentraciones colonizan el hepatopáncreas del camarón, lo que puede dar como resultado un bajo crecimiento y una FCR más alto, porque el camarón consume más alimento y presenta un comportamiento modificado u otra respuesta fisiológica (Helena *et al.*, 2009), o incluso una alta mortalidad, en esta investigación se observó el caso contrario, un alto crecimiento en **BFIM** desde la primer semana de la adición de la macroalga.

Estudios en inclusión de alimentos balanceados con estas mismas macroalgas no indicaron los mejores resultados en crecimiento (Rodríguez -González *et al.*, 2014) como los obtenidos en este estudio. *Gracilaria* y *Ulva* son dos algas dominantes en la bahía del Golfo de California (Piñon-Gimate *et al.*, 2008), y se han considerado candidatas de forma natural para ayudar en la homeostasis de la salud del camarón, pero faltan estudios que ayuden a comprender como contribuyen estas macroalgas incorporadas al cultivo en la selección de microorganismos que mejoren la calidad del agua, a la eliminación de patógenos y como fuente de nutrientes importantes para el biofloc, se conoce que la adición de macroalgas pueden afectar la riqueza por ejemplo del fitoplancton (Brito *et al.*, 2014a), pero no de comunidades bacterianas, por lo cual en esta investigación se describen las comunidades bacterianas del intestino de camarones cultivados con biofloc inducido y con las dietas que incluyen la variación de concentración de proteína y con la adición de macroalgas.

#### **VIII.4.2. Efecto de la dieta con diferente concentración de proteína en la comunidad bacteriana intestinal de camarón cultivado con biofloc**

Actualmente se conoce la importancia del cultivo de camarón blanco con sistema de biofloc, pero poco se conoce sobre la taxonomía de las comunidades microbianas y más específico las bacterianas que están presentes y los cambios que tienen al variar su alimentación. En los sistemas hiperintensivos, debido a las densidades altas de camarones, los alimentos administrados ricos en proteínas pueden acumularse teniendo efectos no favorables debido a la acumulación de materia orgánica y a un descontrol en la calidad del agua y con un impacto negativo en la estabilidad de la microbiota ambiental, causando estrés al camarón (Zhang *et al.*, 2014a). Además, se conoce que el metabolismo del nitrógeno, esto es, el origen, acción y destino de los compuestos nitrogenados es una precondición y una consecuencia de la nutrición, crecimiento, desarrollo, flujo de energía y ajustes fisiológicos de variables endógenas y exógenas (Rosas *et al.*, 2000).

Las proteínas juegan un papel importante en los sistemas de cultivo del camarón. Se ha indicado la importancia de las proteínas en el biofloc inducido y su aporte, además de los cambios que ocasiona en la calidad del agua, se demostró que, al incrementar la CP del alimento comercial, los compuestos nitrogenados (amonio) se incrementan. Las proteínas residuales en el biofloc inducido deben ser estudiadas con respecto a las comunidades bacterianas, tomando en cuenta que el alimento es transcendental para muchos procesos fisiológicos (Maldonado *et al.*, 2011). En esta investigación, como fue descrito en el capítulo dos, el tratamiento CP35, causó un efecto desfavorable en el crecimiento del camarón, resultados similares a los de esta investigación fueron reportados en porcentajes de 32% pero sugieren el 48% de proteína en sistemas sin el empleo de biofloc (Colvin y Brand 1977), en este estudio se sugiere el 25% más el aporte de proteína del biofloc. En este capítulo analizamos como estos desechos proteicos, influyen en la comunidad bacteriana. La comunidad bacteriana está compuesta por diferentes phylums, donde hay familias o géneros de bacterias que pueden ser benéficos en el sistema de biofloc, como biomasa microbiana que puede ser consumida por microorganismos eucariotas que se encuentran en el

biofloc, y estos finalmente son consumidos por los animales cultivados (Wasielesky *et al.*, 2006; Xu y Pan, 2014).

El biofloc aporta nutrientes con proteína de calidad (Khatoon *et al.*, 2016 y Mohd, Yunos., *et al* 2017), su comunidad bacteriana puede variar dependiendo del porcentaje de proteína en la dieta y de la abundancia de microorganismos en el biofloc. Una adecuada comunidad bacteriana generadora de metabolitos ayuda a la mejor absorción de nutrientes (Qiao *et al.*, 2016 y Xiong *et al.*, 2016).

Las comunidades bacterianas del intestino de *P. vannamei* variaron respecto a las dietas, y al biofloc inducido con microalgas y probiótico, en todos los tratamientos mostraron una mayor dominancia los phylum *Proteobacterias* de 39.94% a 50.83 %, seguidos de *Actinobacterias* de 10% a un 25% y *Bacteroidetes* de 10% a un 15%, lo cual sugiere camarones sanos para todos los tratamientos analizados, de acuerdo a reportes previos en camarones sanos y enfermos, donde sugieren que los camarones enfermos contenían estos phylum bacterianos en bajos porcentajes ( D.M. Zhang *et al.*, 2014a; Huang *et al.*, 2014 y Zhen *et al.*, 2016), también estos estudios encontraron los phylum *Proteobacterias* y *Bacteroidetes* en los camarones sanos en diferentes etapas de su crecimiento, con variación en su abundancia relativa, por lo general cercano a un 50% y en los camarones enfermos valores menores a un 10% de estos phylum bacterianos. Lo cual es congruente con el presente estudio realizado y con los resultados del CP25.

*Proteobacteria* fue el phylum más abundante encontrado en el sistema de biofloc inducido con microalgas y bacterias probióticas en los tratamientos con el CP25, CP30 y CP35. Es clara su presencia en ambientes marinos con abundancias naturales en océanos que constituyen el 79% de la biomasa bacteriana (Battistuzzi and Hedges, 2008), también han sido descritas en ambientes acuícolas marinos para biofloc con importancia para la generación del biofilm en cultivos de camarón (Martínez-Córdova *et al.*, 2015 y Martínez-Córdova *et al.*, 2016). En este estudio las muestras se analizaron cuando el biofloc estaba maduro, al finalizar el experimento y sucedieron procesos semejantes a los que se describen en la activación de lodos por que juegan un rol en procesos complejos del ciclo del carbono, nitrógeno y el azufre

en los ecosistemas acuáticos (Klase *et al.*, 2019; Zhang *et al.* 2015). Los resultados obtenidos de calidad del agua, sugieren porcentajes cercanos al 50% del phylum *Proteobacteria*, también ha sido descrito este phylum en cultivos de camarón con la adición de probiótico en un rango de 49 a 53 % (Huerta- Rabago *et al.*, 2019). En este biofloc inducido con microalgas y probiótico la representación de este phylum fue de 47 a 52 %, el cual puede estar desempeñando actividades metabólicas y estar interviniendo en el ciclo de nutrientes y mineralización de compuestos orgánicos (Kerstens *et al.*, 2006).

*Proteobacteria* es uno de los phylum mas ampliamente estudiado, es extenso y complejo, contiene alrededor de 1300 especies en 384 géneros. Todas están relacionadas desde el punto de vista filogenético, pero son muy variables en cuanto a morfología, fisiología y modo de vida.

Son Gram negativos y están representados todos los tipos nutricionales principales: Fotótrofos, Heterótrofos y Quimiolitotrofos. Incluye muchas especies patógenas. Este phylum se divide en cinco grupos en función de las secuencias del RNAr, y preferencias nutricionales, que son: Alfa *Proteobacteria*, incluye la mayoría de formas oligotróficas. Beta *Proteobacterias*, especies que suelen utilizar sustancias procedentes de la descomposición orgánica anaerobia. Gamma *Proteobacterias*, grupo amplio y complejo de quimiorganotrofos, anaerobios facultativos y fermentadores; también especies aerobias, fotosintéticas y oxidadoras del Azufre. Delta *Proteobacteria*, contiene especies depredadoras, formadoras de cuerpos fructificantes, anaerobias, etc. Epsilon *Proteobacteria*, son las menos numerosas, y a este grupo pertenecen *Campylobacter* y *Helicobacter*.

Por la importancia de este phylum, se sugiere un estudio más profundo para conocer los géneros de bacterias que contribuyen a la eliminación de bacterias patógenas para utilizarlas en el mejoramiento de cultivos. También es importante identificar grupos de bacterias que muestren algún efecto positivo en el cultivo del camarón, y bacterias patógenas, como bacterias que pertenecen a este Phylum, *Pseudomonas* MCCB 102 y MCCB 103 que produjeron resistencia a *V. harveyi* en *Penaeus monodon* (Pai *et al.*, 2010), este grupo de *Proteobacterias* son benéficas y

se encuentran en camarones sanos (Zhen *et al.*, 2016). En particular, el grupo de las beta *Proteobacterias* en las que se incluye el género *Nitrosomonas*, y alfa *Protobacterias* donde se incluye el genero *Nitrobacter* son también importantes porque aseguran el mejor manejo de compuestos nitrogenados, ya que son bacterias quimiolitotóficas que oxidan el amonio a nitritos y nitratos.

El phylum *Actinobacteria* es el segundo grupo en abundancia en los resultados obtenidos, y es de esperar su alta concentración, ya que este grupo de bacterias gram positivas son de ambientes terrestres y acuáticos (Servin *et al.*, 2007), se obtuvieron los mayores porcentajes en abundancia relativa en los tratamientos CP30 y CP35 con 21.5%, mientras que en CP25 fue el tercer grupo con el 19 % de abundancia relativa. Las *Actinobacterias* tienden a ser predominantemente degradadoras de glucosa en anaerobiosis (Ito *et al.*, 2012), y es importante mencionar la variación en la cantidad de melaza administrada a cada tratamiento tomando en cuenta la proporción de C:N, en teoría el tratamiento CP35 contiene más melaza y por lo tanto lo relacionamos con una mayor abundancia de *Actinobacterias* en los intestinos de los camarones donde se lleva a cabo la degradación de nutrientes en condiciones anaerobias para mantener su homeostasis (Binda *et al.*, 2018).

Miembros del phylum *Bacteroidetes* ha colonizado virtualmente todo tipo de habitats en el planeta. Estan entre los grupos mas representados de la microbiota de animales, especialmente en el tracto gastrointestinal, pueden actuar como patógenos y frecuentemente son encontrados en suelo, acéanos y en agua fresca. Este phylum se especializa en la degradación de materia orgánica de alto peso molecular, como proteínas y carbohidratos (Thomas *et al.*, 2011). Es descrito por ser dominante en los cultivos de camarón (Lee *et al.*, 2016 y Huerta- Rabago *et al.*, 2019) y se ha encontrado en sistemas donde puede colonizar sobre partículas microscópicas de materia orgánica (Woebken *et al.*, 2007), en el intestino de camarones se encontró en mayor proporción en CP25 con 15.62% y en CP30 con 12.36% de abundancia relativa, estos resultados podrían estar relacionados con los volúmenes del biofloc obtenido al momento del muestreo que fue de 13.46 mL L<sup>-1</sup> en CP25, 13.33 mL L<sup>-1</sup> en CP30 y 12.86 mL L<sup>-1</sup> en CP35, una mayor proporción de volumen de biofloc proporciona mayor

espacio disponible para colonizar y degradar la materia orgánica proporcionando beneficios en la calidad del agua de CP25, mientras que el CP35 obtuvo un 10.62% de abundancia relativa de Bacteroidetes, con la menor cantidad de volumen, y también diferencias en las concentraciones de compuestos nitrogenados, con lo que este grupo está presente también en relación a las características fisicoquímicas del biofloc inducido o las condiciones de un microambiente de partículas que favorecen su presencia (Huerta- Rabago *et al.*, 2019) .

Estudios indican que en la microbiota de organismos obesos la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* aumenta y que esta proporción disminuye con la pérdida de peso (Zoo *et al.*, 2006). En un estudio en camarones obtienen resultados similares y sugieren esta relación para indicar a organismos obesos (Lanfen *et al.*, 2018) donde señalan que un mayor número de gotas de lípidos puede aumentar el número de *Firmicutes*, intensificando en consecuencia la adsorción de ácidos grasos proporcionalmente (Semova *et al.*, 2012), estos resultados son congruentes con los obtenidos en el tratamiento CP25 que tuvo el mayor porcentaje de *Firmicutes*, y aunque Bacteroidetes no fue el menor porcentaje, su proporción *Firmicutes/Bacteroidetes* fue mayor que en CP30 y CP35, y además, en CP25 se tuvieron los camarones más grandes y mejores parámetros de crecimiento.

Los resultados obtenidos indicaron que la concentración de proteína en el alimento cambia la composición de la comunidad bacteriana en el tracto digestivo del camarón, este estudio es relevante porque hay poca información en cultivos de camarón del efecto de este nutriente sobre la microbiota intestinal de *P. Vannamei*. En un estudio similar en el cual caracterizaron la microbiota intestinal de camarón alimentado con dietas elaboradas con diferentes fuentes de lípidos, encontraron que Proteobacteria dominó en la microbiota del intestino y del agua de cultivo y sugirieron que el ambiente del intestino del hospedero impuso una presión selectiva en el establecimiento de la comunidad microbiana y que la fuente de lípidos con diferente composición en ácidos grasos pudo afectar la composición de la microbiota intestinal de *L. vannamei*. (Zhang *et al.*, 2014b). Esta información y los resultados obtenidos en este trabajo, nos permitieron ver como las dietas adecuadas son importantes para

mejorar el peso y sobrevivencia de los camarones y una gran influencia en la predominancia de ciertos phyllos bacterianos de la microbiota intestinal.

En otro estudio reciente donde variaron los niveles de lípidos en la dieta de juveniles del cangrejo nadador, *Portunus trituberculatus*, reportaron, cierta cantidad y tipo de lípidos que mejoran el crecimiento y la microbiota intestinal, sin embargo en algunos tratamientos contribuyeron a incrementar el phylum Fusobacteria > a 10% donde se encuentran muchas especies de bacterias patógenas (Sun *et al.*, 2018). Este phylum está compuesto por bacterias anaerobias obligadas, gram negativas con lipopolisacaridos en su pared celular, y se relacionan como comensales o patógenos. Es importante mencionar que en esta investigación se observo una escasa presencia de patógenos en todos los tratamientos analizados y sin ningún incremento al variar la proteína. En este estudio Fusobacteria está en menos del 0.001% en los tres tratamientos de cultivo de camarón con biofloc inducido y mayores cantidades en Proteobacteria que pueden describir una actividad favorable en el intestino para el camarón estudiado en este biofloc inducido, se conoce que algunas especies dentro de este phylum Proteobacteria generan metabolitos que contrarrestan el crecimiento de otras bacterias, lo cual es acorde a los resultados obtenidos. En otro reporte, se menciona que en ambientes de cultivo con sedimentos se incrementa el numero de bacterias oportunistas pertenecientes al phylum *Fusobacterias* y generan enfermedades (Sou *et al.*, 2016, Fan *et al.*, 2019) pero esto no sucedió en este biofloc inducido.

Por lo tanto podemos sugerir que las comunidades bacterianas encontradas en los tres tratamientos analizados, son saludables manteniéndose la abundancia relativa de los diferentes phylums dentro de los parámetros indicados de comunidades bacterianas de organismos sanos y aunque se observaron variaciones en algunos grupos que pudieron ser influenciados por los cambios de nivel de proteína, no se comprometieron la sobrevivencia del camarón ni propiciaron la presencia de grupos patógenos como los señalados en otros reportes. También debemos señalar que las comunidades microbiana varían al incrementar la proteína donde el análisis de coordenadas principales van variando respecto al eje X, encontrado la mayor diferencia

entre el tratamiento CP25 y CP35. Estas comunidades se pueden identificar y traslapar por las similitudes que existen entre ellas. Con este estudio se puede mostrar que el sistema de biofloc inducido con microalgas y probiótico al cambiar la concentración de proteína influye en cambios de su peso, concentración de amonio, nitratos y pH cambiando también la comunidad bacteriana de los intestinos del camarón.



### VIII.4.3. Efecto de la adición de macroalgas en la comunidad bacteriana intestinal de camarón cultivado con biofloc

La adición de las macroalgas al cultivo con biofloc inducido generó cambios significativos benéficos en la producción del camarón lo cual es recomendable para la acuicultura (Marinho-Soriano *et al.*, 2008). En esta investigación, el análisis comparativo entre los dos tratamientos, con y sin macroalgas resultó en un mejor rendimiento del cultivo y mayor crecimiento cuando se adicionaron las macroalgas, lo cual sugiere, está relacionado con la composición de la comunidad bacteriana. En el tratamiento adicionado con macroalgas y con una dieta con 25% de proteína se obtuvieron los mejores resultados, los cuales se sugiere fueron influenciados por la comunidad bacteriana. Los phylum encontrados en los intestinos de los camarones con estas dietas son relevantes desde un punto de vista microbiológico y es necesario estudiarlos porque hay escasos reportes relacionados para cultivos con biofloc.

El tratamiento adicionado con las macroalgas también mostró los mayores porcentajes de abundancias relativas de los phylum Proteobacteria, Actinobacteria y Bacteroidetes indicando que la microbiota bacteriana intestinal del camarón, es saludable (Lanfen y Qing, 2019). Se detectaron diferencias significativas al comparar con el tratamiento sin la adición de macroalgas, en el phylum Proteobacteria con concentraciones de 7% menos que la abundancia relativa en el tratamiento con macroalgas (39.94% en BFI y 46.54 % en BFIM) y Actinobacteria con 15% más que en BFI (9.8% en BFI y 25.4% en BFIM). Otros estudios indican que una disminución en Proteobacteria da lugar a otros grupos que darán beneficios al huésped (Suo *et al.*, 2017). Se incrementan otros grupos que mejoran la absorción de nutrientes, el incremento de Actinobacteria como se indicó previamente debido a su relación con la degradación de glucosa (Ito *et al.*, 2012), se sugiere el incremento de este phylum en este tratamiento por la adición de macroalgas, ya que en este experimento ambos mantuvieron igual cantidad en proporción de melaza por contener un mismo nivel de proteína en el alimento, uno adicionalmente tuvo las macroalgas, las cuales contienen varios polisacáridos, como agar, alginato, carragenano, ficocoloidales, celulosa, etc. Los ficocoloides están formados por varios monómeros como glucosa, galactosa, ácido manurónico, ácido gulurónico. Por lo general, las algas marinas están

compuestas de 30 al 60% de carbohidratos (Chan y Matanjun, 2017 y Sudhakar *et al.*, 2017) beta-1,3 glucanos es un importante carbohidrato de algas producido por macroalgas que pertenecen al grupo Rhodophyta (Martin *et al.*, 2014). Por lo tanto la presencia de estas sustancia ricas en carbohidratos ayuda al incremento del phylum Actinobacteria.

El porcentaje del phylum Bacteroidetes fue menor en el tratamiento adicionado de macroalgas, se esperaba encontrar este phylum con mayor dominancia en los bioflocs que presentaron mayor cantidad de solidos suspendidos o partículas microscópicas de materia orgánica en las cuales ha sido descrito su incremento (Woebken *et al.*, 2007), aunque la adición de las macroalgas incrementó los solidos en suspensión dentro del agua del biofloc, estas también contribuyeron junto con las bacterias del biofloc a la eliminación de sustancias o desechos orgánicos como lo muestran los resultados de la calidad de agua, por lo tanto la cantidad de solidos suspendidos puede disminuir en el agua que incluye las macroalgas, los flóculos fueron alimento del camarón y por lo tanto encontramos estos porcentajes de Bacteroidetes menores en los intestinos de los camarones, con esto podemos comprender como las macroalgas pueden favorecer los porcentajes de estos tres principales phylum.

Otra diferencia en los tratamientos con y sin macroalga son los phylum Cyanobacterias /Cloroflexi donde los resultados indican el 1.4 % de abundancia relativa en BFIM y un porcentaje alto en BFI con 17.7 %. El phylum Cyanobacteria no es adecuado para los cultivos de camarón y en nuestro caso BFI fue el único tratamiento en el cual se alcanzó una mayor proporción comparado con todos los analizados incluyendo los tratamientos con diferentes niveles de proteína. En los tanques de menor volumen, como es el caso de estos tratamientos generalmente se observa mayor inestabilidad, mayor perdida de agua por evaporación en el biofloc y mayor salinidad, el incremento de salinidad puede contribuir al crecimiento de bacterias oportunistas o que tienden a ser más tolerantes a estos cambios como las Cyanobacterias, sin embargo el tratamiento con macroalga mantuvo los valores bajos de este phylum bacteriano, por lo que se sugiere que la macroalga *Gracilaria* la cual

cuenta con actividad antibacteriana (Osuna *et al.*, 1967, Wongprasert *et al.*, 2014 y Brito *et al.*, 2014) puede estar relacionada con los resultados obtenidos. Además se reporta que los incrementos de Cyanobacteria y Bacteroidetes probablemente se debe al incremento de materia orgánica (Wang *et al.*, 2012 y Fan *et al.*, 2019). Es importante señalar que estas macroalgas pueden contribuir a mejorar el ambiente donde está el camarón beneficiando la composición de la comunidad bacteriana.

Este estudio mostró porcentajes menores en la abundancia de *Firmicutes*. Resultados de esta investigación y otros estudios confirman que las dietas pueden afectar la biodiversidad de la comunidad bacteriana del intestino (Turnbaug *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 2014 y Qiao *et al.*, 2017), por lo tanto con un buen diseño de la dieta se pueden cambiar comunidades microbianas del intestino y del ambiente, que no sean adecuadas para el cultivo o que influyen en el incremento de géneros patógenos como los *Pseudomonas* y *Aeromonas* los cuales podrían estar en muy bajas concentraciones en nuestros resultados pero falta cuantificarlas con un análisis más profundo. La abundancia relativa de Fusobacteria es menor a 0.001% en todos los tratamientos y los análisis microbiológicos indicaron bajas concentraciones del género *Vibrio*, además los valores de los parámetros de calidad del agua de oxígeno y pH no están relacionados a ambientes con cantidades grandes de nitrógeno amoniacal que indique la presencia de bacterias patógenas. Así mismo en nuestro sistema se mantuvieron los valores de oxígeno y pH sugeridos para mantener los camarones en un buen cultivo. Por lo cual sugerimos de acuerdo a los resultados encontrados que la variación de estos phylum de menores abundancias relativas como Fusobacteria de 0.001 % podría estar relacionado más con el sistema de biofloc que con la adición de las macroalgas.

Los resultados obtenidos en esta investigación son congruentes con otros estudios relacionados. Los phylum que se reportan en este estudio están en mayores proporciones que en los sistemas de agua clara, donde se indican diferencias en la distribución de frecuencia de OTUs. Cuatro de cinco phylum de bacterias fueron más dominantes de acuerdo con los métodos de cultivo. Se han descrito grupos de bacterias en biofloc con características apropiadas para crecer en un sustrato orgánico

o fuente de nitrógeno y la capacidad de adherirse a las superficies o coagregarse, y se ha confirmado que los camarones puestos en biofloc modifican su microbiota del intestino ya que puede cambiar a un nivel de 27% de similitud (Cardona *et al.*, 2016). Nuestros resultados también indican que las comunidades microbianas pueden estar jugando un papel importante en cultivos hiperintensivos con la adición de las macroalgas para obtener los mejores resultados de peso y comunidad bacteriana como ha sido descrito en este trabajo. Queda demostrado que la composición de las comunidades bacterianas están relacionadas no solo a la dieta, sino también al peso y a la calidad del agua. Se sugieren estudios más profundos de las comunidades bacterianas del intestino y del biofloc para conocer los géneros de bacterias relacionados con el incremento del peso, con la calidad del agua, supervivencia, etc., lo cual puede ser aplicado al manejo acuícola para la obtención del mejor crecimiento del camarón blanco y obtener la mayor biomasa.

## IX. CONCLUSIONES

- Para el cultivo hiperintensivo de camarón blanco, *Penaeus vannamei*, es recomendable emplear un biofloc inducido con dos diatomeas: *Grammatophora* sp; *Navicula* sp; la microalga *Schizochytrium* sp. y la bacteria probiótica *Lactobacillus fermentum* TD19 (Tratamiento BFD1). Emplear el Biofloc inducido mas la adición de una, dos o tres microalgas mantiene parámetros adecuados para el cultivo del camaron blanco, pero el implementar tres, mejora la calidad del flóculo con la presencia de más microorganismos, y una composición bromatológica mejor. El tratamiento BFD1 generó flóculos con la concentración más alta de ciliados, rotíferos, nematodos y bacterias ácido lácticas, así como la concentración más baja de *Vibrio* spp.  $1.2 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>. El BFD1 Fue el mejor, del biofloc, con los valores más altos de proteínas y lípidos:  $28.12 \pm 0.50$ ,  $22.44 \pm 0.80\%$  y peso seco de biofloc respectivamente, y la mejor relación de conversión alimenticia 0.89.
- El biofloc BFD1 muestra un aporte proteico importante al camarón, por lo que se puede suministrar un alimento comercial con un 25% de proteína, obteniendo un mejor crecimiento del camarón. Emplear un 25% de proteína en el biofloc inducido mantiene mejor calidad del agua. El disminuir la concentración de proteína en el alimento a un 25% no pone en riesgo la salud del camarón por que mantiene adecuada actividad de enzimas relacionadas con el sistema inmune, Profenol oxidasa (*PROpo*), Superóxido dismutasa (*SOD*), Peneidina 2 (*PEN*) y Glutatió peróxidasa (*GPO*). Emplear una concentración baja de proteína (25%) confiere beneficios al cultivo, con una mejor estabilidad de compuestos nitrogenados y bacterias presuntivas del género *Vibrio* y bacterias ácido-lácticas en el biofloc. El tratamiento CP25% es conveniente para el productor porque se reduciría el costo del alimento del camarón provee beneficios a este y al sistema de BFI. Además es recomendable adicionar Macroalgas al biofloc inducido CP25 ya que mantuvo las mejores condiciones de calidad de agua y peso de todos los tratamientos evaluados en este estudio.

- El análisis metagenómico mostró que la variación de la concentración de proteína de 25, 30 y 35 % en el biofloc inducido, genera cambios en las comunidades bacterianas de los intestinos de los camarones manteniéndose saludables. Los cambios en la concentración de proteína influyen en cambios de su peso, concentración de amonio, nitratos y pH. El adicionar Macroalgas al CP25 genera un cambio en su microbiota de los intestinos de los camarones con diferencias significativas, que uno sin su adición, teniendo diferencias en sus comunidades bacterianas de 74.5%. El tratamiento adicionado con macroalgas mejoro el peso y cambio sus abundancias relativas con diferencias sinficativas al comparar los phylum Proteobacteria; 39.94% en BFI y 46.54 % en BFIM y Actinobacteria; 9.8% en BFI y 25.4% en BFIM.

## X. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Battistuzzi, F.U., Hedges, S.B. 2008. A major clade of prokaryotes with ancient adaptations to life on land. *Mol. Biol. Evol.* 26 (2), 335–343.
- Binda, C., Lopetuso, L.R. Rizzatti, Gibiino, G., Cennamo, V., Gasbarrini, A. 2018. Actinobacteria: a relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. *Dig. Liver Dis.* 50, 421-428.
- Brito, L. O., Arana, L. A. V., Soares, R. B., Severi, W., Miranda, R. H., da Silva, S. M. B. C., Gálvez, A. O. 2014a. Water quality, phytoplankton composition and growth of *Litopenaeus vannamei* (Boone) in an integrated biofloc system with *Gracilaria birdiae* (Greville) and *Gracilaria domingensis* (Kützing). *Aquaculture International*, 22(5), 1649–1664.
- Brito, L. O., Arantes, R., Magnotti, C., Derner, R., Pchara, F., Olivera, A., & Vinatea, L. 2014b. Water quality and growth of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) in co-culture with green seaweed *Ulva lactuca* (Linnaeus) in intensive system. *Aquaculture International*, 22(2), 497–508.
- Brito, L. O., Chagas, A. M., da Silva, E. P., Soares, R. B., Severi, W., & Gálvez, A. O. 2016. Water quality, *Vibrio* density and growth of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) in an integrated biofloc system with red seaweed *Gracilaria birdiae* (Greville). *Aquaculture Research*, 47(3), 940–950.
- Cardona, E., Gueguen, Y., Magré, K., Lorgeoux, B., Piquemal, D., Pierrat, F. Saulnier, D. 2016. Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. *BMC Microbiology*, 16(1), 1–9.
- Cardona, E., Gueguen, Y., Magré, K., Lorgeoux, B., Piquemal, D., Pierrat, F. Saulnier, D. 2016. Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. *BMC Microbiology*, 16(1), 1–9.
- Chan, P. T., & Matanjun, P. 2017. Chemical composition and physicochemical properties of tropical red seaweed, *Gracilaria changii*. *Food Chemistry*, 221, 302–310.

- Chang, Z. W., Chiang, P. C., Cheng, W., & Chang, C. C. 2015. Impact of ammonia exposure on coagulation in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 118, 98–102.
- Chopin, T., Buschmann, A. H., Halling, C., Troell, M., Kautsky, N., Neori, A., Neefus, C. 2001. Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: A key toward sustainability. *Journal of Phycology*.
- Cobo De Lourdes, M., Sonnenholzner, S., Wille, M., & Sorgeloos, P. 2014. Ammonia tolerance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) larvae. *Aquaculture Research*, 45(3), 470–475.
- Colvin, L.B., Brand, C.W., 1977. The protein requirement of penaeid shrimp at various life cycle stages in controlled environment systems. *Proc. World Maric. Soc.* 8, 821e840.821-840.
- Copertino, M. D. S., Tormena, T., & Seeliger, U. 2009. Biofiltering efficiency, uptake and assimilation rates of *Ulva clathrata* (Roth) J. Agardh (Clorophyceae) cultivated in shrimp aquaculture waste water. *Journal of Applied Phycology*, 21(1), 31–45.
- Cornejo-Granados, F., Lopez-Zavala, A. A., Gallardo-Becerra, L., Mendoza-Vargas, A., Sánchez, F., Vichido, R. Ochoa-Leyva, A. 2017. Microbiome of Pacific Whiteleg shrimp reveals differential bacterial community composition between Wild, Aquacultured and AHPND/EMS outbreak conditions. *Scientific Reports*, 7(1).
- Cuellar-Angel J. Lara C. Morales V. De Gracia A. García O. 2010. Manual de Buenas prácticas de Manejo para el cultivo del camarón blanco *Penaeus vannamei*. Panama. pp.63.
- Fan, L., & Li, Q. X. 2019. Characteristics of intestinal microbiota in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* differing growth performances in the marine cultured environment. *Aquaculture*, 505, 450–461.
- Fan, L., & Li, Q. X. 2019. Characteristics of intestinal microbiota in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* differing growth performances in the marine cultured environment. *Aquaculture*, 505, 450–461.



- Fan, L., Wang, Z., Chen, M., Qu, Y., Li, J., Zhou, A. Zou, J. 2019. Microbiota comparison of Pacific white shrimp intestine and sediment at freshwater and marine cultured environment. *Science of the Total Environment*, 657, 1194–1204.
- Fan, L., Wang, Z., Chen, M., Qu, Y., Li, J., Zhou, A.Zou, J. 2019. Microbiota comparison of Pacific white shrimp intestine and sediment at freshwater and marine cultured environment. *Science of the Total Environment*, 657, 1194–1204.
- Ferreira, G. S., Silva, V. F., Martins, M. A., da Silva, A. C. C. P., Machado, C., Seiffert, W. Q., & do Nascimento Vieira, F. 2020. Strategies for ammonium and nitrite control in *Litopenaeus vannamei* nursery systems with bioflocs. *Aquacultural Engineering*, 88.
- Gao, S., Pan, L., Huang, F., Song, M., Tian, C., & Zhang, M. 2019. Metagenomic insights into the structure and function of intestinal microbiota of the farmed Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 499, 109–118.
- Gómez B, 2003. Técnicas de bacteriología, Análisis en fresco, Calidad de agua y buenas prácticas de manejo y bioseguridad en granjas camaroneras. CESASIN. Mazatlán México.pp. 89-92.
- Helena, R., Vieira, F., Lima, A. D. S., & Gleire, F. (n.d.). vibrioses em camarão cultivado Vibrioses on farmed shrimps, 42(1), 112–120.
- Holt, C. C., Bass, D., Stentiford, G. D., & van der Giezen, M. 2020. Understanding the role of the shrimp gut microbiome in health and disease. *Journal of Invertebrate Pathology*.
- Hooper, L.V., Midtvedt, T., Gordon, J.I., 2002. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 283–307.
- Huang Zhaobin Li, Xiaoyi Wang, Liping Shao, Zongze. 2016. Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*.
- Huerta-Rábago, J. A., Martínez-Porchas, M., Miranda-Baeza, A., Nieves-Soto, M., Rivas-Vega, M. E., & Martínez-Córdova, L. R. 2019. Addition of commercial

probiotic in a biofloc shrimp farm of *Litopenaeus vannamei* during the nursery phase: Effect on bacterial diversity using massive sequencing 16S rRNA. *Aquaculture*, 502, 391–399.

- Huerta-Rábago, J. A., Martínez-Porchas, M., Miranda-Baeza, A., Nieves-Soto, M., Rivas-Vega, M. E., & Martínez-Córdova, L. R. 2019. Addition of commercial probiotic in a biofloc shrimp farm of *Litopenaeus vannamei* during the nursery phase: Effect on bacterial diversity using massive sequencing 16S rRNA. *Aquaculture*, 502, 391–399.
- Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S .2001 Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 73(suppl):444S–450S.
- Ito, T., Yoshiguchi, K., ariesyady, H.D., Okabe, S. 2012. Identification and quantification of key microbial trophi groups of methanogenic glucose degradation in an anaerobic digester sluge. *Boresour. Technol.* 123, 599-609.
- Kaya, D., Genc, E., Genc, M. A., Aktas, M., Erolodogan, O. T., & Guroy, D. 2020. Biofloc technology in recirculating aquaculture system as a culture model for green tiger shrimp, *Penaeus semisulcatus*: Effects of different feeding rates and stocking densities. *Aquaculture*, 528.
- Kersters K., De Vos P., Gillis M., Swings J., Vandamme P., Stackebrandt e. 2006. Introduction to the proteobacteria. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., stackebrandt E. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, New York.
- Khatoon, H., Banerjee, S., Guan Yuan, G. T., Haris, N., Ikhwanuddin, M., Ambak, M. A., & Endut, A. 2016. Biofloc as a potential natural feed for shrimp postlarvae. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 113, 304–309.
- Klase, G., Lee, S., Liang, S, Kim, J., Zo, Y.-G., Lee, J. 2019. The microbiome and antibiotic resistance in integrated fishfarm water: implications of environmental public health. *Sci. Total Environ.* 649, 1491-1501.
- Kokou, F., Makridis, P., Kentouri, M., & Divanach, P. 2012. Antibacterial activity in microalgae cultures. *Aquaculture Research*, 43(10), 1520–1527.
- Koller, M., Muhr, A., & Braunegg, G. 2014. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research*. Elsevier.

- Lee, D.E., Lee, J., Kim, Y.M., Myeong, J.I., Kim, K.H. 2016. Uncultured bacterial diversity in a seawater recirculating aquaculture system revealed by 16S rRNA gene amplicon sequencing. *J. Microbiol.* 54 (4), 296–304.
- Lehnberg, W., & Schramm, W. 1984. Mass culture of brackish-water-adapted seaweeds in sewage-enriched seawater I. Productivity and nutrient accumulation. *Hydrobiologia*, 116–117(1), 276–281.
- Lin C.S, C.J. Chang, C.C. Lu, J. Martel, D.M. Ojcius, Y.F. Ko, J.D. Young, H.C. 2014. Impact of the gut microbiota, prebiotics, and probiotics on human health and disease, *Biomed J.* 37(5).
- Littler, M. M., & Littler, D. S. 1980. The Evolution of Thallus Form and Survival Strategies in Benthic Marine Macroalgae: Field and Laboratory Tests of a Functional Form Model. *The American Naturalist*, 116(1), 25–44.
- Luo, G., Xu, J., & Meng, H. 2020. Nitrate accumulation in biofloc aquaculture systems. *Aquaculture*. Elsevier B.V.
- Maldonado. C. S. Guillen, O Pantoja, L, Arena, M Ezquerro- Bauer, C A Alvares-Gonzalez, G Cuzon y G. Gaxiola. 2011. Effect of plant protein concentrates on nutrition physiology of *Litopenaeus Vannamei* (Boone, 1883) juveniles. *Aquaculture Research*.
- Marinho-Soriano, E., Nunes, S. O., Carneiro, M. A. A., & Pereira, D. C. 2009. Nutrients' removal from aquaculture wastewater using the macroalgae *Gracilaria birdiae*. *Biomass and Bioenergy*, 33(2), 327–331.
- Martínez-Córdova, L. R., Emerenciano, M., Miranda-Baeza, A., & Martínez-Porchas, M. 2015. Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: An updated review. *Reviews in Aquaculture*, 7(2), 131–148.
- Martínez-Córdova, L. R., Martínez-Porchas, M., Porchas-Cornejo, M. A., Gollas-Galván, T., Scheuren-Acevedo, S., Arvayo, M. A., López-Torres, M. A. 2017. Bacterial diversity studied by next-generation sequencing in a mature phototrophic *Navicula* sp.-based biofilm promoted into a shrimp culture system. *Aquaculture Research*, 48(5), 2047–2054.
- Martínez-Córdova, L. R., Martínez-Porchas, M., Porchas-Cornejo, M. A., Gollas-Galván, T., Scheuren-Acevedo, S., Arvayo, M. A., López-Torres, M. A. 2017.

Bacterial diversity studied by next-generation sequencing in a mature phototrophic *Navicula* sp-based biofilm promoted into a shrimp culture system. *Aquaculture Research*, 48(5), 2047–2054.

- Martínez-Córdova, L. R., Vargas-Albores, F., Garibay-Valdez, E., Ortiz-Estrada, Á. M., Porchas-Cornejo, M. A., Lago-Lestón, A., & Martínez-Porchas, M. 2018. Amaranth and wheat grains tested as nucleation sites of microbial communities to produce bioflocs used for shrimp culture. *Aquaculture*, 497, 503–509.
- Martínez-Porchas, M., & Vargas-Albores, F. 2017. Microbial metagenomics in aquaculture: a potential tool for a deeper insight into the activity. *Reviews in Aquaculture*. Wiley-Blackwell.
- Martínez-Porchas, M., Ezquerro-Brauer, M., Mendoza-Cano, F., Chan-Higuera, J. E., Vargas-Albores, F., & Martínez-Córdova, L. R. 2020. Effect of supplementing heterotrophic and photoautotrophic biofloc, on the production response, physiological condition and post-harvest quality of the whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Reports*, 16.
- Meziti, A., Mente, E., Kormas, K.A., 2012. Gut bacteria associated with different diets in reared *Nephrops norvegicus*. *Syst. Appl. Microbiol.* 35, 473–482.
- Nagamani-Balagurusamy. 2014. Metagenómica: Concepto y Aplicaciones en el Mundo Microbiano. In book: *Fronteras en Microbiología Aplicada* (pp.185-207) Publisher: U.A.de C., Mexico Editors: M.C. Cueto Wong, N.M. De la Fuente Salcido, M.P. Luévanos-Escareño.
- Neori, A. 2008. Essential role of seaweed cultivation in integrated multi-trophic aquaculture farms for global expansion of mariculture: An analysis. *Journal of Applied Phycology*.
- Neori, A., Cohen, I., & Gordin, H. 1991. *Ulva lactuca* Biofilters for Marine Fishpond Effluents II. Growth Rate, Yield and C:N Ratio. *Botanica Marina*, 34(6),
- Osuna Amarillas, P. S., Miranda Baeza, A., Rivas Vega, M. E., Esquer Miranda, E., García Bedoya, D., & Buitimea Valdez, R. 1969. composición química y actividad antimicrobiana de extractos de macroalga *Gracilaria vermiculophylla* sobre *Vibrio parahaemolyticus*/ chemical composition and antimicrobial activity

of different extracts from the macroalgae *Gracilaria vermiculophylla* against. *Biotechnia*, 18(2), 27–31.

- Pai, S.S., Anas, A., Jayaprakash, N.S., Priyaja, P., Sreelakshmi, B., Preetha, R., Philip, R., Mohandas, A., Singh, I.S.B. 2010. *Penaeus monodon* larvae can be protected from *Vibrio harveyi* infection by pre-emptive treatment of a rearing system with antagonistic or non-antagonistic bacterial probiotics. *Aquac. Res.* 41, 847–860.
- Panigrahi, A., Saranya, C., Sundaram, M., Vinoth Kannan, S. R., Das, R. R., Satish Kumar, R. Otta, S. K. 2018. Carbon: Nitrogen (C:N) ratio level variation influences microbial community of the system and growth as well as immunity of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in biofloc based culture system. *Fish and Shellfish Immunology*, 81, 329–337.
- Peña-Rodríguez, A., Magallón-Barajas, F. J., Cruz-Suárez, L. E., Elizondo-González, R., & Moll, B. 2017. Effects of stocking density on the performance of brown shrimp *Farfantepenaeus californiensis* co-cultured with the green seaweed *Ulva clathrata*. *Aquaculture Research*, 48(6), 2803–2811.
- Perez T, J.L. Balcazar, I. Ruiz-Zarzuela, N. Halaihel, D. Vendrell, I. de Blas, J.L. Muzquiz. 2010. Host-microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem, *Mucosal Immunol.* 3(4).
- Peso-Echarri, P., Frontela-Saseta, C., González-Bermúdez, C. A., Ros-Berruezo, G. F., & Martínez-Graciá, C. 2012. Polisacáridos de algas como ingredientes funcionales en acuicultura marina: Alginato, carragenato y ulvano. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. Universidad de Valparaíso.
- Piñon-Gimate A, Serviere-Zaragoza E, Ochoa-Izaguirre MJ, Páez-Osuna F. 2008. Species composition and seasonal changes in macroalgal blooms in lagoons along the southeastern Gulf of California. *Bot Mar* 51:112–123.
- Qiao, F., Liu, Y. K., Sun, Y. H., Wang, X. D., Chen, K., Li, T. Y. Zhang, M. L. 2017. Influence of different dietary carbohydrate sources on the growth and intestinal microbiota of *Litopenaeus vannamei* at low salinity. *Aquaculture Nutrition*, 23(3), 444–452.

- Qiao, F., Liu, Y.K., Sun, Y.H., Wang, X.D., Chen, K., Li, T.Y., Li, E.C., Zhang, M.L. 2016. Influence of different dietary carbohydrate sources on the growth and intestinal microbiota of *Litopenaeus vannamei* at low salinity. *Aquac. Nutr.* 23 (3), 444–452.
- Rodríguez, J., Méndez, E., Rivas, A., & Cortez, J. 2014. Camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) silvestre estuarino en el sur de Sinaloa y norte de Nayarit, mediante análisis microbiológico y PCR. Evaluation of the presence of *Vibrio parahaemolyticus* in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) estuarine-wild from southern. *Revista Bio Ciencias*, 2(203), 282–292.
- Rodríguez-González Hervey, Orduña-Rojas Javier, Villalobos-Medina y Jose P., García-Ulloa, Polanco-Torres A., López-Álvarez Ely S. Montoya-Mejía Magnolia y Hernández-Llamas Alfredo. 2014. Partial inclusion of *Ulva lactuca* and *Gracilaria parvispora* meal in balanced diets for white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J Appl Phycol* (2014) 26:2453–2459. DOI 10.1007/s10811-014-0272-z
- Rosas, C., Cuzon, G., Taboada, G., Pascual, C., Gaxiola, G., and Van Wormhoudt, A. 2001. Effect of dietary protein and energy levels (P/E) on growth, oxygen consumption, hemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus* juveniles (Crustacea, Decapoda; Penaeidae). *Aquaculture Research*. in press. *Aquaculture Research*, 2001, 32, 531-547.
- Ruiz Cortes Giovana, 2019. Selección e incorporación de macroalgas a un biofloc inducido en un Cultivo hiperintensivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis. Universidad Autónoma de Baja California Sur. Área de Conocimiento de Ciencias del Mar. Departamento Académico de Ciencias Marinas y Costeras. Posgrado en Ciencias Marinas y Costera. 107 pp.
- Samocha, T. M., Fricker, J., Ali, A. M., Shpigel, M., & Neori, A. 2015. Growth and nutrient uptake of the macroalga *Gracilaria tikvahiae* cultured with the shrimp *Litopenaeus vannamei* in an Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA) system. *Aquaculture*, 446, 263–271.

- Samocha, T. M., Fricker, J., Ali, A. M., Shpigel, M., & Neori, A. 2015. Growth and nutrient uptake of the macroalga *Gracilaria tikvahiae* cultured with the shrimp *Litopenaeus vannamei* in an Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA) system. *Aquaculture*, 446, 263–271.
- Schleder, D. D., Blank, M., Peruch, L. G. B., Poli, M. A., Gonçalves, P., Rosa, K. V., Hayashi, L. 2020. Impact of combinations of brown seaweeds on shrimp gut microbiota and response to thermal shock and white spot disease. *Aquaculture*, 519.
- Schweitzer, R., Fonseca, G., Orteney, N., Menezes, F. C. T., Thompson, F. L., Thompson, C. C., & Gregoracci, G. B. 2020. The role of sedimentation in the structuring of microbial communities in biofloc-dominated aquaculture tanks. *Aquaculture*, 514.
- Semova, I., Carten, J. D., Stombaugh, J., MacKey, L. C., Knight, R., Farber, S. A., & Rawls, J. F. 2012. Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish. *Cell Host and Microbe*, 12(3), 277–288.
- Servin, J.a., Herbold, C.W., Skophammer, R.C., Lake, J.A. 2007. Evidence excluding the root of the tree of life from the actinobacteria. *Mol. Biol. Evol.*25.,
- Silva, G. C., Albuquerque-Costa, R., Oliveira-Peixoto, J. R., Pessoa-Nascimento, F. E., de Macedo-Carneiro, P. B., & dos Fernandes-Vieira, R. H. S. 2013. Tropical Atlantic marine macroalgae with bioactivity against virulent and antibiotic resistant *Vibrio* | Macroalgas marinas tropicales atlánticas con actividad biológica contra vibrios virulentos y resistentes a antimicrobianos. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41(1).
- Simoes N, Jones D, Soto-Rodríguez S, Roque A, Gómez-Gil B. 2002. Las bacterias en el inicio de la alimentación exógena en larvas de camarones peneidos: efectos de la calidad del agua, tasas de ingestión y rutas de colonización del tracto digestivo. In: Cruz-Suarez L, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Gaxiola-Cortés M, Simoes N (eds) *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, Cancún, Quintana Roo, México.

- Simon, C. J., Truong, H. H., Noble, T. H., Osborne, S. A., Wynne, J. W., & Wade, N. M. 2020. Microbial biomass, marine invertebrate meals and feed restriction influence the biological and gut microbiota response of shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 520.
- Sudhakar, M. P., Jegatheesan, A., Poonam, C., Perumal, K., & Arunkumar, K. 2017. Biosaccharification and ethanol production from spent seaweed biomass using marine bacteria and yeast. *Renewable Energy*, 105, 133–139.
- Sudhakar, M. P., Jegatheesan, A., Poonam, C., Perumal, K., & Arunkumar, K. 2017. Biosaccharification and ethanol production from spent seaweed biomass using marine bacteria and yeast. *Renewable Energy*, 105, 133–139.
- Sun, P., Jin, M., Ding, L., Lu, Y., Ma, H., Yuan, Y., & Zhou, Q. 2018. Dietary lipid levels could improve growth and intestinal microbiota of juvenile swimming crab, *Portunus trituberculatus*. *Aquaculture*, 490, 208–216.
- Suo, Yantong Li, Erchao Li, Tongyu Jia, Yongyi Qin, Jian G. Gu, Zhimin Chen, Liqiao. 2016. Response of gut health and microbiota to sulfide exposure in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 87-96.
- Thomas F., Hehemann, J.-H., Rebuffet, E., Czjzek, M., and Michel, G. 2011. Environmental and gut Bacteroidetes: the food connection. *Frontiers on microbiology*.
- Valencia-Castañeda, G., Frías-Espericueta, M. G., Vanegas-Pérez, R. C., Chávez-Sánchez, M. C., & Páez-Osuna, F. 2019. Toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to *Litopenaeus vannamei* juveniles in low-salinity water in single and ternary exposure experiments and their environmental implications. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 70.
- Van Rijn, J., Tal, Y., & Schreier, H. J. 2006. Denitrification in recirculating systems: Theory and applications. *Aquacultural Engineering*, 34(3), 364–376.
- Vargas-Albores, F., Martínez-Córdova, L. R., Gollas-Galván, T., Garibay-Valdez, E., Emerenciano, M. G. C., Lago-Leston, A., Martínez-Porchas, M. 2019. Inferring the functional properties of bacterial communities in shrimp-



culture bioflocs produced with amaranth and wheat seeds as fouler promoters. *Aquaculture*, 500, 107–117.

- Wang, Y., Sheng, H.-F., He, Y., Wu, J.-Y., Jiang, Y.-X., Tam, N.F.-Y.. 2012. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of Illumina tags. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8264.
- Wasielesky Jr. a, Wilson, Heidi Atwood, Al Stokes b, Craig L. Browdy. 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258 (2006) 396–403.
- 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*, 529.
- Woebken, D., Fuchs, B.M., Kuypers, M.M., Amann, R., 2007. Potential interactions of particle-associated anammox bacteria with bacterial and archaeal partners in the Namibian upwelling system. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (14), 4648–4657.
- Wong, K. H., & Cheung, P. C. K. 2001. Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds Part II. In vitro protein digestibility and amino acid profiles of protein concentrates. *Food Chemistry*, 72(1), 11–17.
- Wongprasert, K., Rudtanatip, T., & Praiboon, J. 2014. Immunostimulatory activity of sulfated galactans isolated from the red seaweed *Gracilaria fisheri* and development of resistance against white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 36(1), 52–60.
- Xu We-Jie y Pan Lu-Qing. 2014. Dietary protein level and C/N ratio manipulation in zero-exchange culture of *Litopenaeus vannamei*: Evaluation of inorganic nitrogen control, biofloc composition and shrimp performance. *Aquaculture Research* 45, 1842-1851.
- Xu, W., Xu, Y., Su, H., Hu, X., Xu, Y., Li, Z., Cao, Y. 2021. Production performance, inorganic nitrogen control and bacterial community characteristics

in a controlled biofloc-based system for indoor and outdoor super-intensive culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 531.

- Yunos Mohd, Fareza Hanis Nasir, Nurfarahana Mohd Wan Jusoh, Hajjar Hartini Khatoon, Helena Lam, Su Shiung Jusoh, Ahmad. 2017. Harvesting of microalgae (*Chlorella sp.*) from aquaculture bioflocs using an environmental-friendly chitosan-based bio-coagulant. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 243-244.
- Zeng S, Huang Z, Hou D, Liu J, Weng S, He J. 2017. Composition, diversity and function of intestinal microbiota in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at different culture stages. *PeerJ* 5
- Zhang, D., Wang, X., Xiong, J., Zhu, J., Wang, Y., Zhao, Q., Dai, H. 2014a. Bacterioplankton assemblages as biological indicators of shrimp health status. *Ecological Indicators*, 38, 218–224.
- Zhang, D.M., Wang, X., Xiong, J.B., Zhu, J.L., Wang, Y.N., Zhao, Q.F., Chen, H.P., Guo, A.N., Wu, J.F., Dai, H.P., 2014. Bacterioplankton assemblages as biological indicators of shrimp health status. *Ecol. Indic.* 38, 218–224.
- Zhang, J., Yang, Y., Zhao, L., Li y., Xie, S., Liu Y., 2014(2). Distribution of sediment bacterial and archaeal communities in plateaus freshwater lakes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 3291-3302.
- Zhang, J., Yang, Y., Zhao, L., Li, Y., Xie, S., & Liu, Y. 2015. Distribution of sediment bacterial and archaeal communities in plateau freshwater lakes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(7), 3291–3302.
- Zhang, M., Sun, Y., Chen, K., Yu, N., Zhou, Z., Chen, L., Li, E. 2014b. Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources. *Aquaculture*, 434, 449–455. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.008>
- Zheng, Y., Yu, M., Liu, Y., Su, Y., Xu, T., Yu, M., & Zhang, X. H. 2016. Comparison of cultivable bacterial communities associated with Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at different health statuses and growth stages. *Aquaculture*, 451, 163–169.

- Zoo, L., Watts, P. C., Buley, K. R., Sanderson, S., Boardman, W., Ciofi, C., ... Watts K.R. Buley, S. Sanderson, W. Boardman, C. Ciofi, and R. Gibson, P. C. 2006. Parthenogenesis in Komodo dragons. *Nature*, 444(7122), 1022–1023.

## ANEXO

### Anexo 1

Clasificación reconocida para el camarón blanco *Penaeus vannamei* de acuerdo al sitio WORMS (<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=247789>).

## Penaeus vannamei Boone, 1931

AphiaID

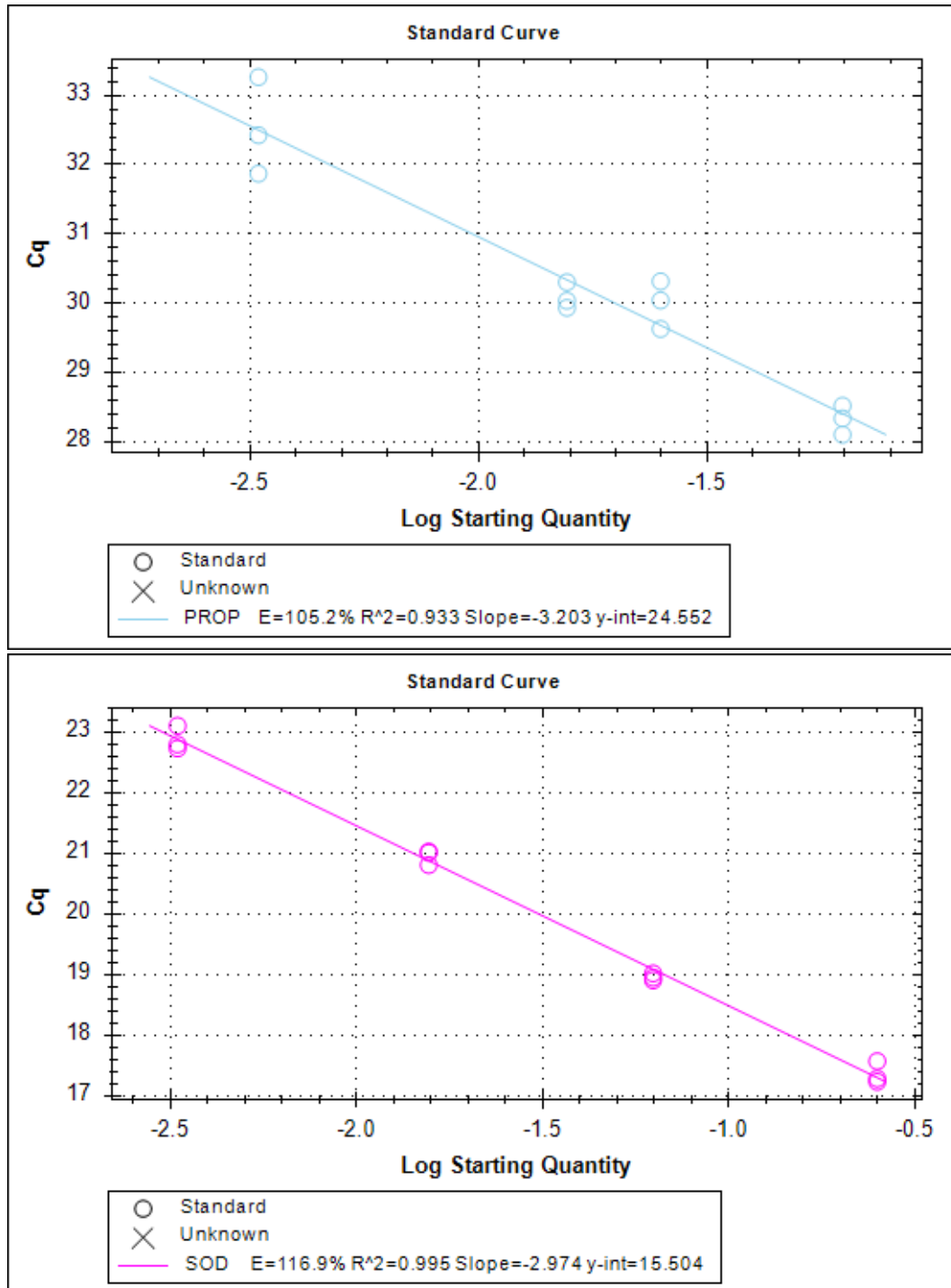
377748 (urn:lsid:marinespecies.org:taxname:377748)

Classification

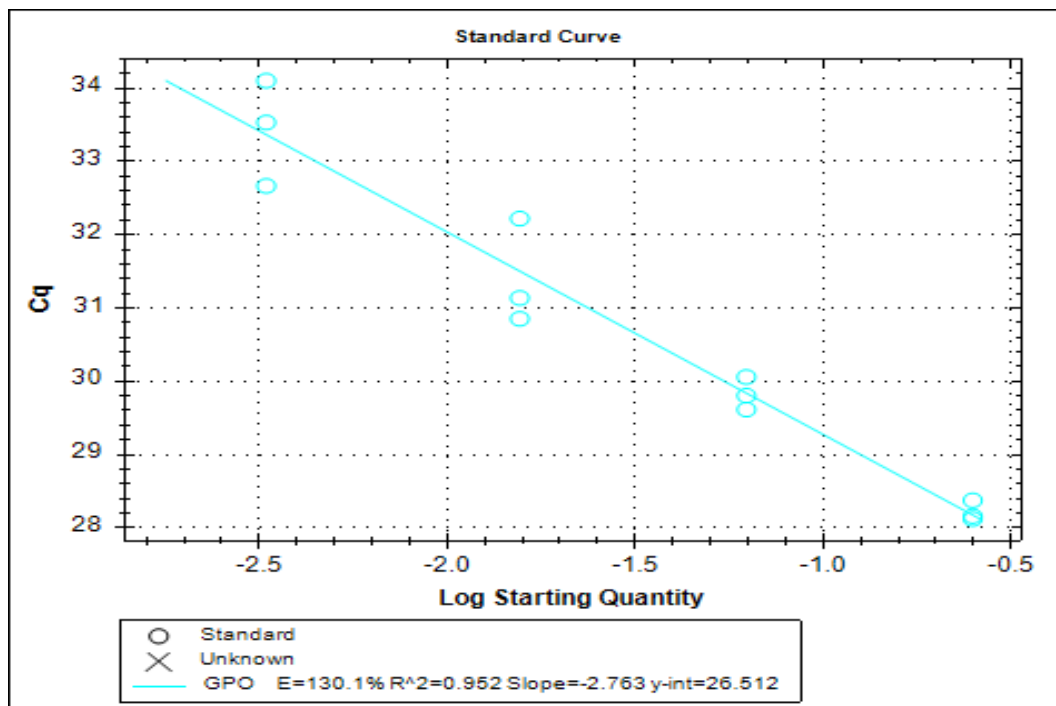
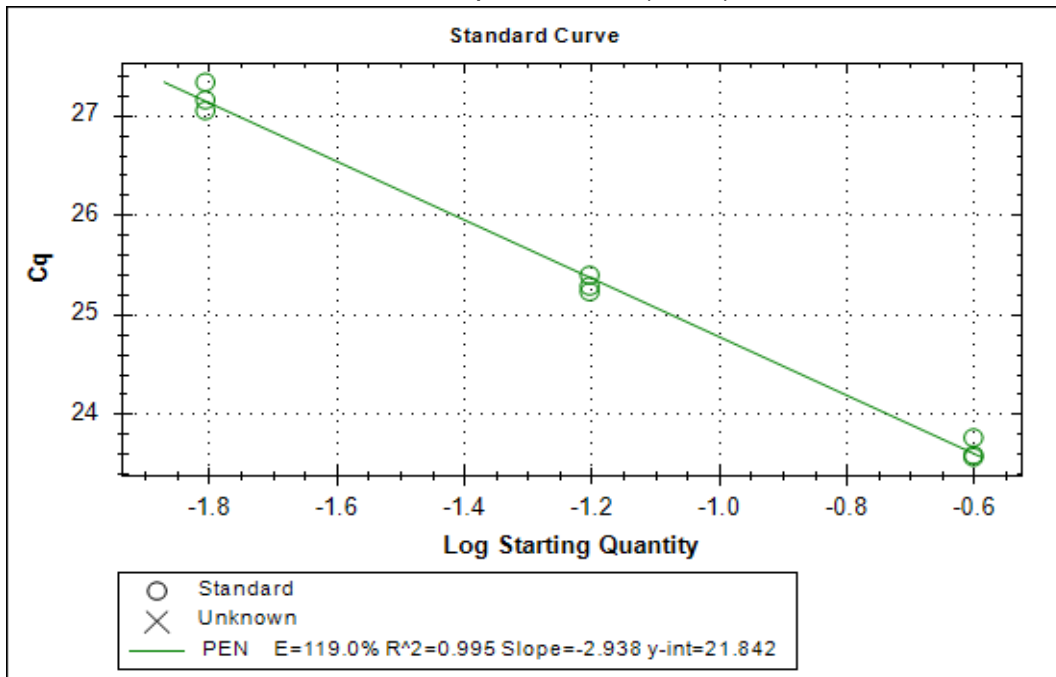
1. Biota
2. Animalia (Kingdom)
3. Arthropoda (Phylum)
4. Crustacea (Subphylum)
5. Multicrustacea (Superclass)
6. Malacostraca (Class)
7. Eumalacostraca (Subclass)
8. Eucarida (Superorder)
9. Decapoda (Order)
10. Dendrobranchiata (Suborder)
11. Penaeoidea (Superfamily)
12. Penaeidae (Family)
13. Penaeus (Genus)
14. Penaeus vannamei (Species)

## Anexo 2

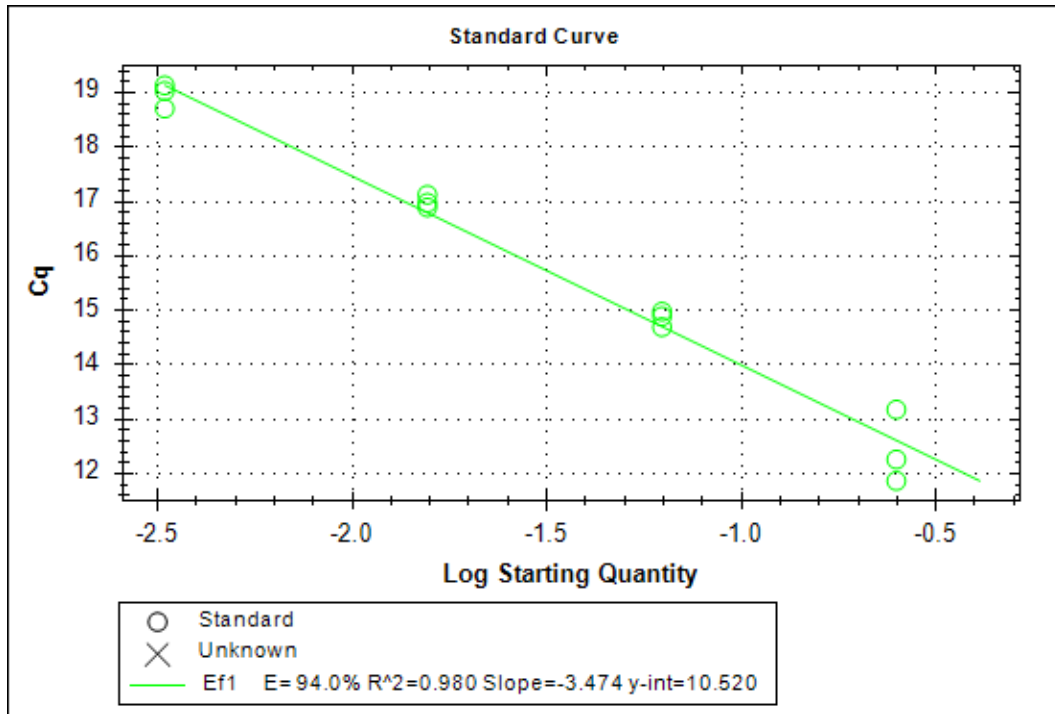
Curvas estándar realizadas para los genes blanco, Profenoloxidasa (*PROpo*), Superoxido dismutasa (*SOD*).



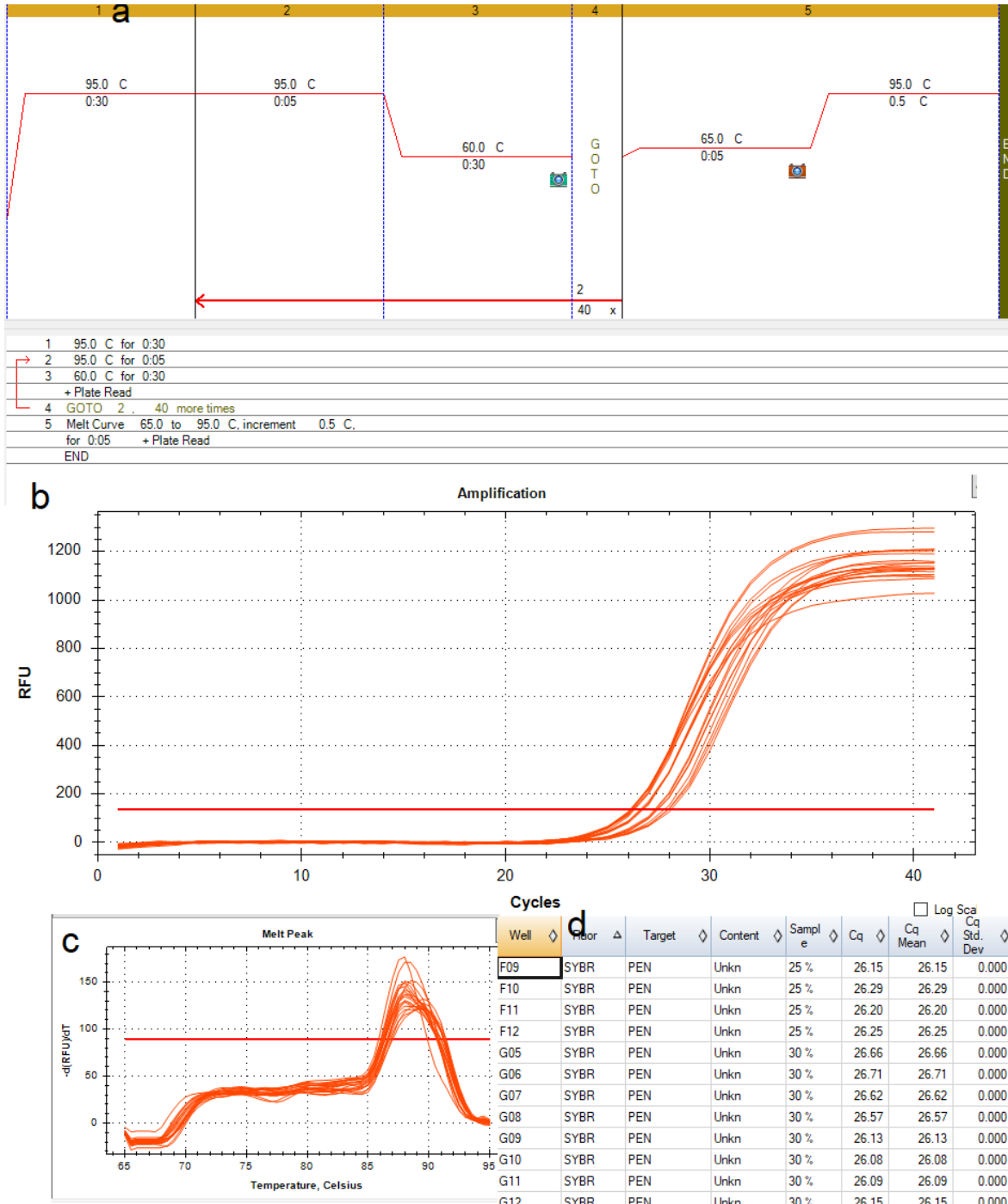
**Anexo 3.** Curvas estándar realizadas para los genes blanco, Peneidina 2 (*PEN*), Glutación peróxidasa (*GPO*).



**Anexo 4.** Curva estándar realizadas para el gen de referencia Factor de elongación ( $EF1\alpha$ ).

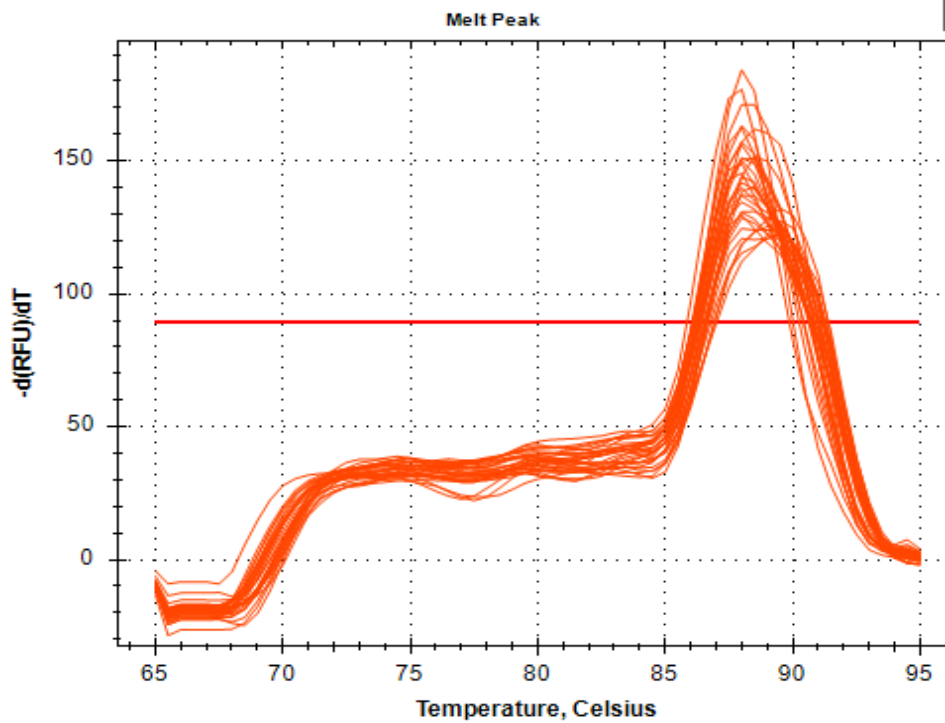
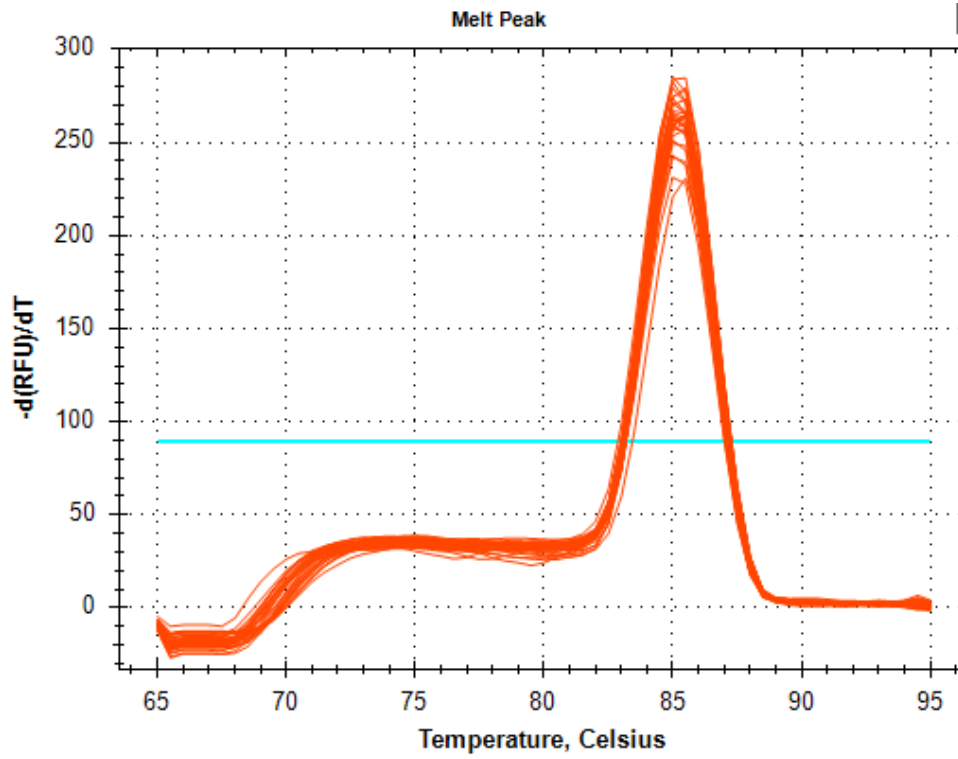


**Anexo 5.** Imagen de (a) Grafico del programa de amplificación para el qPCR para la cuantificación de la expresión en cada gen con temperatura, tiempo y ciclos, (b) Grafico de los ciclos para la amplificación en *PEN*, (c) Temperaturas empleadas donde muestra el pico alcanzado en la temperatura de transcripción en *PEN* (e) Tabla con la gen cuantificado, tratamiento y cq obtenida en *PEN*.

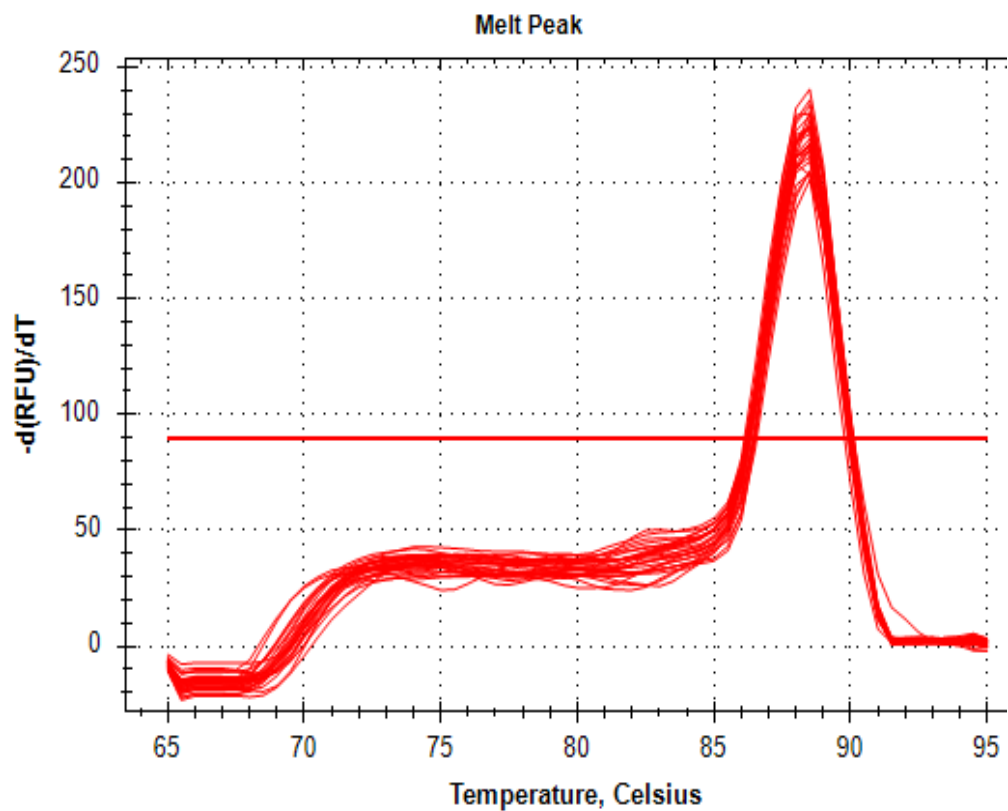
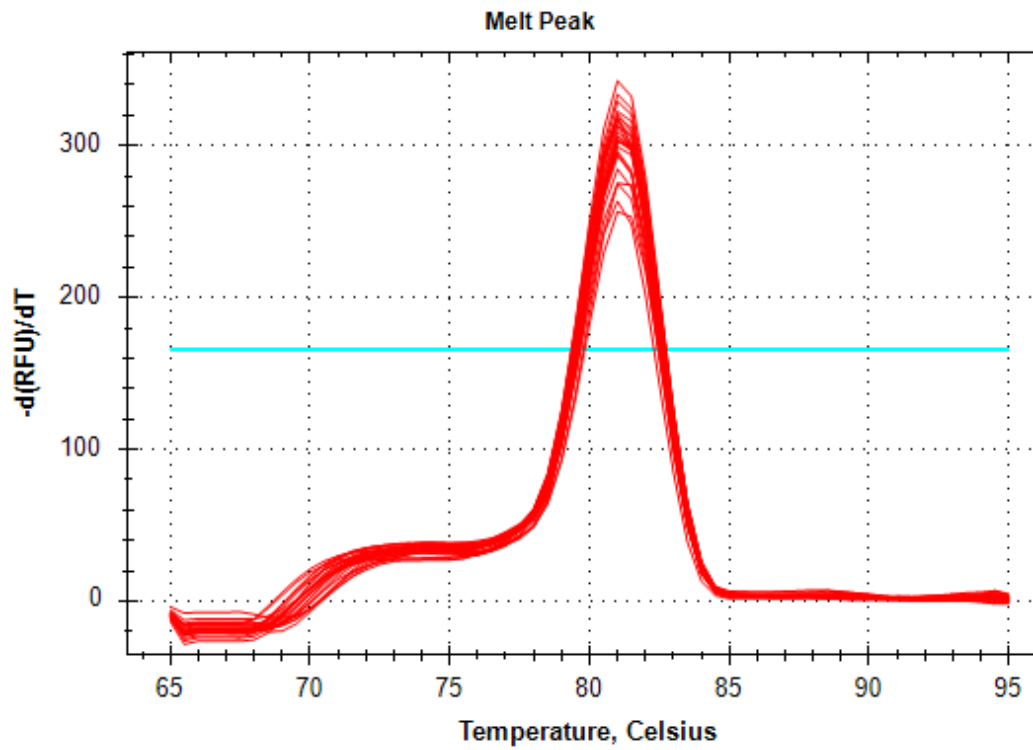




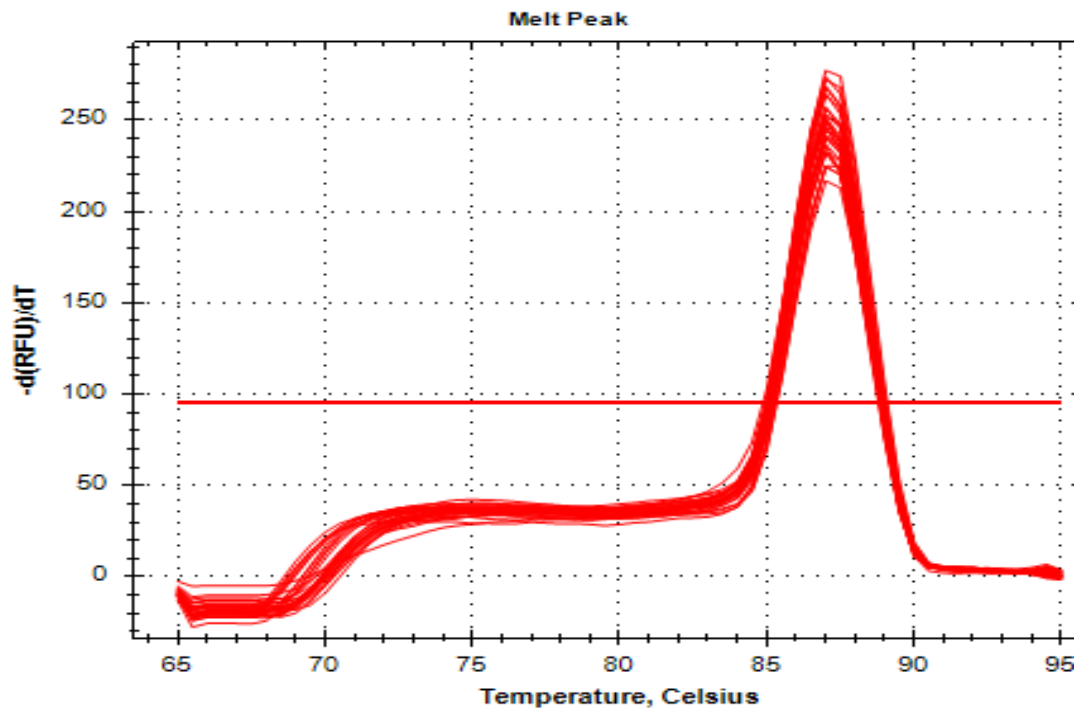
**Anexo 6.** Curvas de desnaturalización de un producto de qPCR del gen de referencia Factor de elongación (*EF1 $\alpha$* ) y para Peneidina 2 (*PEN*).



**Anexo 7.** Curvas de desnaturalización de un producto de qPCR del gen glutación peróxidasa (*GPO*) y Profenoloxidasa (*PROpo*).



**Anexo 8.** Curvas de desnaturalización de un producto de qPCR del gen Superóxido dismutasa (SOD)



**Anexo 9.** Tabla de cuantificación de la expresión relativa en camarones alimentados con biofloc y tres concentraciones de proteína: 25 (CP25), 30 (CP30) y 35 (CP35).

Genes	Tratamientos		
	CP25	CP30	CP35
<b>GPO</b>	1.68 a	1.58 a	1 b
<b>PEN</b>	3.17 a	2.44 b	1 c
<b>SOD</b>	1.81 a	1.54 b	1 c
<b>PROpo</b>	0.39 a	1.07 a	1 a

Valores promedio de un pool de 10 muestras por tratamiento. Superíndice indica diferencia entre los grupos de tratamientos ( $P < 0.05$ ).

**Anexo 10** Tablas de los resultados de las pruebas de Tukey al comparar los Phylum entre los tratamientos evaluados en el análisis metagenómico.

Tabla Tukey para la comparación de medias entre los tratamientos de *Proteobacterias*, con 95% de nivel de confiabilidad.

	diff	lwr	upr	p adj
T2-T1	-2.478275e-05	-0.0001712686	0.0001217031	0.9967912
T3-T1	-3.151657e-06	-0.0001496375	0.0001433342	0.9999999
T4-T1	-3.307479e-05	-0.0002124826	0.0001463330	0.9951858
T5-T1	-6.867145e-05	-0.0002480792	0.0001107363	0.8852788
T6-T1	-3.163916e-05	-0.0002254217	0.0001621434	0.9972903
T3-T2	2.163109e-05	-0.0001248547	0.0001681169	0.9983245
T4-T2	-8.292040e-06	-0.0001876998	0.0001711157	0.9999945
T5-T2	-4.388870e-05	-0.0002232965	0.0001355191	0.9823201
T6-T2	-6.856410e-06	-0.0002006389	0.0001869261	0.9999985
T4-T3	-2.992313e-05	-0.0002093309	0.0001494846	0.9970012
T5-T3	-6.551980e-05	-0.0002449276	0.0001138880	0.9042045
T6-T3	-2.848750e-05	-0.0002222700	0.0001652950	0.9983601
T5-T4	-3.559666e-05	-0.0002427589	0.0001715656	0.9965460
T6-T4	1.435630e-06	-0.0002182931	0.0002211644	1.0000000
T6-T5	3.703229e-05	-0.0001826964	0.0002567610	0.9968489

Tabla Tukey para la comparación de medias entre los tratamientos de *Bacteroidetes*, con 95% de nivel de confiabilidad.

	diff	lwr	upr	p adj
T2-T1	-9.407266e-05	-3.156394e-04	1.274941e-04	0.8321590
T3-T1	-1.217115e-04	-3.432783e-04	9.985522e-05	0.6213858
T4-T1	-9.959513e-05	-3.709579e-04	1.717676e-04	0.9022852
T5-T1	1.009253e-04	-1.704375e-04	3.722880e-04	0.8971478
T6-T1	7.529134e-05	-2.178139e-04	3.683966e-04	0.9780098
T3-T2	-2.763889e-05	-2.492057e-04	1.939279e-04	0.9992582
T4-T2	-5.522469e-06	-2.768852e-04	2.658403e-04	0.9999999
T5-T2	1.949979e-04	-7.636485e-05	4.663607e-04	0.3151535
T6-T2	1.693640e-04	-1.237413e-04	4.624693e-04	0.5672781
T4-T3	2.211642e-05	-2.492463e-04	2.934792e-04	0.9999081
T5-T3	2.226368e-04	-4.872597e-05	4.939996e-04	0.1787943
T6-T3	1.970029e-04	-9.610240e-05	4.901082e-04	0.3924673
T5-T4	2.005204e-04	-1.128223e-04	5.138631e-04	0.4502440
T6-T4	1.748865e-04	-1.574637e-04	5.072366e-04	0.6644757
T6-T5	-2.563391e-05	-3.579841e-04	3.067162e-04	0.9999300

Tabla Tukey para la comparación de medias entre los tratamientos de *Cyanobacterias*, con 95% de nivel de confiabilidad.

diff	lwr	upr	p adj
T2-T1	-5.014717e-05	-0.0005037672	0.0004034729
T3-T1	2.058855e-04	-0.0002477346	0.0006595055
T4-T1	-9.850635e-05	-0.0006540752	0.0004570625
T5-T1	8.943580e-04	0.0003387892	0.0014499268
T6-T1	-1.431548e-04	-0.0007432378	0.0004569281
T3-T2	2.560326e-04	-0.0001975874	0.0007096527
T4-T2	-4.835918e-05	-0.0006039280	0.0005072097
T5-T2	9.445052e-04	0.0003889363	0.0015000740
T6-T2	-9.300766e-05	-0.0006930906	0.0005070753
T4-T3	-3.043918e-04	-0.0008599606	0.0002511770
T5-T3	6.884725e-04	0.0001329037	0.0012440414
T6-T3	-3.490403e-04	-0.0009491232	0.0002510426
T5-T4	9.928643e-04	0.0003513487	0.0016343800
T6-T4	-4.464848e-05	-0.0007250786	0.0006357816
T6-T5	-1.037513e-03	-0.0017179429	-0.0003570827

Tabla Tukey para la comparación de medias entre los tratamientos de *Actinobacterias*, con 95% de nivel de confiabilidad.

diff	lwr	upr	p adj
T2-T1	1.766411e-04	-0.0009543012	0.0013075835
T3-T1	1.659755e-04	-0.0009649668	0.0012969178
T4-T1	3.466089e-04	-0.0010385070	0.0017317247
T5-T1	-4.603762e-04	-0.0018454920	0.0009247396
T6-T1	4.169756e-04	-0.0010791205	0.0019130716
T3-T2	-1.066562e-05	-0.0011416080	0.0011202767
T4-T2	1.699677e-04	-0.0012151481	0.0015550835
T5-T2	-6.370174e-04	-0.0020221332	0.0007480985
T6-T2	2.403344e-04	-0.0012557617	0.0017364305
T4-T3	1.806333e-04	-0.0012044825	0.0015657492
T5-T3	-6.263517e-04	-0.0020114675	0.0007587641
T6-T3	2.510001e-04	-0.0012450960	0.0017470961
T5-T4	-8.069851e-04	-0.0024063791	0.0007924089
T6-T4	7.036670e-05	-0.0016260468	0.0017667802
T6-T5	8.773518e-04	-0.0008190617	0.0025737653

Tabla Tukey para la comparación de medias entre los tratamientos de *Tenericuites* , con 95% de nivel de confiabilidad.

diff	lwr	upr	p adj
T2-T1	1.111307e-18	-0.0001849066	0.0001849066
T3-T1	1.355253e-20	-0.0001849066	0.0001849066
T4-T1	-1.626303e-19	-0.0002264634	0.0002264634
T5-T1	4.331777e-04	0.0002067142	0.0006596411
T6-T1	-2.303930e-19	-0.0002446085	0.0002446085
T3-T2	-1.097755e-18	-0.0001849066	0.0001849066
T4-T2	-1.273938e-18	-0.0002264634	0.0002264634
T5-T2	4.331777e-04	0.0002067142	0.0006596411
T6-T2	-1.341700e-18	-0.0002446085	0.0002446085
T4-T3	-1.761829e-19	-0.0002264634	0.0002264634
T5-T3	4.331777e-04	0.0002067142	0.0006596411
T6-T3	-2.439455e-19	-0.0002446085	0.0002446085
T5-T4	4.331777e-04	0.0001716802	0.0006946751

T6-T4 -6.776264e-20 -0.0002773599 0.0002773599 1.0000000  
 T6-T5 -4.331777e-04 -0.0007105376 -0.0001558177 0.0002523

Tabla Tukey para la comparación de medias entre los tratamientos de *Latecibacterias*, con 95% de nivel de confiabilidad.

diff	lwr	upr	p	adj
T2-T1	6.301925e-19	-2.680788e-05	2.680788e-05	1e+00
T3-T1	3.726945e-19	-2.680788e-05	2.680788e-05	1e+00
T4-T1	1.592422e-19	-3.283282e-05	3.283282e-05	1e+00
T5-T1	8.014747e-05	4.731466e-05	1.129803e-04	0e+00
T6-T1	8.809143e-20	-3.546350e-05	3.546350e-05	1e+00
T3-T2	-2.574980e-19	-2.680788e-05	2.680788e-05	1e+00
T4-T2	-4.709503e-19	-3.283282e-05	3.283282e-05	1e+00
T5-T2	8.014747e-05	4.731466e-05	1.129803e-04	0e+00
T6-T2	-5.421011e-19	-3.546350e-05	3.546350e-05	1e+00
T4-T3	-2.134523e-19	-3.283282e-05	3.283282e-05	1e+00
T5-T3	8.014747e-05	4.731466e-05	1.129803e-04	0e+00
T6-T3	-2.846031e-19	-3.546350e-05	3.546350e-05	1e+00
T5-T4	8.014747e-05	4.223540e-05	1.180595e-04	1e-07
T6-T4	-7.115077e-20	-4.021183e-05	4.021183e-05	1e+00
T6-T5	-8.014747e-05	-1.203593e-04	-3.993565e-05	4e-07