



**UNIDAD ACADÉMICA NAVOJOA**

**Evaluación de la diversidad de bacterias presentes en bioflóculos  
provenientes de cultivos hiper-intensivos de camarón a través de  
secuenciación masiva del gen 16S ARNr**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN SISTEMA DE PRODUCCIÓN BIOSUSTENTABLES**

**PRESENTA**

**JOSÉ ALBERTO HUERTA RÁBAGO**

## ACTA DE APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis titulada **Evaluación de la diversidad de bacterias presentes en bioflóculos provenientes de cultivos hiper-intensivos de camarón a través de secuenciación masiva del gen 16S ARNr**, presentada por **JOSÉ ALBERTO HUERTA RÁBAGO**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Sistemas de Producción Biosustentables.



Dr. Anselmo Miranda Baeza  
Director Interno



Dr. Marcel Martínez Porchas  
Director Externo



Dra. Martha Elisa Rivas vega  
Sinodal

## **DEDICATORIA**

A mis padres, hermano, familia y seres queridos; por su gran apoyo y buenos deseos.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Estatal de Sonora, por permitirme realizar mis estudios de posgrado, así como a todo su personal por las atenciones recibidas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (núm. de becario: 582300) para cursar el posgrado de Maestría en Ciencias en Sistemas de Producción Biosustentables.

El estudio estuvo financiado por los proyectos a) CONACYT 222722 “Identificación y caracterización de consorcios microbianos (bioflóculos y biopelículas) en cultivos camarónicas y su efecto sobre la calidad del agua y estado fisiológico e inmune del camarón blanco” y b) la UES por el proyecto interno UES-PIE-17-UAN-IBA-01 “Dinámica poblacional de bacterias benéficas y patógenas en el cultivo hiper-intensivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* mediante metagenómica “

A la empresa Provedora de larvas S.A. de C.V. Por permitir realizar el bioensayo en sus instalaciones y por facilitarme la colecta de las muestras necesarias para este trabajo.

A los miembros de mi comité de tesis: A los directores Dr. Anselmo Miranda Baeza y Dr. Marcel Martínez Porchas y sinodal Dra. Martha Elisa Rivas Vega, gracias por su gran apoyo.

A mis profesores del posgrado les agradezco por haber puesto su dedicación y empeño para transmitirme sus conocimientos. De igual manera le agradezco a mi compañero Cristian Carvajal por compartir sus ideas y experiencia de campo durante las clases.

Al Laboratorio de Biología Experimental (CTAOA) del CIAD, por permitirme el uso de sus instalaciones y equipo relacionado con la extracción y análisis del ADN. Así como a mis compañeros de dicho laboratorio, gracias por su apoyo.

## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la diversidad bacteriana presente en los bioflóculos de un cultivo hiper-intensivo de camarón a través de la secuenciación masiva del gen 16S ARNr. El cultivo de camarón se realizó en la empresa Proveedor de larvas S.A de C.V. Se utilizó un diseño al azar simple con dos tratamientos y un control, cada uno por triplicado. En los tratamientos se evaluaron dos grupos de probióticos (PA y PB) y un control (C) sin probiótico ni fuente de carbono adicional. Se sembraron postlarvas de camarón blanco a densidades de 500 ind/m<sup>2</sup> con un peso de 0.0073 g. Las muestras de biofloc se colectaron durante la etapa inicial, intermedia y final del cultivo. La extracción y análisis del ADN presente en los bioflóculos se realizó en el Laboratorio de Biología Experimental (CTAOA) del CIAD. En total se registraron 22 filos de bacterias, de los cuales 19 estuvieron compartidos entre los tres tratamientos, lo cual demuestra que el reemplazo (diversidad beta) no fue significativo. Los modelos usados como predictores de riqueza mostraron una gran semejanza entre los datos estimados y los observados. El filo dominante fue Proteobacteria, tanto en los tratamientos PA y PB como en el control, los otros más abundantes fueron Bacteroidetes, Planctomycetes y Actinobacteria. La diversidad gamma fue mayormente influenciada por la diversidad alfa, mientras que la diversidad beta disminuyó conforme avanzó el experimento. La adición de probióticos comerciales no influyó de manera significativa en el crecimiento específico, supervivencia y factor de conversión alimenticia del camarón en comparación con el control.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
ACTA DE APROBACIÓN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
INDICE DE TABLAS	viii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
I.1. Antecedentes	9
I.2. Hipótesis	11
I. 3. Objetivos	11
<b>II. METODOLOGIA</b>	<b>12</b>
II.1. Ubicación	12
II.2. Diseño experimental	12
II.3. Colecta de muestras de bacterias	13
II.4. Extracción de ADN	13
II.5. Preparación de la librería	15
II.6. Secuenciación	17
II.7. Clasificación taxonómica	18
II.8. Índices de diversidad	18
II.9. Parámetros productivos del camarón	20
II.10. Predictores de diversidad y análisis estadístico	21
<b>III RESULTADOS</b>	<b>22</b>
III.1. Diversidad	22
III.1.1. Clasificación taxonómica	22
III.1.2. Alfa, beta y gamma diversidad	35
III.2. Riqueza de bacterias	37
III.3. Respuesta productiva	39

<b>IV</b>	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	40
<b>V</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	51
	V.1. Conclusiones	51
	V.2. Recomendaciones	52
<b>VI</b>	<b>LITERATURA CITADA</b>	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Perfil bacteriano de los biofloculos colectados en los tres tratamientos, durante las semanas 1, 3 y 6.	29
2	Porcentaje de bacterias clasificadas y no clasificadas en el tratamiento PA en la semana 6. La detección bacteriana se realizó mediante análisis metagenómico del gen 16S ARNr, considerando las regiones V3 y V4.	30
3	Porcentaje de bacterias clasificadas y no clasificadas en el tratamiento PB en la semana 6. La detección bacteriana se realizó mediante análisis metagenómico del gen 16S ARNr, considerando las regiones V3 y V4.	31
4	Porcentaje de bacterias clasificadas y no clasificadas en el tratamiento C en la semana 6. La detección bacteriana se realizó mediante análisis metagenómico del gen 16S ARNr, considerando las regiones V3 y V4.	32
5	Estimadores de riqueza de especies en los tratamientos y Uniques de los tres tratamientos en función del tiempo.	37



## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Número de lecturas clasificadas hasta nivel de dominio y filo obtenidas después del proceso de secuenciación del gen 16S ARNr. La clasificación se llevó a cabo mediante el software Kraken. Tratamientos con las mezclas de probióticos a (PA), probióticos b (PB) y en el control (C).	24
2	Lecturas obtenidas por filotaxonomía y por muestreo en el biofloc del tratamiento que recibió la mezcla de probióticos A (PA).	25
3	Lecturas obtenidas por filotaxonomía y por muestreo en el biofloc del tratamiento que recibió la mezcla de probióticos B (PB).	26
4	Lecturas obtenidas por filotaxonomía y por muestreo en el biofloc del tratamiento control (C).	27
5	Géneros de bacterias más abundantes en los bioflóculos del cultivo hiper-intensivo de camarón blanco <i>L. vannamei</i> durante los tres periodos de muestreo, en el tratamiento PA.	33
6	Géneros de bacterias más abundantes en los bioflóculos del cultivo hiper-intensivo de camarón blanco <i>L. vannamei</i> durante los tres periodos de muestreo, en el tratamiento PB.	34

7	Géneros de bacterias más abundantes en los bioflóculos del cultivo hiper-intensivo de camarón blanco <i>L. vannamei</i> durante los tres periodos de muestreo, el tratamiento control.	35
8	Índices de $\alpha$ diversidad (H), e índice de equitabilidad (J) de los filos de bacterias presentes en el biofloc colectado en cada tratamiento, durante tres periodos de muestreo.	36
9	Diversidad $\beta$ de filos de bacterias registrados en los bioflóculos generados con las mezclas de probióticos A (PA) y B (PB) respecto al control (C).	37
10	Índices de diversidad gamma de los filos de bacterias encontrados en los bioflóculos de un cultivo hiper-intensivo de camarón blanco en las semanas 1, 3 y 6.	37
11	Parámetros productivos de <i>Litopenaeus vannamei</i> (media y desviación estándar) obtenidos en estagues inoculados con probióticos comerciales (PA y PB) y control (C).	40

## **I. INTRODUCCIÓN.**

La acuicultura es el sector de la industria alimenticia que presenta la mayor tasa de crecimiento; su aporte es tan importante que, del total de especies acuícolas consumidas en el mundo, el 42.2 % provienen de esta actividad (FAO, 2014). Además de ser generadora de empleos y divisas, destaca su aporte de alimentos de alta calidad proteica, lo que contribuye a la seguridad alimentaria.

De acuerdo a la FAO (2016), la especie de camarón *Litopenaeus vannamei* es la sexta más cultivada en el mundo. Su principal productor es China; tan solo en ese país se cultiva el 39.1% del total de la producción mundial. En América Latina, Ecuador es el principal país productor con un aporte del 6.49% de la producción mundial, lo cual lo posiciona en la quinta posición. Por su parte, México se encuentra en el séptimo lugar a nivel mundial con un aporte del 2.31% y como segundo a nivel continental (FAO, 2012; CONAPESCA, 2013).

### **Problemática de enfermedades**

En los últimos años se han presentado grandes mortalidades en granjas de camarón debido a la aparición y epizootias. Tan solo en México, la producción de camarón por acuicultura cayó de 100,000 toneladas en el 2012 a 60,292 en el 2013, es decir, una reducción de alrededor del 40 % (CONAPESCA, 2013).

La intensificación de la acuicultura, particularmente la camaronicultura, ha provocado un cambio en las condiciones ambientales, bajo las cuales algunas bacterias patógenas han proliferado causando severas enfermedades (Verschuere *et al.*, 2000; Quintana, 2001).

Debido a las grandes pérdidas de producción causadas por la aparición de enfermedades, se han tenido que adoptar algunas alternativas tales como el uso de sistemas de cultivo con mínimo o

cero recambio de agua (Samocha *et al.*, 2007; Mishra *et al.*, 2008). En este contexto, la tecnología del biofloc, además de su aporte a la nutrición del camarón, representa una potencial solución de problemas de bioseguridad. Este sistema se basa en la manipulación de la comunidad microbiana mediante la adición de fuentes de carbono para promover el crecimiento de bacterias heterótrofas (Crab *et al.*, 2007; Crab *et al.*, 2009). La bioseguridad del biofloc es tal, que diversos autores mencionan que éste genera un efecto probiótico propio; adicionalmente, las bacterias benéficas inhiben el crecimiento poblacional de las cepas patógenas (Thompson *et al.*, 1999; Aguilera-Rivera *et al.*, 2014; Martínez-Córdova *et al.*, 2015).

Estas bacterias aportan estabilidad al cultivo produciendo biomasa en forma de partículas floculadas (biofloc) que promueven el desarrollo de una variedad de microorganismos. En condiciones heterotróficas, las microalgas y las bacterias heterótrofas pueden ser los colonizadores tempranos de las superficies, y las biopelículas se estabilizan mediante sustancias poliméricas extracelulares, formando una biopelícula semisólida. Los polisacáridos extracelulares de las microalgas pueden ser utilizados por organismos heterótrofos como fuente de carbono (Bruckner *et al.*, 2008; Arora *et al.* (2012).

Los nutrientes orgánicos promueven el crecimiento de bacterias heterótrofas; mientras que la presencia de amonio y de nitritos causan la proliferación de bacterias nitrificantes, compuestas entre otras por los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* (Timmons *et al.* 2006).

El conjunto de bacterias y de micro-zooplankton se convierten en una fuente adicional de alimento para los camarones (Tacon *et al.*, 2002; Burford *et al.*, 2004; Wasielesky *et al.*, 2006; Azim y Little, 2008; De Schryver *et al.*, 2008).

La manipulación de la microbiota a través del uso de probióticos, puede ser una práctica conveniente para controlar o inhibir bacterias patógenas en la acuicultura; así como para mejorar actividad enzimática digestiva y mejorar la respuesta inmune del camarón (Balcázar *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2010; Zokaeifar *et al.*, 2012).

### **Cultivo de camarón en presencia de biofloc**

El valor nutricional de algunos consorcios microbianos, ha sido ampliamente documentado por varios autores (Burford *et al.*, 2003; Crab *et al.*, 2010; López-Elías *et al.*, 2015), llegando a ser reconocidos como fuente de proteína, lípidos, carbohidratos, minerales y vitaminas. En particular se ha confirmado la presencia de ácidos grasos esenciales y aminoácidos esenciales, así como un perfil de vitaminas adecuado para la nutrición del camarón (Ju *et al.*, 2008; Avnimelech *et al.*, 2009; Glencross, 2009).

En las etapas post-larvales, el camarón no puede capturar eficientemente microorganismos directamente de la columna de agua; pero sí puede hacerlo cuando están adheridos a superficies fijas o flotantes, incluyendo el fondo y las paredes de las unidades de cultivo. En base a lo anterior, se han diseñado estrategias para aprovechar a los microorganismos asociados a biopelículas (biofilms) o a bioflóculos (flóculos microbianos) (Avnimelech, 2006).

Los bioflóculos son un conglomerado de bacterias, microalgas, hongos, ciliados protozoarios, cianobacterias y sólidos suspendidos en la columna de agua. Funcionalmente representan un microcosmo donde ocurren al mismo tiempo actividades autotróficas y heterotróficas, con procesos de intercambio con el medio externo. Internamente en el biofilm es posible encontrar micro-nichos en los cuales pueden ocurrir procesos antagónicos (aeróbicos y anaeróbicos) (Burford *et al.*, 2002; Avnimelech, 2007). Estas características proporcionan una gran

capacidad de remoción de nutrientes. Los microorganismos que forman el biofilm o el bioflóculo, son muy importantes en la transferencia de materia orgánica a través de los niveles tróficos, aumentando la eficiencia de las cadenas alimentarias y contribuyendo a mantener la calidad del agua (Avnimelech, 2007).

Algunas de las sustancias identificadas producidas por bacterias provenientes de cultivos en biofloc y que benefician al sistema inmune de camarones, incluyen carotenoides, retinoides, polihidroxitirato y exoenzimas (Bairagi *et al.*, 2002; Hsieh *et al.*, 2007; Nhan *et al.*, 2010).

### **Uso de probióticos**

A lo largo de los años y en la industria alimenticia en general, se ha recurrido a sustancias que promueven un mayor crecimiento y rendimiento de los sistemas de cultivo; por ejemplo, hormonas, antibióticos, ionóforos y algunas sales (Fuller, 1992; Góngora, 1998; Klaenhammer y Kullen, 1999). La principal desventaja de estos aditivos, es que el uso incorrecto o excesivo, tiende a provocar efectos adversos tanto para el animal como para el ambiente, e incluso en el consumidor final (Lamberth *et al.* 1999). En el caso de los antibióticos, el uso inadecuado permite que las bacterias patógenas adquieran resistencia (Hansen y Olafsen, 1999; Alabi, 2000); además, durante los recambios de agua, los antibióticos se depositan en el sedimento y provocan alteraciones en la microbiota.

Esta situación abrió el camino para la búsqueda de alternativas que permitieran disminuir o eliminar el uso de antibióticos, surgiendo así los probióticos. La FAO / OMS (2001) han definido los Probióticos como “microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio de salud en el huésped”. Entre los probióticos más utilizados se encuentran las bacterias lácticas, bifidobacterias y las levaduras. Algunos probióticos ya se

comercializan en forma de preparados, que contienen uno o varios microorganismos vivos, los cuales han permitido mejoras en el crecimiento, supervivencia y resistencia a enfermedades de diferentes organismos acuáticos (Himabindu *et al.*, 2004; Dotta *et al.*, 2011).

El uso de probióticos es una práctica aceptada y biosegura (Sissons 1989; Fernández, 2005). Los probióticos mejoran el estado de salud de los huéspedes, diferentes autores han observado que algunas bacterias probióticas pueden modificar la microbiota bacteriana del tracto digestivo los organismos acuáticos, aumentando su resistencia a patógenos (Bricknell y Dalmo, 2005; Jayaprakash *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2010). En peces se ha observado que la presencia de bacterias benéficas, genera un patrón complejo en la expresión génica. Los genes expresados incluyen aquellos implicados en la estimulación de la proliferación epitelial, la promoción de nutrientes para mejorar el metabolismo digestivo, así como una mejora en la respuesta inmune innata (Pérez *et al.*, 2010).

Además de los beneficios mencionados, algunas bacterias benéficas también contribuyen a mantener una mejor calidad del agua durante el periodo de cultivo (Wang *et al.*, 2005; Lakshmanan y Soundarapandian, 2008; Silva *et al.*, 2012) generando un ambiente más estable que permite incrementar la supervivencia y el crecimiento de los organismos cultivados (Zhou *et al.*, 2009; Martínez-Córdova *et al.*, 2015).

### **Diversidad ecológica**

A pesar de que los probióticos tienen un uso generalizado en acuicultura, no existen estudios detallados que permitan evaluar su efecto sobre la diversidad de bacterias autóctonas preexistentes en los sistemas de cultivo. La diversidad de especies es un tema de interés tanto en ecología de comunidades como en la conservación biológica. La importancia de su estudio

se centra en una posible relación con el funcionamiento de los ecosistemas, así como en su modificación por diversas actividades humanas (Maclaurin y Sterelny, 2008).

La idea de dividir a la diversidad en tres componentes, alfa, beta y gamma, fue acuñada por Whittaker (1960) y aún sigue siendo un esquema muy utilizado para realizar un análisis completo de la diversidad de especies (Whittaker et al., 2001). El número de especies en una comunidad se conoce como diversidad alfa ( $\alpha$ ). La cual corresponde a la riqueza de un hábitat (Whittaker, 1960, 1972). La dimensión de dicho hábitat es muy relativa, ya que pueden ser unidades de  $\text{cm}^3$  para bacterias, hasta  $\text{km}^2$  para vertebrados (Whittaker *et al.*, 2001). La diversidad alfa abarca dos variables importantes: la riqueza y abundancia relativa de especies.

Se han propuesto numerosos índices para caracterizar la riqueza de especies, entre ellos el índice de Margalef (1958), y el de de Menhinick (1964); mientras que para evaluar la equitabilidad se han utilizado los índices de Pielou (1969), de Sheldon (1969) y de Heip (1974). Sin embargo, los índices que proporcionan mayor información son los que combinan tanto la riqueza de especies como la equitabilidad en un solo valor, los cuales se denominan como índices de diversidad. Para calcular diversidad alfa, se han usado los índices de Fisher (Fisher *et al.* 1943), de Simpson (Simpson 1949) y el de Shannon-Wiener (Shannon y Weaver, 1949). Este último es uno de los más utilizados por ecólogos.

En el índice de Shannon-Wiener, el valor mínimo puede aproximarse al cero y el valor máximo, en teoría, no está acotado a un límite. Este índice puede aumentar por dos motivos: a) un aumento en la riqueza de especies, y/ o b) un aumento en la equitabilidad de especies. Es decir, cuando el índice de diversidad alfa aumenta, el número del índice en sí es insuficiente para determinar si el cambio fue debido a un aumento en la riqueza o a la equitabilidad de especies (Carmona y Carmona, 2013).



### *Beta diversidad*

La beta diversidad, o grado de recambio de especies, se evalúa considerando las diferencias de especies entre las muestras. Los métodos para cuantificar la diversidad beta se pueden dividir en dos clases: los de similitud-disimilitud y los de recambio/ reemplazo de especies (Villareal *et al.*, 2006).

Los métodos de similitud-disimilitud expresan el grado de semejanza en composición de especies y sus abundancias en dos comunidades. Existen diversos índices dentro de este grupo de métodos como el de Jaccard (1908), Sorensen o Morisita-Horn (Magurran, 1988). Por otro lado, los métodos de recambio/reemplazo expresan el grado de complementación respecto a la composición entre dos o más muestras considerando las especies exclusivas de cada una; en este método se emplean índices como el de Whittaker, Cody o Magurran (Villareal *et al.*, 2006).

### *Gamma diversidad.*

La diversidad total de especies de una región, es resultado de la combinación de la diversidad a nivel local (diversidad alfa), y de la disimilitud en la composición de especies entre comunidades (diversidad beta); componentes básicos para entender los patrones de variación espacial de la diversidad (Whittaker, 1960). Los índices de diversidad alfa y beta pueden combinarse de muchas maneras para dar como resultado la diversidad gamma (Wilson y Shmida, 1984; Shmida y Wilson, 1985).

Para interpretar la gamma diversidad se deben considerar la alfa y beta diversidad, puesto que la variación de gamma puede ser manipulada por cualquiera de las dos. En una región, una alta diversidad gamma puede explicarse por una también alta riqueza de especies (alfa) en todas sus localidades. Mientras que en otra región, en contraste, una alta diversidad gamma puede ser debido a un fuerte recambio de especies (beta), a pesar de una baja diversidad entre las localidades (Rodríguez y Vázquez-Domínguez, 2003).

Generalmente, el estudio de la biodiversidad requiere la aplicación de los índices anteriormente señalados para llevar a cabo una adecuada interpretación de los resultados obtenidos. El objetivo final de estos índices es resumir la información en un solo valor, lo cual permite unificar cantidades para realizar comparaciones (Villarreal *et al.*, 2006). Los principales parámetros utilizados para estimar la diversidad en comunidades microbianas son riqueza de especie, índice de Shannon-Weaver, índice de Simpson y equidad (De la Cruz-Leyva *et al.*, 2014).

## **I.1 Antecedentes**

En la mayoría de las investigaciones donde se incluye información sobre el análisis de microorganismos en la acuicultura, se utilizan metodologías basadas en la microscopía óptica, bioquímica o electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (Bourne *et al.*, 2004; Becerra-Dorame *et al.*, 2011). Sin embargo, existen a la fecha técnicas de mayor resolución; por ejemplo, Martínez Córdova *et al.* (2016), realizaron un estudio sobre la diversidad bacteriana de un sistema de cultivo fotoautotrófico de camarón, utilizando la técnica de secuenciación masiva o secuenciación de última generación del gen 16S ARNr. Estos autores encontraron que

las bacterias más destacadas en el biofilm pertenecen a los filos Proteobacterias (47%), seguido de Chlamydiae/Verrucomicrobia (11%), Bacteriodetes (8%) y Planctomycetes (5%).

Por otro lado, Monroy-Dosta *et al.* (2013), evaluaron la composición y abundancia de bacterias asociadas al biofloc en un cultivo de tilapia, y reportaron la presencia de géneros como *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Nitrospira*, *Nitrobacter*, así como la levadura *Rhodotorula*. Para estos análisis utilizaron técnicas de siembra en placa propuestas por American Public Health Association, APHA (1992), basadas en diferentes medios de cultivo como MSR (Man-Rogosa Sharpe), BHI (Infusión Cerebro-Corazón), TCBS (Tiosulfato-Citrato-Sales Biliares) y TSA (Tripticasa-soja), seguido de una identificación a través de pruebas bioquímicas.

A pesar de que últimamente ha habido un crecimiento constante en el uso de probióticos en acuicultura, la mayoría de las especies bacterianas que prosperan dentro de los sistemas de cultivo y sus funciones, siguen siendo poco estudiadas. Las técnicas tradicionales de cultivo en placas usadas hasta hace poco, son muy limitadas. Se estima que los métodos de cultivo tradicionales permiten evaluar solo el 1% de la diversidad (Barer y Harwood 1999, Crosi *et al.* 2007).

La metagenómica dirigida a genes específicos como biomarcadores taxonómicos (también conocida como genómica de comunidades o genómica ambiental), surge como una tecnología que estudia la estructura de las comunidades microbianas, principalmente no cultivables. Gracias a esta herramienta, es posible analizar genes específicos dentro de los nichos microbianos. Estos genes, pueden ser utilizados para identificar bacterias u otros procariontes (Chistoserdova, 2010; Nielsen *et al.*, 2014).

El uso de la metagenómica en la acuicultura ha sido muy limitado, ya que esta tecnología se ha utilizado más en las áreas de medicina y ecología. Una de las principales limitantes para su aplicación es su alto costo; por ello, se ha justificado más el gasto en la salud humana, así como en el interés de entender la dinámica de los microorganismos en el ambiente (Steele y Streit 2005; Kurokawa *et al.*, 2007).

En general, los estudios microbianos que se han hecho en la acuicultura se centran en la comprensión de las interrelaciones simbióticas y antagonistas entre microbios y sus hospederos como los peces, crustáceos y moluscos. En este sentido, la metagenómica puede proporcionar una visión más profunda de estas relaciones mediante la interpretación de la información revelada por el ADN extraído directamente del consorcio de microorganismos presentes en los ambientes de cultivos acuícolas (Suttle, 2007; Gianoulis *et al.*, 2009).

Para analizar la diversidad microbiana mediante metagenómica dirigida, se requiere del diseño de primers (cebadores) específicos, dirigidos a regiones conservadas del gen ribosomal 16S (16S ARNr). Varias regiones del gen 16S ARNr se han utilizado durante años para la identificación taxonómica de procariontes, particularmente las regiones variables de la V1 a la V9 (Chakravorty *et al.*, 2007; Frank *et al.*, 2008).

Después de realizar el análisis metagenómico de una comunidad, se obtienen millones de lecturas clasificadas en distintos niveles taxonómicos. Un punto crucial en la investigación es la manera de interpretar los datos obtenidos en dicha secuenciación. Para estudiar la biodiversidad es importante plantearse tres preguntas estratégicas: ¿Qué elementos la componen?, ¿Cómo están organizados? y ¿Cómo interactúan entre sí? (Noss 1990). De esta forma, se logrará organizar la información de una manera más adecuada e ir más allá de un simple listado de

clasificaciones taxonómicas. También es importante relacionar la diversidad obtenida con una escala geográfica del sitio muestreado, es decir, si es local o regional; para posteriormente asociarla a las medidas de diversidad alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) y/o gamma ( $\gamma$ ) (Moreno 2001; Villarreal *et al.*, 2006).

## **I.2 Hipótesis**

Los tratamientos con inclusión de probióticos comerciales tendrán mayores índices de diversidad bacteriana, y una mejora significativa en la respuesta productiva del camarón en comparación con un cultivo control.

## **I.3 Objetivos**

### **Objetivo general**

Describir la diversidad de bacterias presentes en bioflóculos desarrollados en cultivos hiperintensivos de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en fase de maternización con y sin adición de probióticos y relacionarlos con los parámetros productivos.

### **Objetivos particulares**

1. Obtener las diversidades alfa y beta de los filos de bacterias presentes en bioflóculos desarrollados en los diferentes tratamientos mediante índices ecológicos aplicables.
2. Comparar el microbioma entre los tratamientos mediante predictores cuantitativos y cualitativos.
3. Analizar la respuesta productiva de los camarones sometidos a los distintos tratamientos para determinar si la adición de probióticos mejoró significativamente el desempeño productivo.

## **II. METODOLOGIA**

### **II.1. Ubicación**

El estudio se llevó a cabo en las instalaciones de la empresa Proveedora de larvas S.A. de C.V., ubicada en la localidad de La Guasima, en el municipio de El Rosario, Sinaloa.

### **II.2. Diseño experimental.**

Se utilizó un diseño completamente al azar con dos tratamientos y un control por triplicado. En el tratamiento PA se aplicaron los probióticos Efinol PT y Lab. Robles (relación 50-50); mientras que el tratamiento PB recibió Epicin ponds y Epicin hatcheries (relación 50-50). El tratamiento control (C) no recibió dosis de probióticos.

Los probióticos comerciales fueron incubados previo a su adición a los estanques de cultivo. Los bioaumentos se realizaron por 24 h en tanques de plástico de 2 m<sup>3</sup> de capacidad (100 g de probiótico y 500 g azúcar sin refinar por m<sup>3</sup> de agua). El producto de la incubación fue agregado cada tres días (tratamientos PA y PB) partiendo de seis días previos a la siembra de las postlarvas, a razón de 1 ppmil. Los probióticos utilizados y sus relaciones se basaron en los protocolos de operación de la empresa.

Los organismos se alimentaron con alimento comercial para camarón con 35% de proteína cruda. En los tratamientos PA y PB, se adicionó melaza diariamente como fuente de carbono para mantener una relación C:N de 13:1. En el tratamiento control no se hicieron aplicaciones de bioaumentos bacterianos, ni de fuente de carbono adicional, por lo que la relación C:N fue de 9:1.

Los tanques de cultivo se ubicaron dentro de invernaderos con fondo recubierto con plástico de alta densidad. La aireación se proporcionó mediante aireadores de 10 Hp a razón de 150 Hp/Ha. La conducción del aire se llevó a cabo por medio de tubería de PVC de 4", la cual alimentó dos baterías de parrillas de aireación con manguera porosa tipo "aerotubo".

Se utilizaron postlarvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* con un peso promedio inicial de 0.0073g. Los organismos fueron sembrados a una densidad de 500 ind/m<sup>2</sup> en tanques con un volumen de 2,000 m<sup>3</sup>. El periodo de cultivo duró 42 días. Al final del experimento, se determinó la ganancia en peso (GP), la tasa de crecimiento específica (CE), la supervivencia (S), la biomasa total (BT) y el factor de conversión alimenticia (FCA).

### **II. 3. Colecta de muestras de bacterias**

Durante las semanas 1, 3 y 6 del experimento (periodos: inicial, medio y final) se tomaron muestras de agua (200 mL) de todas las unidades experimentales. Las muestras fueron colectadas en bolsas estériles Whirl-Pak® de 250 mL de capacidad, las cuales se colocaron inmediatamente en hielo y se transportaron al laboratorio. Una vez en el laboratorio se eliminó el sobrenadante y el biofloc precipitado se colocó en tubos falcon de 15 mL. Para cada tratamiento se obtuvo una mezcla (de 3 réplicas) correspondiente a las etapas inicial, intermedia y final del cultivo. Las muestras finales se colocaron en un ultracongelador Thermo a -80 °C hasta su procesamiento.

### **II.4. Extracción de ADN**

Una vez concluido el cultivo, las muestras congeladas fueron trasladadas al Laboratorio de Biología Experimental (CTAOA) del CIAD.

La extracción de ADN libre de inhibidores y alto peso molecular, se realizó directamente de la muestra de bioflóculo, con el fin de obtener bacterias cultivables e incultivables. Se utilizó el kit comercial PowerBiofilm® (MO BIO Laboratories, Solana Beech, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit actúa bajo una combinación de lisis química y mecánica de las células procariontes, además de eliminar la presencia de inhibidores (tales como ácido húmico, metales, sales y pesticidas), típicamente presentes en tapetes microbianos (MO BIO Laboratories, Solana Beech, CA, USA).

Para iniciar la extracción de ADN se homogenizaron las muestras de bioflóculos en un vortex Fisher Scientific™ e inmediatamente se transfirieron 1.5 mL a un tubo de colecta (Collection Tube®) de 2 mL incluido en el kit de extracción. La muestra se centrifugó a 13,000 xg por 1 minuto en una centrífuga Thermo Sorvall Legend XTR; posteriormente se removió el líquido sobrenadante y se pesó la cantidad de sedimento sugerida por el kit (0.05 a 0.20 gr).

La extracción de ADN comienza con una lisis química mediante la adición de dos diferentes soluciones (BF1 y BF2) incluidas en el kit; después de agregar la segunda solución las muestras se incubaron a 65°C por 5 minutos en una incubadora RS-PB-200 Dual Poly Pro Bath. Posteriormente, se continuó con una lisis mecánica utilizando un homogenizador FastPrep-24™ 5G donde se realizaron 3 ciclos de 30 segundos c/u a 6 m/s; una vez homogéneas, las muestras se centrifugaron a 13,000 xg por 1 minuto. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo. Posteriormente se adicionó el resto de las soluciones incluidas en el kit hasta agregar por último la solución BF7 la cual es un buffer de elución estéril (10 mM Tris) libre de sales.

Una vez concluida la extracción de ADN, se realizó una lectura en un espectrofotómetro NanoDrop Lite para evaluar la concentración y pureza de los ácidos nucleicos; para lo cual se



tomó 1  $\mu$ L de agua libre de nucleasas grado Biología Molecular (SIGMA) como blanco y 1  $\mu$ L de muestra para la estimación; se midió la concentración en ng/ $\mu$ L y la pureza mediante la relación A260/A280.

Para obtener un dato más preciso de la calidad de ADN, las muestras se procesaron en un equipo de micro-electroforesis capilar 2200 TapeStation (Agilent, Palo Alto CA, USA). Se tomó 1  $\mu$ L de la solución que contenía el ADN extraído de las muestras y se mezcló con 10  $\mu$ L de buffer gDNA (Agilent). Como referencia se utilizó 1  $\mu$ L de gDNA Ladder (Agilent). Posterior a la mezcla se tomó 1  $\mu$ L de cada muestra y se insertó en un chip para microfluidos (gDNA ScreenTape; Agilent) para medir cantidad y calidad de ADN (considerando fragmentos de ADN de 200 a >60 000 pb). Finalmente, el chip de microfluidos que contenía las muestras, se introdujo en el equipo 2200 TapeStation (Agilent). Todas las muestras con calificaciones DIN (DNA integrity number) superiores a 7, fueron consideradas para la preparación de la librería.

## **II.5. Preparación de librería**

Para la preparación de la librería de amplicones, se usó la “Guía de preparación de librería para la secuenciación del gen 16S” de Illumina. El protocolo está diseñado para llevar a cabo la amplificación, purificación y secuenciación del fragmento que contiene las regiones V3 y V4, considerando los cebadores reportados por Klindworth *et al.* (2012), los cuales se combinaron con el código de barras de adaptadores de secuenciación e indicadores duales (las secuencias en negrita indica los adaptadores u “over-hang adapters”).

Adaptador Forward del amplicon 16S para PCR + adaptador over hang = 5' -  
**TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG**-3'

Adaptador Reverse del amplicon 16S para PCR + adaptador Over hang = 5'-  
**GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAAT**  
CC-3'

Utilizando una mezcla con un volumen total de 25 µl compuesta por ADN molde, 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPA Biosystems, Woburn, MA, EE.UU.) y los adaptadores anteriormente señalados, se realizó una primera PCR en un termociclador DNA Engine Dyad® bajo las condiciones del siguiente ciclo térmico: una desnaturalización inicial a 95 ° C durante 3 min; un emparejamiento de 25 ciclos de 95 ° C por 10 s, 55 ° C por 30 s, 72 ° C por 30 s, y una extensión final a 72° C durante 5 min. A partir de entonces, los amplicones resultantes entre 450 y de 550 pb fueron sometidos a un proceso de limpieza utilizando el protocolo de perlas magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter, EE.UU.) para purificarlos y eliminar cebadores libres, así como especies de dímeros de cebadores.

Una vez concluida la primera limpieza de los productos de PCR, se continuó con el indexado de muestras, utilizando índices duales y adaptadores de secuenciación del kit Nextera Index XT (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.) y 2x KAPA HiFi HotStart Readymix (KAPA Biosystems), siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante. Posterior al indexado, se realizó una nueva PCR bajo las condiciones del siguiente ciclo térmico: desnaturalización a 95 ° C durante 3 min; emparejamiento de 8 ciclos de 95 ° C por 10 s, 55 ° C por 30 s, 72 ° C por 30 s, y una extensión final de 72° C durante 5 min. Concluida la PCR, la biblioteca se purificó de nuevo repitiendo el proceso de limpieza mediante perlas AMPure XP (Ampure XP: High Wycombe, Reino Unido).

Por último, la biblioteca resultante fue clasificada y cuantificada mediante electroforesis (2200 TapeStation; Agilent, EE.UU.) utilizando chips de microfluidos (D1000 Screen Tape; Agilent, USA) con un rango de análisis de 35 a 1000 pb. Para esto se tomaron 2  $\mu$ L de muestra de la biblioteca indexada y se mezclaron con 2  $\mu$ L de buffer High Sensitivity D1000; finalmente las muestras fueron insertadas en Screentapes High Sensitivity D1000 y analizadas con el equipo 2200 TapeStation para conocer la concentración de amplicones purificados y continuar con la secuenciación.

## **II.6. Secuenciación**

Las bibliotecas se ajustaron a una concentración de 4 nM usando Tris 10 mM (pH 8,5) como diluyente y se agruparon en la misma proporción. A partir de entonces, las bibliotecas se desnaturalizaron con NaOH 0,2 N. Una librería estándar de Control PhiX (Illumina) basada en *E. coli* también se desnaturalizó y se utilizó como control interno, lo que también permite calcular las tasas de error ya que es una secuencia corta de genoma bien definido. Tanto la biblioteca desnaturalizada como el Control PhiX, se ajustaron a una concentración de 8 pM y fueron mezclados (95% de la biblioteca + 5% PhiX Control). Finalmente, la mezcla se calentó a 96 ° C durante 2 min y se enfrió inmediatamente en hielo por 5 min. Las muestras se cargaron en un cartucho MiSeq v3 Reagent Tray (Illumina), que contenía una MiSeq v3 Flow Cell (Illumina) con capacidad de 25 millones de lecturas. Los resultados se obtuvieron después de 600 ciclos (2 x 300).

## **II.7. Clasificación taxonómica**

La clasificación taxonómica de bacterias se llevó a cabo mediante el programa Kraken, disponible en el portal de BaseSpace de Illumina. Esta herramienta está diseñada para asignar niveles taxonómicos a las secuencias metagenómicas obtenidas durante la secuenciación y utiliza el alineamiento exacto de la secuencia problema con la base de datos de  $k$ -meros, lo cual lo convierte en una herramienta rápida en comparación con las que realizan el alineamiento inexacto (Wood y Salzberg, 2014).

## II.8. Índices de diversidad

### Diversidad alfa

La  $\alpha$  diversidad se determinó por medio del índice de Shannon-Wiener (Shannon y Weaver, 1949) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$H' = - \sum_{i=1}^S P_i \ln (P_i)$$

Donde:

S = número de especies

P<sub>i</sub> = proporción de individuos de la especie i

El valor de H' = 0 cuando la muestra tiene solo una especie; H' tiene un valor máximo cuando todas las especies S están representadas por el mismo número de individuos.

La equitabilidad se estimó con el índice de Pielou (Pielou, 1969), mediante la fórmula:

$$J' = \frac{H'}{H'_{Max}}$$

Donde:

$$H'_{\max} = \ln(S)$$

H = valor del índice de Shannon-Wiener

### **Diversidad beta**

Para la  $\beta$  diversidad se utilizó el índice de similitud de Jaccard, mediante la siguiente formula:

$$I_j = \frac{c}{a + b - c}$$

Donde:

a es el número de especies en el sitio A.

b es el número de especies en el sitio B.

c es el número de especies presentes en ambos sitios

El rango de este índice va desde cero (cuando no hay especies compartidas), hasta 1 (cuando ambos sitios comparten las mismas especies).

### **Diversidad gamma**

Se estimó utilizando el método de Schluter y Ricklefs (1993), mediante la siguiente ecuación:

$$\gamma = \alpha_{prom} \times \beta \times \text{dimensión de la muestra}$$

Donde

Diversidad alfa promedio = número promedio de especies en una comunidad

Diversidad beta = inverso de la dimensión específica, es decir 1/número promedio de comunidades ocupadas por una especie.

Dimensión de la muestra = número total de comunidades

El cálculo se realizó basado en el índice de Shannon (Lande, 1996), mediante la siguiente ecuación:

$$H'beta = - \sum_i P_i \ln P_i - \sum_j q_j H_j$$

Donde,

$$P_i = \sum_j q_j p_{ij}$$

que representa la frecuencia promedio de la especie  $i$  en el conjunto de comunidades, ponderada en función de la importancia de las comunidades ( $q_j$ ). En este estudio la ponderación se realizó en función del área de cultivo, dado que todos tuvieron la misma área entonces la ponderación fue de 0.333 para cada comunidad.

## II.9. Parámetros productivos del camarón.

Para determinar el crecimiento específico del camarón se utilizó la ecuación sugerida por Sánchez-Romero *et al.* (2013):

$$CE \left( \frac{\%}{\text{día}} \right) = \frac{[ \text{Ln peso final (g)} - \text{Ln peso inicial (g)} ]}{\text{tiempo de cultivo}}$$

El factor de conversión alimenticia se estimó con la siguiente ecuación:

$$FCA = \frac{\text{Alimento agregado (kg)}}{\text{Ganancia en peso (Kg)}}$$

## **II.10. Predictores de diversidad y Análisis estadístico**

Los estimadores de diversidad se calcularon usando técnicas multivariadas en base a patrones del muestreo utilizando el programa EstimateS 9.1.0 (Colwell, 2013).

Con los parámetros productivos de camarón se realizaron análisis de varianza de una vía para determinar si hubo diferencias significativas entre los tratamientos ( $\alpha = 0.05$ ). Para el procesamiento de los datos se utilizó el software Statistica 5.1 para Windows, Statsoft Inc.

### **III. RESULTADOS**

#### **III. 1. Diversidad**

##### **III.1.1. Clasificación taxonómica**

El total de lecturas obtenidas del análisis metagenómico del gen 16S ARNr fueron diferentes entre los tratamientos, así como entre los tres periodos de muestreo. Las lecturas clasificadas como bacterias en el tratamiento PA variaron de 13,838 a 565,762; en el PB de 565,038 a 1,075,034 y en el C de 314,291 a 690,905, durante las semanas 1 a la 6, sin una tendencia clara en función del tiempo de cultivo (Tabla 1). Durante el estudio, el porcentaje de lecturas identificadas a nivel de Filo varió entre 62.4 y 83.7 %; sin embargo, al finalizar el periodo de muestreo (semana 6), los porcentajes fueron muy similares entre los tres tratamientos, variando de 71 a 74%.

Debido a la enorme cantidad de información obtenida, en adelante se hará un análisis de la diversidad bacteriana a nivel de Filo y al final se abordarán los principales géneros de bacterias que estuvieron presentes en los bioflóculos de cada tratamiento.

En los estanques que recibieron la mezcla de probióticos A, se registraron en total 20 Filos, aunque no todos estuvieron presentes durante los tres muestreos, las cantidades fueron muy similares variando de la siguiente manera: semana 1=19; semana 3=16 y semana 6=18. El filo más abundante fue Proteobacteria (49.99-53.66 %), seguido por Planctomycetes (9.62 -18 %) y Bacteroidetes (11.41 – 29.66%) (Tabla 2). La presencia de los tres filios fue consistente y se mantuvieron como los más abundantes durante los tres periodos de muestreo.



Tabla 1. Número de lecturas clasificadas hasta nivel de Dominio y Filo obtenidas después del proceso de secuenciación del gen 16S ARNr. La clasificación se llevó a cabo mediante el software Kraken. Tratamientos con las mezclas de probióticos a (PA), probióticos b (PB) y en el control (C).

	Número de lecturas		
	Núm. de lecturas clasificadas en bacterias	Núm. de lecturas clasificadas a nivel de Filo	% de lecturas clasificadas a nivel de Filo
<b>PA</b>			
Semana 1	13,834	12,005	62.43
Semana 3	393,175	345,359	65.44
Semana 6	565,772	492,009	74.41
<b>PB</b>			
Semana 1	565,038	509,943	75.59
Semana 3	1,075,801	921,110	70.53
Semana 6	719,034	631,312	74.38
<b>C</b>			
Semana 1	391,138	366,696	83.77
Semana 3	690,905	606,199	71.57
Semana 6	314,291	275,148	71.07

En el tratamiento PA, un total de 15 filios se mantuvieron con un porcentaje de lecturas inferiores al 1%; de ellos, Candidatus, Saccharibacteria, Nitrospirae, Synergistetes, Deferribacteres, Cloacimonetes, Aquificae y Thermodesulfabacter no fueron detectados en al menos uno de los tres muestreos.

Tabla 2. Lecturas obtenidas por filos y por muestreo en el biofloc del tratamiento que recibió la mezcla de probióticos A (PA).

Filos	Semana 1 %	Semana 3 %	Semana 6 %
Proteobacteria	53.66	49.99	51.99
Planctomycetes	15.43	9.62	18.00
Bacteroidetes	11.41	29.66	16.49
Cyanobacteria	5.22	1.29	1.22
Chlamydiae	4.62	1.88	1.54
Actinobacteria	4.01	4.00	7.51
Firmicutes	2.98	2.85	2.36
Verrucomicrobia	1.17	0.18	0.08
Candidatus Saccharibacteria	0.41	0	0.03
Thermotogae	0.23	0.12	0.12
Spirochaetes	0.18	0.16	0.08
Tenericutes	0.17	0.06	0.05
Deinococcus-Thermus	0.12	0.04	0.11
ChloroflexI	0.10	0.03	0.37
Nitrospirae	0.07	0	0.01
Synergistetes	0.05	0	0
Acidobacteria	0.05	0.01	0.01
Caldiserica	0.02	0.01	0.01
Deferribacteres	0.02	0	0.01
Cloacimonetes	0	0.01	0
Aquificae	0	0	0.03
Thermodesulfabacter	0	0	0.01

En los estanques que recibieron la mezcla de probióticos B, se registraron en total 19 filos. En la semana 1 fueron 19, 17 en la semana 3 y 18 en la semana 6. Al igual que en el tratamiento PA, el filo más abundante fue el Proteobacteria (49.09-60.81 %), seguido por Bacteroidetes (8.18- 26.56%) y muy cercano a éste estuvo el filo Planctomycetes (6.38-25.05 %) (Tabla 3). Un total de 11 filos presentaron lecturas inferiores al 1%, entre los cuales, Nitrospirae, Synergistetes y Aquificae no fueron detectados en al menos uno de los tres muestreos.

Tabla 3. Lecturas obtenidas por filo y por muestreo en el biofloc del tratamiento que recibió la mezcla de probióticos B (PB).

Filos	Semana 1 %	Semana 3 %	Semana 6 %
Proteobacteria	53.79	60.81	49.09
Planctomycetes	25.07	6.38	11.37
Bacteroidetes	8.18	18.07	26.65
Cyanobacteria	0.69	1.03	1.26
Chlamydiae	2.63	2.49	0.92
Actinobacteria	5.30	6.45	7.29
Firmicutes	3.29	3.73	1.69
Verrucomicrobia	0.52	0.37	0.14
Candidatus Saccharibacteria	0.01	0.04	0.28
Thermotogae	0.11	0.21	0.12
Spirochaetes	0.08	0.07	0.14
Tenericutes	0.04	0.11	0.06
Deinococcus-Thermus	0.06	0.07	0.07
ChloroflexI	0.01	0.05	0.29
Nitrospirae	0.02	0	0.54
Synergistetes	0.09	0.01	0
Acidobacteria	0.01	0.02	0.02
Caldiserica	0.02	0.02	0.03
Aquificae	0.01	0	0.02

En los estanques que no recibieron inoculación de probióticos comerciales (control), se registraron en total 19 filos, de los cuales en la semana 1 aparecieron 15; 16 en la semana 3 y 18 en la semana 6. Similar a los tratamientos PA y PB, el filo más abundante fue el Proteobacteria (43.15-73.88 %), seguido por Bacteroidetes (16.29- 25.56%) y posteriormente el filo Planctomycetes (5.03-9.37 %) (Tabla 4). Un total de 12 filos presentaron lecturas inferiores al 1%, entre los cuales, Nitrospirae, Acidobacteria, Cladiserica, Deferribacteres y Aquificae no fueron detectados en al menos un muestreo.

Tabla 4. Lecturas obtenidas por Filo y por muestreo en el biofloc del tratamiento control (C).

Filos	Semana 1 %	Semana 3 %	Semana 6 %
Proteobacteria	73.88	60.81	43.15
Planctomycetes	5.03	9.37	5.34
Bacteroidetes	15.54	16.29	25.56
Cyanobacteria	0.19	2.07	0.94
Chlamydiae	0.47	2.58	1.21
Actinobacteria	3.99	4.68	11.18
Firmicutes	0.62	3.32	1.94
Verrucomicrobia	0.05	0.28	0.1
Candidatus Saccharibacteria	0.03	0.09	9.2
Thermotogae	0.07	0.18	0.1
Spirochaetes	0.02	0.03	0.15
Tenericutes	0.02	0.05	0.07
Deinococcus-Thermus	0.03	0.05	0.06
ChloroflexI	0.01	0.11	0.38
Nitrospirae	0	0.01	0.56
Acidobacteria	0.01	0	0
Caldiserica	0	0.01	0.01
Deferribacteres	0	0	0.01
Aquificae	0	0	0.01

Los filos que solo aparecieron al final del periodo de estudio fueron Aquificae y Thermodesulfobacter en el tratamiento PA; mientras que en el tratamiento C, fueron Deferribacteres y Aquificae (Tablas 2 y 4).

En los tres tratamientos, un total de siete filos presentaron abundancia superior al 1%. El filo Proteobacteria, fue el más abundante en todos los tratamientos y en todos los periodos de muestreo. En el tratamiento PA se mantuvo con las menores variaciones (53.66, 49.99 y 51.99 %) seguido por el PB (53.79, 60.81, 49.09 %) mientras que el C, mostró los mayores cambios (73.88, 60.81, 43.15%); además, éste último tratamiento mostró una clara tendencia descendente

conforme avanza la edad del cultivo (Figura 1). El segundo filo más abundante fue el Bacteroidetes, en el tratamiento PA el porcentaje inicial de lecturas fue de 11.41 y el final de 16.49 %; en el tratamiento PB inició con 8.18% y finalizó con 26.65%; mientras que para los mismos periodos en el tratamiento C, los porcentajes pasaron de 15.54 a 25.56.

Por otro lado el filo Planctomycetes, se mantuvo con porcentajes similares en los tratamientos PA y C entre el inicio y el final del estudio (15.43 a 18.00 y 5.03 a 5.34), mientras que en el tratamiento PB la tendencia fue descendente pasando de 25.07 a 11.37% entre el primero y el último muestreo.

Además de los siete filos más comunes con una contribución superior al 1%, el resto se agrupó como otros. La suma de los porcentajes correspondientes a este grupo fue baja en los tratamientos PA y PB, los cuales pasaron de 2.67 a 0.89% y de 1.05 a 1.75% respectivamente. Sin embargo, en el tratamiento C se registró un incremento considerable pasando de 0.28 a 10.68% con una clara tendencia a aumentar conforme avanzó el periodo de cultivo. En el tratamiento C, el filo Actinobacteria presentó un incremento considerable pasando de 3.99 a 11.18% entre la semana 1 y la semana 6.

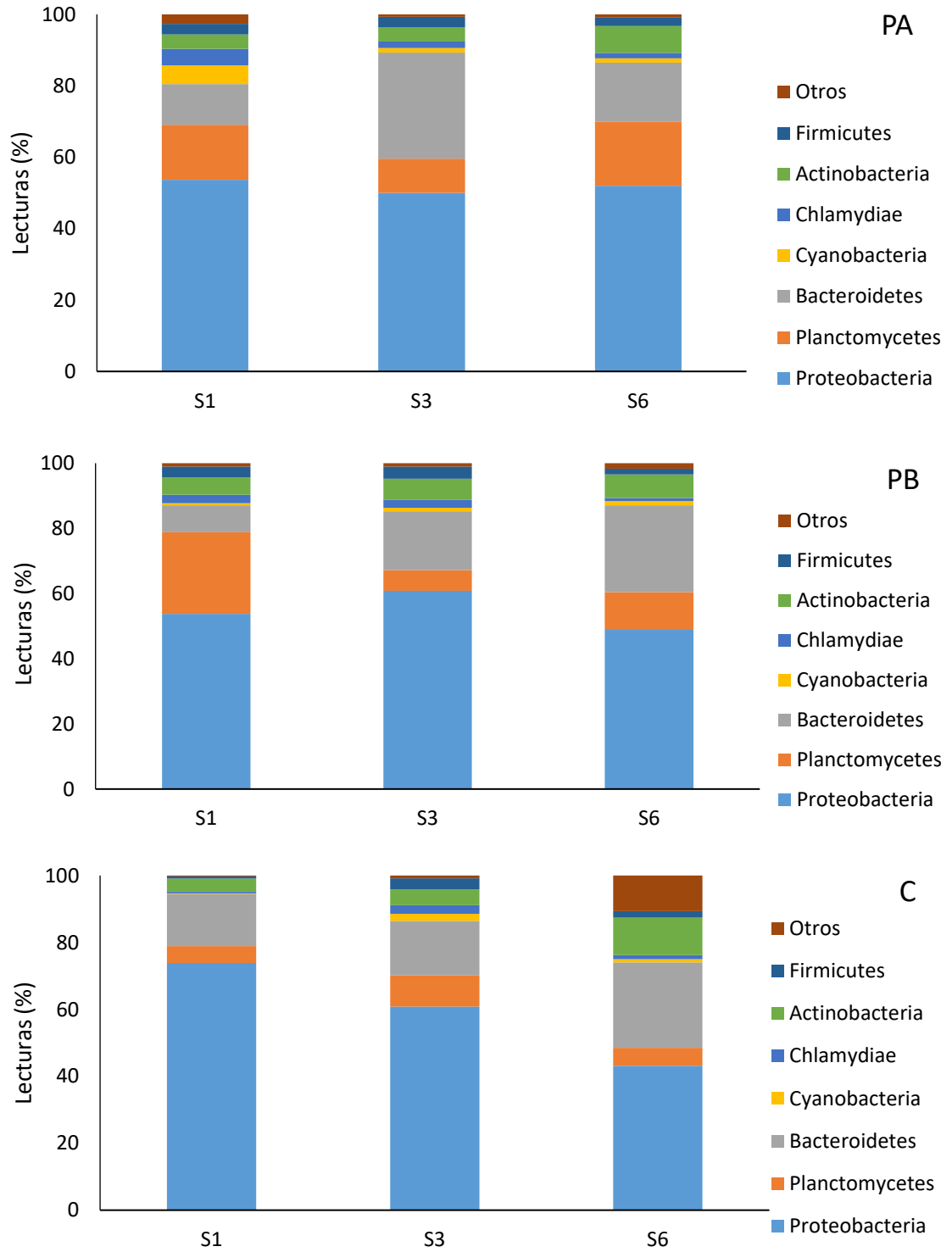


Figura 1. Perfil bacteriano de los biofloculos colectados en los tres tratamientos, durante las semanas 1, 3 y 6.

Al inicio de estudio, las lecturas que no fueron asignadas a ningún filo, pero que la secuenciación del gen 16S ARNr las ubicaron en el dominio Bacteria fueron: 13, 10 y 6% en los tratamiento PA, PB y C respectivamente. Mientras que a la semana 6 se ubicaron en 13, 12 y 12 % (Figuras 2, 3 y 4).

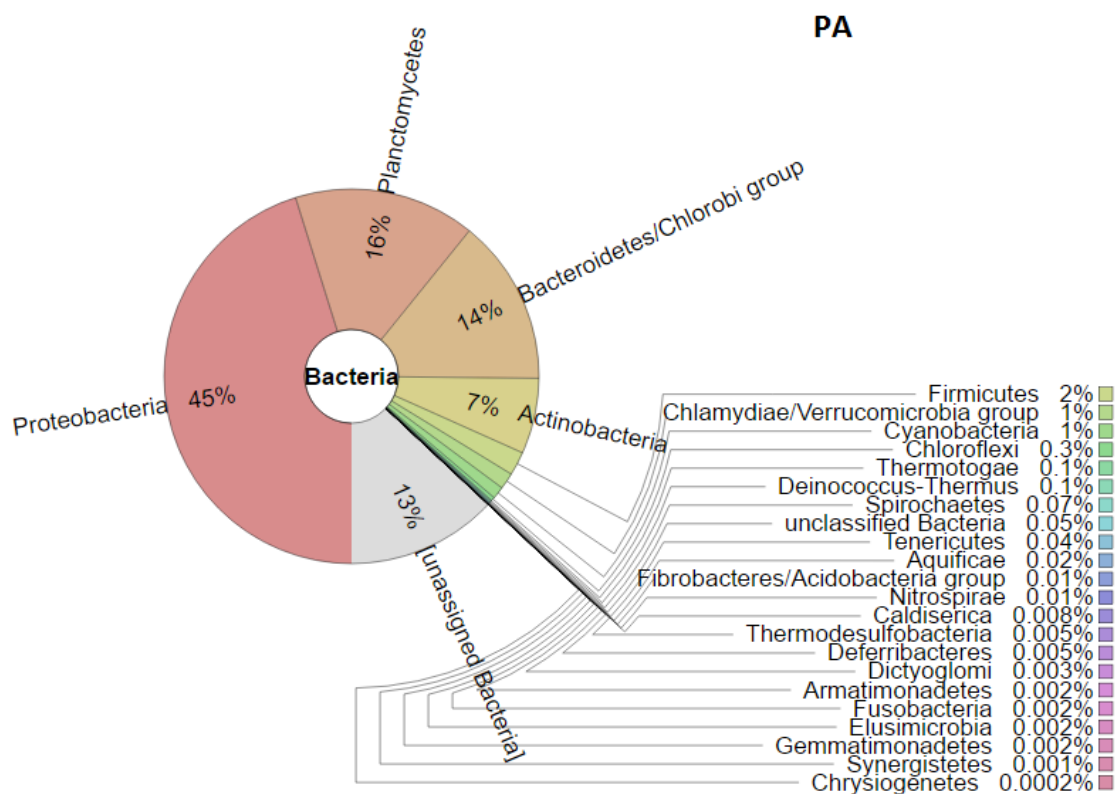


Figura 2. Porcentaje de bacterias clasificadas y no clasificadas en el tratamiento PA en la semana 6. La detección bacteriana se realizó mediante análisis metagenómico del gen 16S ARNr, considerando las regiones V3 y V4.

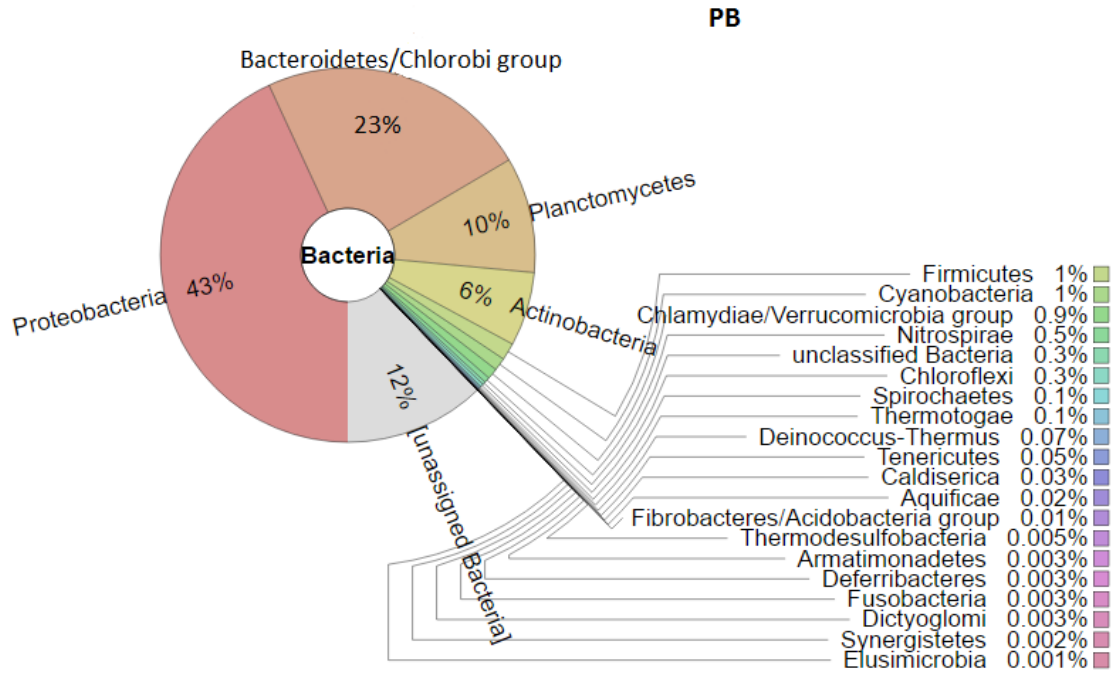


Figura 3. Porcentaje de bacterias clasificadas y no clasificadas en el tratamiento PB en la semana 6. La detección bacteriana se realizó mediante análisis metagenómico del gen 16S ARNr, considerando las regiones V3 y V4.



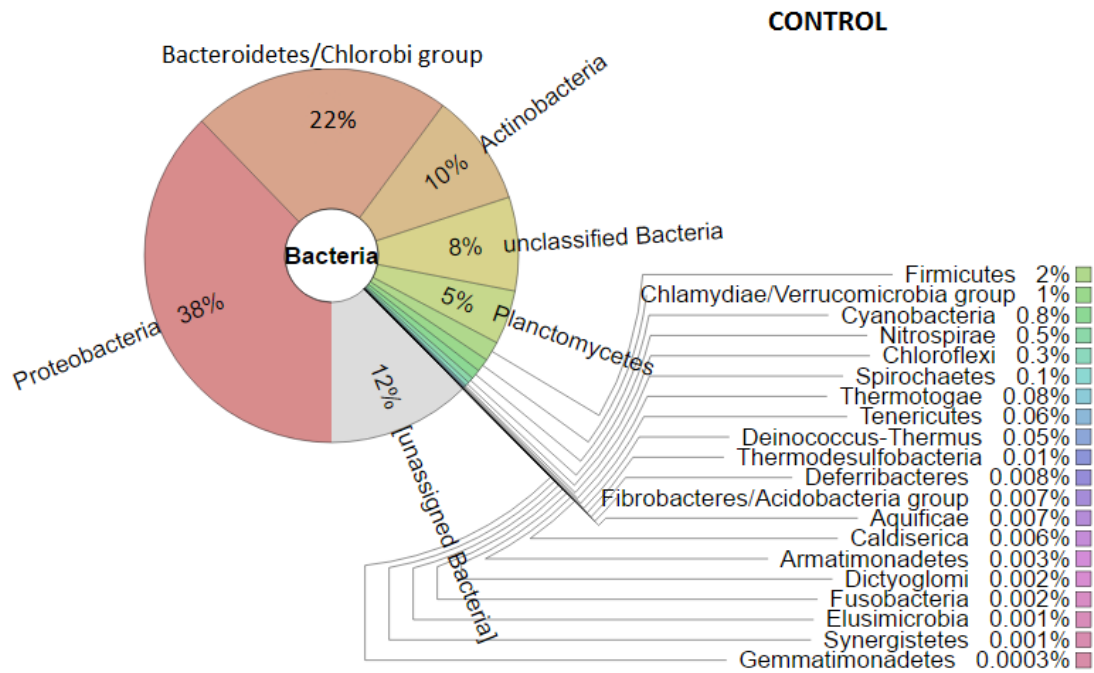


Figura 4. Porcentaje de bacterias clasificadas y no clasificadas en el tratamiento C en la semana 6. La detección bacteriana se realizó mediante análisis metagenómico del gen 16S ARNr, considerando las regiones V3 y V4.

Los cinco géneros de bacterias más abundantes en el tratamiento PA cambiaron durante el periodo de cultivo. En la semana 1 en orden de importancia estuvieron *Rhodopirellula* (13.53%), *Rhodobacter* (11.94), *Planctomyces* (10.34%), *Ketogulonicigenium* (9.43%) y *Cyanobacterium* (5.58%); mientras que en la semana 3, casi todos los géneros de la semana 1 fueron reemplazados por otros, los más abundantes fueron *Ruegeria* (12.74), *Sulfurimonas* (12.13%), *Rhodopirellula* (9.14%), *Rhodobacter* (6.87%) y *Croceibacter* (5.55%); en la semana

6 el género *Ruegeria*, se mantuvo en el primer lugar (23.82%) y en el segundo *Planctomyces* (8.60%), el cual se había registrado en la semana 1 en la tercera posición (Tabla 5).

Tabla 5. Géneros de bacterias más abundantes en los bioflóculos del cultivo hiper-intensivo de camarón blanco *L. vannamei* durante los tres periodos de muestreo, en el tratamiento PA.

	Género	% de lecturas asignadas	Filo
Semana 1	<i>Rhodopirellula</i>	13.53	Planctomycetes
	<i>Rhodobacter</i>	11.94	Proteobacteria
	<i>Planctomyces</i>	10.34	Planctomycetes
	<i>Ketogulonicigenium</i>	9.43	Proteobacteria
	<i>Cyanobacterium</i>	5.58	Cyanobacteria
	$\Sigma$	50.82	
Semana 3	<i>Ruegeria</i>	12.74	Proteobacteria
	<i>Sulfurimonas</i>	12.13	Proteobacteria
	<i>Rhodopirellula</i>	9.14	Planctomycetes
	<i>Rhodobacter</i>	6.87	Proteobacteria
	<i>Croceibacter</i>	5.55	Bacteroidetes
	$\Sigma$	46.43	
Semana 6	<i>Ruegeria</i>	23.82	Proteobacteria
	<i>Planctomyces</i>	8.60	Planctomycetes
	<i>Rhodopirellula</i>	7.97	Planctomycetes
	<i>Croceibacter</i>	6.32	Bacteroidetes
	<i>Sulfurimonas</i>	4.49	Proteobacteria
	$\Sigma$	51.20	

Los cinco géneros de bacterias más abundantes en el tratamiento PB registrados en la semana 1, según su importancia fueron: *Rhodopirellula* (22.26%), *Planctomyces* (17.03), *Ketogulonicigenium* (11.67%), *Ruegeria* (7.50%) y *Rhodobacter* (7.28); en la semana 3 el género *Ruegeria* ocupó el primer lugar (18.54 %) y *Rhodopirellula* se ubicó en la cuarta posición

(6.43 %); en la semana 6 *Ruegeria* se mantuvo en el primer lugar (14.52 %), seguido por *Echinicola* (11.21 %) mientras que *Rhodopirellula* no apareció en el grupo de los cinco más abundantes (Tabla 6).

Tabla 6. Géneros de bacterias más abundantes en los bioflóculos del cultivo hiper-intensivo de camarón blanco *L. vannamei* durante los tres periodos de muestreo, en el tratamiento PB.

	Género	% de abundancia	Filo
Semana 1	<i>Rhodopirellula</i>	22.26	Planctomycetes
	<i>Planctomyces</i>	17.03	Planctomycetes
	<i>Ketogulonicigenium</i>	11.67	Proteobacteria
	<i>Ruegeria</i>	7.50	Proteobacteria
	<i>Rhodobacter</i>	7.28	Proteobacteria
	$\Sigma$	65.74	
Semana 3	<i>Ruegeria</i>	18.54	Proteobacteria
	<i>Sulfurimonas</i>	12.39	Proteobacteria
	<i>Teredinibacter</i>	8.20	Proteobacteria
	<i>Rhodopirellula</i>	6.43	Planctomycetes
	<i>Cytophaga</i>	5.78	Bacteroidetes
	$\Sigma$	51.34	
Semana 6	<i>Ruegeria</i>	14.52	Proteobacteria
	<i>Echinicola</i>	11.21	Bacteroidetes
	<i>Croceibacter</i>	10.15	Bacteroidetes
	<i>Sulfurimonas</i>	9.38	Proteobacteria
	<i>Ketogulonicigenium</i>	7.15	Proteobacteria
	$\Sigma$	52.41	

En el tratamiento PB durante la semana 1, los cinco géneros más abundantes fueron: *Vibrio* (22.22%), *Ruegeria* (21.39%), *Ketogulonicigenium* (14.00%), *Muricauda* (12.92%) y *Rhodopirellula* (7.76%); para la semana 3 el género *Vibrio* no apareció dentro del grupo de los

cinco más importantes, mientras que su posición fue ocupada por el género *Sulfurimonas* (21.25%), seguido por *Ruegeria* (11.75%) y *Rhodopirellula* (8.97%); en la semana 6 el género más abundante fue *Ketogulonicigenium* (14.15 %), seguido por *Ruegeria* (10.27%) y *Sulfurimonas* (10.14%) (Tabla 7).

Tabla 7. Géneros de bacterias más abundantes en los bioflóculos del cultivo hiper-intensivo de camarón blanco *L. vannamei* durante los tres periodos de muestreo, el tratamiento control.

	Género	% de abundancia	Filo
Semana 1	<i>Vibrio</i>	22.22	Proteobacteria
	<i>Ruegeria</i>	21.39	Proteobacteria
	<i>Ketogulonicigenium</i>	14.00	Proteobacteria
	<i>Muricauda</i>	12.92	Bacteroidetes
	<i>Rhodopirellula</i>	7.76	Planctomycetes
	$\Sigma$	78.29	
Semana 3	<i>Sulfurimonas</i>	21.25	Proteobacteria
	<i>Ruegeria</i>	11.75	Proteobacteria
	<i>Rhodopirellula</i>	8.97	Planctomycetes
	<i>Teredinibacter</i>	6.80	Proteobacteria
	<i>Croceibacter</i>	6.61	Bacteroidetes
	$\Sigma$	55.38	
Semana 6	<i>Ketogulonicigenium</i>	14.15	Proteobacteria
	<i>Ruegeria</i>	10.27	Proteobacteria
	<i>Sulfurimonas</i>	10.14	Proteobacteria
	<i>Croceibacter</i>	9.99	Bacteroidetes
	<i>Rhodobacter</i>	5.65	Proteobacteria
	$\Sigma$	50.20	

### III.1.2. Alfa beta y gamma diversidad

La diversidad  $\alpha$  fue evaluada por medio del índice de Shannon (H), mientras que la equitabilidad por el índice de Pielou (J). El tratamiento C obtuvo la menor diversidad al inicio del experimento con  $H= 0.88$  nits/ind; mientras que al finalizar obtuvo el mayor índice con  $H=1.59$  nits/ind. Los índices equitabilidad (J) presentaron la misma tendencia que el de diversidad (H) (Tabla 8).

Tabla 8. Índices de  $\alpha$  diversidad (H), e índice de equitabilidad (J) de los filos de bacterias presentes en el biofloc colectado en cada tratamiento, durante tres periodos de muestreo.

Tratamiento	Índice de Shannon (H)			Índice de Pielou (J)		
	Semana 1	Semana 3	Semana 6	Semana 1	Semana 3	Semana 6
PA	1.54	1.3	1.4	0.52	0.48	0.46
PB	1.34	1.28	1.41	0.45	0.45	0.49
C	0.88	1.3	1.59	0.32	0.47	0.55

La  $\beta$  diversidad se calculó mediante el índice de similitud de Jaccard ( $I_j$ ), el cual permitió realizar una comparación por pareja de tratamientos, PA-C y PB-C. El índice más alto de similitud se obtuvo entre los tratamientos PB - C con 0.90, mientras que entre PA - C el valor fue de 0.86 (Tabla 9).

Tabla 9. Diversidad  $\beta$  de filos de bacterias registrados en los bioflóculos generados con las mezclas de probióticos A (PA) y B (PB) respecto al control (C).

	Índice de Jaccard ( $I_j$ )
PA - C	0.86
PB - C	0.90

El índice de diversidad gamma ( $H'$  gamma) fue igual entre las semanas 1 y 3, sin embargo en la semana 1 éste estuvo compuesto en un 95% por la diversidad alfa, y un 5 % por la diversidad beta; mientras que para la semana 3, la contribución de la diversidad alfa aumentó a 97.6 % y la diversidad beta disminuyó a 2.4% (Tabla 10). En la semana 6 el índice de la diversidad gamma incrementó ligeramente llegando a 1.52, y estuvo compuesto en un 96.3 % por la alfa diversidad y en un 3.7% por la diversidad beta.

Tabla 10. Índices de diversidad gamma de los filos de bacterias encontrados en los bioflóculos de un cultivo hiper-intensivo de camarón blanco en las semanas 1, 3 y 6.

	Diversidad gamma		
	Semana 1	Semana 3	Semana 6
$H'$ gamma	1.32	1.32	1.52
% $\alpha$	95.0	97.6	96.3
% $\beta$	5.0	2.4	3.7

### **III.2. Riqueza de bacterias**

Los predictores de riqueza de los filos de bacterias, determinado por los diversos modelos matemáticos utilizados, tuvieron una alta coincidencia con el número de filos observados en las muestras (sobs) (Figura 5). En el tratamiento PA se observaron 22 filos, mientras que los modelos predijeron un intervalo entre 22-24. Según los modelos matemáticos (predictores) en este tratamiento el estimador más riguroso fue el Jacknife de primer orden (Jack 1). En el tratamiento PB se presentó la mayor precisión de los estimadores, todos predijeron 19 filos, la misma cantidad que los colectados. En el tratamiento control se colectaron 19 Filos del intervalo 19-21 esperados según los estimadores. En este caso los dos estimadores más rigurosos fueron Jack 1 e ICE, ambos estimaron 21 Filos

En todos los tratamientos los Uniques tendieron a descender y terminaron con valores bajos. Dichos valores fueron 4, 0 y 3 para PA, PB y C respectivamente.

Tanto los estimadores como los Uniques indican que en el tratamiento PB se realizó el mejor muestreo, aunque en el tratamiento PA y C los estimadores estuvieron muy próximos a los datos reales y en ambos casos los Uniques tendieron a descender.

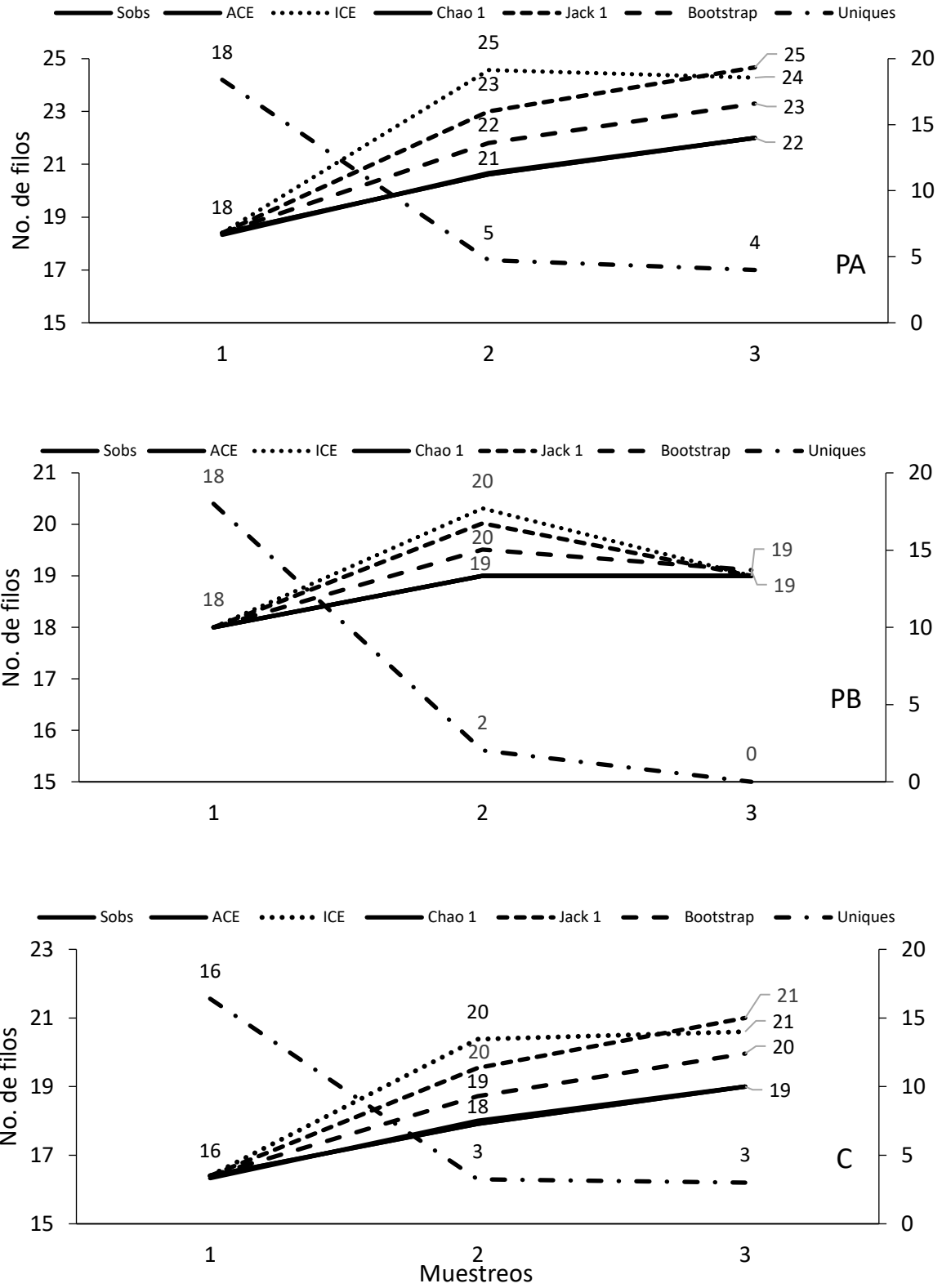


Figura 5. Estimadores de riqueza de especies en los tratamientos y Uniques de los tres tratamientos en función del tiempo.



### III. 3. Respuesta productiva

El peso inicial fue de 0.073 g/ind, después de 42 días de cultivo llegó a 2.31-2.70 g/ind. La ganancia en el peso del camarón no mostró diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 11). La tasa de crecimiento específico (CE) osciló entre 14.75 y 15.16 %/día, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. La supervivencia mostró una variación de entre el 85 y el 92%, sin diferencias significativas entre los tratamientos. El factor de conversión alimenticia (FCA) estuvo entre 0.83 y 0.98 sin diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 11. Parámetros productivos de *Litopenaeus vannamei* (media y desviación estándar) obtenidos en estacas inoculadas con probióticos comerciales (PA y PB) y control (C).

Trat.	Peso ind. Inicial (g)	Peso ind. Final (g)	Inc. Ind. (g)	Crec. Esp. %/día	Sobr. %	FCA
PA	0.073 (0.00)	2.31 (0.29)	2.23 (0.29)	15.16 (0.17)	92.00 (4.35)	0.98 (0.13)
PB	0.073 (0.00)	2.61 (0.12)	2.62 (0.18)	15.04 (0.08)	85.00 (8.66)	0.90 (0.09)
C	0.073 (0.00)	2.57 (0.08)	2.49 (0.08)	14.75 (0.33)	92.30 (6.54)	0.83 (0.05)

#### **IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

Un consorcio bacteriano, está conformado por poblaciones derivadas del crecimiento de individuos unicelulares. Díaz y Wachter (2003) definen a las comunidades microbianas como el conjunto de poblaciones de células de varias especies que interactúan entre sí compartiendo múltiples funciones dentro de un ambiente determinado. Los métodos de identificación basados en pruebas moleculares, permiten conocer detalladamente la composición de las comunidades bacterianas asociadas a determinado hábitat y hacen posible evaluar poblaciones que no habían sido detectadas por los métodos tradicionales de cultivo en placas (Muyzer *et al.* 1993, Huber *et al.* 2004). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en conjunto con otras técnicas, han permitido el estudio de la composición de comunidades bacterianas en muestras de sedimentos marinos (Muyzer *et al.* 1993), en biopelículas (Lyautey *et al.* 2005; Martínez-Córdova *et al.*, 2016) y en general ha ampliado el conocimiento de las bacterias asociadas a organismos acuáticos (Yang *et al.* 2007; McIntosh *et al.* 2008).

Existen pocos estudios relacionados con la diversidad bacteriana en biofloculos y biopelículas. Monroy-Dosta *et al.* (2013) evaluaron la diversidad bacteriana de los biofloculos provenientes de un cultivo de tilapia mediante pruebas bioquímicas, y encontraron que las bacterias mas abundantes pertenecian a los filos: Proteobacteria (42 %), Firmicutes (36 %), Actinobacterias (13 %) y Nitrospirae (7 %). Por otro lado, Martínez-Córdova *et al.* (2016) utilizaron la técnica de secuenciación masiva del gen 16S ARNr para identificar las bacterias desarrolladas en el biofilm de un sistema de cultivo fotoautotrófico de camarón. En su estudio, los filos más abundantes fueron: Proteobacteria (47 %), Chlamydiae/Verrucomicrobia (11 %), Bacteroidetes (8 %) y Planctomycetes (5 %).

Lee *et al.* (2016) evaluaron la diversidad de bacterias presentes en un cultivo de peces de agua salada mantenidos en un sistema de recirculación (RAS) mediante la secuenciación del gen 16S A y reportaron que el filo más dominante fue Proteobacterias (45.9%), seguido de Bacteroidetes (42.2%) y otros con abundancias menores al 3%, entre ellos Actinobacteria (2.9%) Planctomycetes (2.0%), Nitrospirae (1.5%), y Acidobacteria (1.0%). En otro estudio similar, Martins *et al.*, (2013) evaluaron la diversidad bacteriana con secuenciación del gen 16S ARNr en un cultivo RAS de *Scophthalmus maximus* y *Solea senegalensis*, entre sus resultados destacan la abundancia de dos filios: Proteobacterias (70-90 %) y Bacteroidetes (7-26 %).

A pesar de que los estudios previos fueron realizados con especies diferentes (peces), en sistemas RAS, o en agua dulce, los resultados son consistentes con los encontrados en éste experimento. Durante todo el experimento, los filios con mayor presencia en los bioflóculos fueron Proteobacteria (50-73%), Bacteroidetes (9-27%), Planctomycetes (10-25%), Actinobacteria (4-11%) y Firmicutes (0.5-2%).

Según los estudios previos, así como la presente investigación, los microorganismos pertenecientes al filo Proteobacteria son los más abundantes en los sistemas de producción acuícola. Al inicio del presente experimento, el tratamiento Control mostró la mayor abundancia de Proteobacterias (73%), la cual pudo estar correlacionada con la del medio natural. En el océano las especies que pertenecen a este filo constituyen un 79% de la biomasa bacteriana en el fondo y un 64% en la superficie; mientras que en agua dulce representan hasta un 40% de la diversidad bacteriana (Battistuzzi y Hedges, 2009). Las Proteobacterias tienen una gran diversidad de rutas metabólicas para la obtención de energía, entre ellas se encuentran especies fototróficas, quimiótrofas y quimiorganotróficas (Madigan *et al.*, 1997); por ello juegan un papel

importante en el ciclo de los nutrientes y en la mineralización de los compuestos orgánicos (Kirchman, 2002; Kersters *et al.*, 2006).

El segundo filo más dominante encontrado en este estudio, y que concuerda con los reportes de Lee *et al.* (2016) y de Porchas-Cornejo *et al.* (2017) fue el de Bacteroidetes; el cual es dominante en el bacterioplancton marino heterótrofo, es común encontrarlo colonizando partículas macroscópicas de materia orgánica (Woebken *et al.*, 2007). Adicionalmente se encuentra de manera natural en el fondo del mar, donde representa aproximadamente el 8% la diversidad bacteriana, mientras que en la superficie llega al 9%; sin embargo, su presencia incrementa notablemente en sólidos húmedos, llegando a representar hasta un 19% (Battistuzzi y Hedges, 2009). Por lo anterior, se puede asumir que el biofloc tiene características físico-químicas adecuadas para la proliferación de este filo, lo que permitió que se mantuviera como el segundo más dominante; además de que en los tratamientos PB y C, incrementó su abundancia entre el primero y el último muestreo.

A pesar de la gran variedad de filos presentes en el medio natural, las condiciones particulares de los microambientes favorecen la presencia de algunos de ellos. Por ejemplo, en los suelos o sólidos se pueden encontrar nueve filos abundantes, pero solo en cuatro de ellos (Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria y Bacteroidetes) se distribuye el 90 % la diversidad total de dicho ambiente (Tsai *et al.* 2009). Los otros cinco filos comunes son Verrucomicrobia, Chloroflex, Planctomycetes, Gemmatimonadetes y Firmicutes (Janssen, 2006). Al comparar éstos resultados con el presente estudio, también se encontró que cerca del 90% de la diversidad bacteriana estuvo representada por los mismos filos (Proteobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes y Actinobacteria).

El análisis de las secuencias del gen 16S ARNr permite conocer la diversidad bacteriana casi con un 100% de precisión (Porteous *et al.* 1997; Stackebrandt y Ebers, 2006). Lee *et al.* (2016) evaluaron la diversidad bacteriana presente en seis diferentes puntos de un sistema acuícola de recirculación, posteriormente calcularon los índices de Shannon-Wiener y encontraron que el índice del biofiltro fue cuatro veces superior comparado con el obtenido en el estanque de los peces. La alta diversidad en los filtros pudo deberse a la diversidad de procesos biológicos que influyen en el consumo de la materia orgánica y en la transformación de los compuestos nitrogenados.

En los estudios de biodiversidad, es de gran importancia evaluar la eficacia del muestreo realizado. Existen diversos modelos, que permiten determinar la riqueza de especies. La evaluación permite determinar a través de varias funciones la asíntota de la curva de acumulación de especies (Gotelli y Colwell, 2011). Éstos modelos se denominan estimadores o predictores de diversidad (Colwell *et al.*, 2012); mientras más cercano sea el valor observado al estimado, el muestreo será más preciso. En un estudio de diversidad de bacterias indicadoras de contaminación fecal en marea entrante (FLD) y marea saliente (EBB) en un humedal, Dorsey *et al.* (2013) obtuvieron aproximadamente 51 especies de bacterias, su muestreo fue evaluado mediante el software EstimateS (Colwell, 2013), el cual genera simulaciones para diversos modelos de riqueza de especies, los estimadores que más se acercaron a los valores observados fueron: Bootstrap (aprox. 49-50 para EBB y 50-52 para FLD) y Jackknife (entre 55- 58 para EBB y 59-61 para FLD). Mientras que los estimadores más rigurosos predijeron valores superiores: Chao 1 (79-81 para EBB y 114-116 para FLD) e ICE (19-21 para EBB y 160-162 para FLD) tales diferencias, indicaron que los cuerpos de agua tuvieron un mayor número de especies a las detectadas en sus muestreos. En el mismo estudio se utilizó un índice de similitud Jaccard, y se

concluyó que entre EBB y FLD hubo un 40% de especies compartidas, considerada como una semejanza media o moderada.

En este estudio el número de filos presentes en los bioflóculos colectados durante los muestreos fue muy parecido al predicho por los estimadores. En el tratamiento PA se identificaron 22 filos, mismo valor estimado por los modelos ACE y Chao1, mientras que Bootstrap llegó a 23 y los menos precisos fueron ICE y Jack 1 con 24. En el tratamiento PB se registró la presencia de 19 Filos y todos los estimadores anteriormente mencionados estimaron el mismo valor. Por último, en el tratamiento Control, se colectaron 19 Filos, los mismos estimados por ACE y Chao 1, mientras que Bootstrap predijo 19; por otro lado tanto ICE como Jack 1 estimaron 21 filos. Los resultados de los estimadores indican que el muestreo fue suficiente para determinar con precisión la riqueza de los filos en los tres tratamientos.

Tomando como referencia la diversidad bacteriana desarrollada en el tratamiento Control, se evaluó la similitud entre PA-C y PB-C mediante el índice de Jaccard. En ambas comparaciones se encontró una alta similitud entre la diversidad bacteriana de los bioflóculos, el índice PA-Control fue 0.86, lo cual indica que ambos tratamientos compartieron el 86% de los filos; mientras que al relacionar PB-Control, el índice de similitud fue de 0.90 (90% de filos compartidos). En ambos casos se puede considerar una alta similitud ya que el valor máximo del índice de Jaccard es igual a 1.0.

El índice de diversidad gamma permitió determinar el impacto de la diversidad local ( $\alpha$ ) y el reemplazo de especies ( $\beta$ ) dentro de la comunidad bacteriana (por tratamiento y por muestreo). En la semana 1 el índice gamma fue de 1.32, del cual el 95% correspondió a la diversidad  $\alpha$  y

el 5% a la diversidad  $\beta$ , mientras que en las semanas 3 y 6 los valores fueron muy semejantes al primer muestreo (1.32 y 1.52), así como las contribuciones de la diversidad  $\alpha$  y  $\beta$ .

Evidentemente el reemplazo de filos entre los tratamientos (diversidad  $\beta$ ) fue casi insignificante comparado con la riqueza de los filos en cada tratamiento (diversidad  $\alpha$ ). Los resultados tienen sentido al observar que 19 de los 22 filos registrados mediante el análisis metagenómico fueron compartidos entre los tratamientos. El efecto encontrado con la adición de los probióticos comerciales, fue contrario a lo esperado. La diversidad local tuvo la mayor contribución en la diversidad de la comunidad. Lo cual indica que la adición de probióticos comerciales no modificó la presencia de los filos en el biofloc.

En los sistemas RAS, biofilm o biofloc los filos Proteobacteria y Bacteroidetes tienden a dominar (Martins *et al.*, 2013; Monroy Dosta *et al.*, 2013; Martínez-Córdova *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2016); mientras que en los cultivos con recambios de agua los filos Cyanobacteria y Actinobacteria tienden a prosperar después de su paso por los estanques, mientras que las abundancias de Proteobacteria y Bacteroidetes disminuyen (Porchas-Cornejo *et al.*, 2017).

Cuando se realizó el análisis a un nivel taxonómico más profundo, se consideraron los cinco géneros más abundantes en cada tratamiento y en cada periodo de muestreo. Al igual que en el caso de los filos, se encontró que pocos géneros dominaron la diversidad bacteriana. En general los más abundantes, acumularon entre el 46.43 y el 78.29 % de las lecturas totales (Tablas 5-7). Si bien los sistemas de biofloc tienen una gran cantidad de bacterias, pocos géneros dominan.

Entre los géneros más abundantes se encuentra *Rhodospirillum rubrum*, el cual es abundante en el medio marino; Žure *et al.* (2015) indican que estos microorganismos aparentemente desempeñan un

papel importante en el metabolismo de los compuestos nitrogenados. En un estudio en laboratorio, Martínez-Córdova *et al.* (2016) encontraron que la especie *R. baltica* representó el 4 % de la diversidad presente en el biofilm de un cultivo de camarón blanco inoculado con una diatomea bentónica. En el presente estudio las abundancias más altas se registraron en la semana 1 con 13.53 y 22.26 % en PA y PB respectivamente, mientras que en el tratamiento control se presentó en la semana 3 con un 8.97 %. Se ha demostrado que los carbohidratos son la principal fuente de carbono y de energía para este género (Schlesner *et al.* 2004).

En el tratamiento C, no se agregó fuente de carbono externa, por lo que la adición de melaza durante la formación y el mantenimiento del biofloc en los tratamientos PA y PB pudo promover la dominancia de *Rhodopirellula* al inicio del estudio. Se puede considerar que el biofilm y el biofloc desarrollados en los cultivos acuícolas permiten la proliferación de éstos microorganismos. Mientras que en la columna de agua, su presencia es escasa según el estudio de Porchas-Cornejo *et al.* (2017) quienes registraron baja abundancia de *R. báltica* en aguas oceánicas antes de ingresar a una granja (1.4 %) de cultivo de camarón, mientras que a la salida de la estanquería fue 0.4%.

El género *Vibrio* puede contener especies potencialmente patógenas y fue el más abundante en la semana 1 en el tratamiento control (22.22%), aunque posteriormente disminuyeron casi a cero; a este respecto, los niveles de detección en los tratamientos PA y PB fueron muy bajos. Algunas bacterias patógenas son habitantes comunes en los ambientes acuáticos, en algunos casos el exceso de materia orgánica puede facilitar su proliferación (Austin *et al.* 1995; Fuentes y Pérez, 1998). El biofloc se caracteriza por tener altas concentraciones de materia orgánica, que en teoría puede fomentar su proliferación; sin embargo, está documentado que este sistema favorece el crecimiento de bacterias benéficas que compiten por recursos (espacio y fuentes



nutritivas) y que además generan sustancias complejas que inhiben el crecimiento de potenciales patógenos (Wu *et al.* 2012). En un cultivo de tilapia en biofloc Monroy-Dosta *et al.* (2013) reportaron que los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas* fueron abundantes al inicio del estudio; sin embargo, a medida que avanzó el cultivo disminuyeron significativamente, éste fenómeno refuerza lo mencionado por Wu *et al.* 2012; Martínez-Córdova *et al.* (2015) y otros investigadores.

Otro género abundante que apareció en los tres tratamientos fue *Ketogulonigenium*, el cual incluye bacterias anaerobias facultativas Gram negativas; éstas son utilizadas en la industria biotecnológica por su capacidad para producir precursores vitamínicos, específicamente el ácido 2-ceto-L-gulónico para la formación de vitamina C (Urbance *et al.* 2001). Por otro lado, se ha encontrado que este género tiene la capacidad de interactuar con una amplia diversidad de grupos bacterianos (Cai *et al.* 2012) y utilizar diferentes fuentes de carbono (Staats *et al.* 1999). Martínez-Córdova *et al.* (2016) encontraron a la especie *K. vulgare* como la más abundante (44.9 %) en el biofilm de un sistema de cultivo de camarón.

En éste estudio *Ketogulonigenium* se registró en la semana 1 del tratamiento PA, con una abundancia de 9.43%; en el tratamiento PB apareció en las semanas 1 y 6 con 11.67 y 7.15% respectivamente y en el tratamiento control fue el tercero más abundante en la semana 1 (14%) y el más abundante en la semana 6 (14%).

La información relacionada con el género *Ruegeria* es escasa, Arora *et al.* (2012) aislaron una cepa (*Ruegeria* sp.) de la microalga *Tetraselmis indica*, varios estudios en laboratorio indicaron que éstas bacterias utilizan carbohidratos de la pared celular de las microalgas como sustratos metabólicos, a través de enzimas carbohidrasas, específicamente encontraron gran afinidad con las pectinas. En éste estudio, *Ruegeria* se posicionó en el primer lugar de abundancia en la

semana 6 en los tratamientos PA (23.82 %) y PB (15.52 %), y en segundo en el tratamiento control (10.27%), debido a su alta presencia, es recomendable profundizar en aspectos relacionados con su metabolismo y su ecología. Su incremento pudo estar asociado al aumento de los bioflóculos en el cultivo, los cuales contienen microalgas.

El género *Sulfurimonas* parece ser responsable de gran parte de la actividad quimioautotrófica, con gran importancia en el ciclo de elementos en algunos hábitats (Grote *et al.*, 2008; Glaubitz *et al.*, 2009; Perner *et al.*, 2013). La importancia de *Sulfurimonas* se atribuye a su capacidad para crecer a partir de iones inorgánicos, ya que cuenta con alta versatilidad metabólica (uso de varios donadores de electrones, receptores de electrones y fuentes de carbono inorgánico) (Campbell *et al.*, 2006; Grote *et al.*, 2012). Algunas especies de *Sulfurimonas* participan de manera importante en la movilidad de Zn, Cu y Pb a través de la desnitrificación por oxidación de sulfuros en sedimentos marinos contaminados (Shao *et al.*, 2009). En el estudio de Martínez-Córdova *et al.* (2016), este género fue representado por la especie *Sulfurimonas autotrophica* aunque represento apenas el 0.6% de la diversidad bacteriana, la cual coincide con el 0.6% reportado por Porchas-Cornejo *et al.* (2017) en el agua oceánica a la entrada de una granja de camarón. Sin embargo al parecer las condiciones presentes en los sistemas de cultivo en biofloc le favorecen ya que en éste estudio *Sulfurimonas* apareció en varios muestreos con abundancias de 4.49 a 21.25%.

Uno de los aspectos más notables de éste estudio, es que los tratamientos que recibieron probióticos comerciales no presentaron una mejora en los parámetros productivos en comparación con el control. El crecimiento específico (CE) de los organismos (14.75-15.16 % por día) y la supervivencia (85.0 a 92.3%) fueron iguales entre los tratamientos y comparables con los resultados obtenidos por Yuniasari y Ekasari (2010), quienes obtuvieron la equivalencia

a un CE de 14 a 17% diario y supervivencia de 86 a 94% al finalizar un estudio de maternización de camarón blanco en biofloc (densidad de 160 ind/m<sup>2</sup>). En otro estudio, Serra *et al.* (2015) reportaron crecimientos específicos de 11.1 a 11.4% por día y supervivencias de 97.4 a 99.5%, durante la maternización de camarón en biofloc con densidad de 1,200 ind/m<sup>2</sup> y 35 d de cultivo. Las diferencias en el CE con las del presente estudio (14.75-15.16% por día) se pueden atribuir principalmente a las densidades de siembra.

Respecto al factor de conversión alimenticia, Serra *et al.* (2015) reportaron valores de 0.89 a 1.12 en un cultivo de *L. vannamei* de biofloc integrado con *Gracilaria birdiae*; mientras que en otro estudio con juveniles de *L. vannamei* cultivados en biofloc, Luis-Villaseñor *et al.* (2015) reportaron un valor de 1.41 a densidades de 500 ind/m<sup>2</sup>. En el presente estudio el FCA, fue inferior a 1 en todos los tratamientos, por lo que se asemeja más al estudio de Serra *et al.* (2015). En el cultivo de camarón y de otras especies acuáticas, el alimento consumido es uno de los parámetros que influye en gran medida sobre los costos de producción. El presente estudio se realizó en un laboratorio comercial por lo que se tuvo especial atención en el suministro de alimento. Por otro lado diversos autores han demostrado que el camarón consume biofloc (Moreno-Arias *et al.*, 2017) por lo que el FCA siempre debería ser menor comparado con los sistemas de recirculación y los semi-intensivos.

La adición de probióticos comerciales no mostró mejoras en los parámetros productivos del camarón. Este resultado es contrario a lo esperado, ya que la adición de probióticos comerciales en teoría, mejora la calidad del agua, la digestión del alimento y los parámetros productivos. Sin embargo, como se demostró, al final del estudio, la diversidad de las bacterias (filos y géneros) en los tratamientos PA y PB fue muy parecida al control. Por lo que se puede asumir que las bacterias autóctonas tuvieron la mayor influencia en la diversidad. Es posible que algunas

especies tengan propiedades probióticas, las cuales pudieron contribuir en la mejora de la digestión de los tres tratamientos. Adicionalmente el conjunto de bacterias del tratamiento control formaron consorcios capaces de degradar la materia orgánica, metabolizar compuestos nitrogenados y mantener las redes tróficas microbianas como fuente de alimento vivo. En futuras investigaciones se sugiere estudiar de las características fisiológicas, metabólicas y las propiedades benéficas que tienen las bacterias autóctonas presentes en los bioflóculos de los cultivos hiper-intensivos.

## **V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **V.1. Conclusiones**

En todos los tratamientos los filos más abundantes fueron Proteobacterias, Planctomycetes y Bacteriodetes. Al final del experimento la suma de éstos comprendió el 86, 87 y 74 % de la diversidad en los tratamientos PA, PB y C.

Al final del bioensayo la adición de probióticos comerciales no afectó de manera importante la dominancia de los filos.

La diversidad alfa se mantuvo similar en los tratamientos PA y PB, mientras que en el control, se observaron los mayores cambios (H: 0.88-1.59).

La mayor equitabilidad de los filos se obtuvo en el tratamiento control al final del experimento.

La diversidad gamma fue mayormente influenciada por la diversidad alfa, mientras que la diversidad beta disminuyó conforme avanzó el experimento.

En general los cinco géneros más abundantes, acumularon entre el 46.43 y el 78.29 % de las lecturas totales.

El género *Vibrio* solo mostró alta abundancia (22.22%) en el tratamiento control durante el primer muestreo.

Los tratamientos que recibieron probióticos comerciales, no presentaron una mejora en los parámetros productivos comparados con el control.

### **V.2. Recomendaciones**

Realizar estudios de la composición de especies en los probióticos comerciales.

Realizar estudios de la interacción entre especies de bacterias exóticas y nativas.

Profundizar en aspectos relacionados con el perfil funcional y la ecología de los géneros más abundantes en el biofloc.

Evaluar la dispersión y proliferación de bacterias exóticas en el ecosistema adyacente a granjas y laboratorios.

Evaluar el efecto de las bacterias presentes en los bioflóculos sobre la presencia de compuestos bioactivos y compuestos nutritivos para las especies cultivadas.

## VI. LITERATURA CITADA.

- Aguilera-Rivera D., Prieto-Davó A., Escalante K., Chávez C., Cuzon G. y Gaxiola G. 2014. Probiotic effect of FLOC on Vibrios in the pacific white shrimp *Litopenaeus Vannamei*. *Aquaculture* 424-425: 215-219.
- Alabi, A. O. 2000. The use of probiotics techniques for controlling bacterial diseases in marine invertebrates hatcheries. *Journal of Shellfish Research*, 19(1). 650 pp.
- APHA. 1992. Standard methods for examination of water and waste-water, 1011 pp. American Public Health Association, Washington.
- Arora, M., Anil, A. C., Delany, J., Rajarajan, N., Emami, K., y Mesbahi, E. 2012. Carbohydrate-degrading bacteria closely associated with *Tetraselmis indica*: influence on algal growth.
- Austin, B., Stuckey, L.F., Robertson, P.A.W., Effendi, I. y Griffith, D.R.W. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases* 18(1): 93-96.
- Avnimelech, Y. 2006. Bio-filters: the need for a new comprehensive approach. *Aquac. Eng.* 34 (3), 172–178.
- Avnimelech Y. 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bioflocs technology ponds. *Aquaculture* 264:140-147.
- Avnimelech, Y. 2009. *Biofloc Technology - A practical Guide Book*. The World Aquaculture Society.
- Azim, M. E., y Little, D. C. 2008. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 283(1), 29-35.
- Bairagi, A., Ghosh K.S., Sen, S.K., Ray, A.K. 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International* 10(2), 109-121.
- Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Cunningham, D., Vendrell, D. y Múzquiz, J.L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiology*. 114: 173-186.
- Barer, M.R. y Harwood, C.R. 1999. Bacterial viability and culturability. *Advances in microbial physiology* 41: 93-137.
- Battistuzzi, F. U., y Hedges, S. B. 2009. A major clade of prokaryotes with ancient adaptations to life on land. *Molecular biology and evolution*, 26(2), 335-343.

- Becerra-Dorame, M.J., L.R. Martínez-Córdova, J.A. López-Elías y M. Martínez-Porchas. 2011. Evaluation of autotrophic and heterotrophic microcosm-based systems on the production response of *Litopenaeus vannamei* intensively nursed without Artemia and with zero water exchange. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, IIC* 63: 620.
- Bourne D., Young N., Webster N., Payne M., Salmon M., Demel S. y Hall M. 2004. Microbial community dynamics in a larval aquaculture system of the tropical rock lobster, *Panulirus ornatus*. *Aquaculture* 242, 31– 51.
- Bricknell, I. y Dalmo, R.A. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology* 19: 457– 472.
- Bruckner, C. G., Bahulikar, R., Rahalkar, M., Schink, B., y Kroth, P. G. 2008. Bacteria associated with benthic diatoms from Lake Constance: phylogeny and influences on diatom growth and secretion of extracellular polymeric substances. *Applied and environmental microbiology*, 74(24), 7740-7749.
- Burford, M.A., Preston N.P., Glibert P.M. y Dannison W.C. 2002. Tracing the fate of 15N-enriched feed in an intensive shrimp system. *Aquaculture*, 206: 199-216.
- Burford, M. A., Smith, D. M., Tabrett, S. J., Coman, F. E., Thompson, P. J., Barclay, M. C., y Toscas, P. J. 2004. The effect of dietary protein on the growth and survival of the shrimp, *Penaeus monodon* in outdoor tanks. *Aquaculture Nutrition*, 10(1), 15-23.
- Burford, M.A., Thompson, P.J., McIntosh, R.P., Bauman, R.H., y Pearson, D.C. 2003. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture* 219: 393-411.
- Cai, L., Yuan, M.Q., Li, Z.J., Chen, J.C. y Chen, G.Q. 2012. Genetic engineering of *Ketogulonigenium vulgare* for enhanced production of 2-keto-l-gulonic acid. *Journal of Biotechnology* 157, 320–325.
- Campbell, B. J., Engel, A. S., Porter, M. L., y Takai, K. 2006. The versatile epsilon-proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 458–468.
- Carmona-Galindo, V. D., y Carmona, T. V. 2013. La Diversidad de los Análisis de Diversidad. *Bioma* 14:20-28.
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., y Alland, D. 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 69 (2), 330–339.



- Chistoserdova, L. 2010. Recent progress and new challenges in metagenomics for biotechnology. *Biotechnology letters*, 32(10), 1351-1359.
- Colwell, R. K. 2013. EstimateS: Statistical estimation of richness and shared species from samples. Version 9. <http://viceroy.colorado.edu/estimates/EstimateSPages/AboutEstimateS.htm>
- Colwell, R. K., Chao, A., Gotelli, N. J., Lin, S.Y., Mao, C. X., Chazdon, R. L., y Longino, J. T. 2012. Models and estimators linking individual-based and sample-based rarefaction, extrapolation, and comparison of assemblages. *Journal of Plant Ecology* 5:3-21.
- CONAPESCA, S. 2013. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2013.
- Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P. y Verstraete, W. 2007 Nitrogen removal in aquaculture towards sustainable production. *Aquaculture* 270:1–14.
- Crab R, Kochva M, Verstraete W, Avnimelech Y (2009) Bio-flocs technology application in over-wintering of tilapia. *Aquacultural Engineering* 40: 105–112.
- Crab, R., Chielens, B., Wille, M., Bossier, P. y Verstraete, W. 2010. The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. *Aquaculture Research* 41: 559-567
- Croci, L., Suffredini, E., Cozzi, L., Toti, L., Ottaviani, D., Pruzzo, C., Serratore, P., Fischetti, R., Goffredo, E., Loffredo, G. y Mioni, R. 2007 Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Applied Microbiology* 102: 229-237.
- De la Cruz-Leyva, M. C. D. L., Zamudio-Maya, M., Corona-Cruz, A. I., González-de la Cruz, J. U., y Rojas-Herrera, R. A. 2014. Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 2(4), 99-115.
- De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N. y Verstraete W. 2008. The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture*, 277(3-4): 125-137.
- Díaz, R.G. y Wachter, R.C. 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 45: 30-40.

- Dorsey, J.H., Carmona-Galindo, V., Leary, C., Huh, J. y Valdez, J. 2013. An assessment of fecal indicator and other bacteria from an urbanized coastal lagoon in the city of Los Angeles, California, USA. *Environmental Monitoring & Assessment* 185(3): 2647–2669.
- Dotta, G. M., Pedreira, J. L., Jatobá, A., Burgos, M. R.E., Pitali, C. y Laterca, M.M. 2011. Acute inflammatory response in Nile tilapia fed probiotic *Lactobacillus plantarum* in the diet. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 33(3): 239-246.
- FAO. 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Roma, Italia, 231 p.
- FAO. 2014. The State of world fisheries and aquaculture - SOFIA. Rome: FAO.
- FAO. 2016. Fishery and Aquaculture Statistics. Rome: FAO.
- FAO/WHO working group. 2001. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina (October 1–4, 2001).
- Fernández, D. A. 2005. Producción inducible de lactococina A, pediocina PA-1, colicina V e interleuquina-2 en cepas de *Lactococcus lactis* productoras de nisina, Tesis Doctoral.
- Fisher, R.A., Corbet, A.S. y Williams, C.B. 1943. The relation between the number of species and the number of individuals in a random sample of an animal population. *Journal of Animal Ecology* 12: 42-58.
- Frank, J.A., Reich, C.I., Sharma, S., Weisbaum, J.S., Wilson, B.A. y Olsen, G.J. 2008 Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 2461–2470.
- Fuentes, R.J.M. y Pérez, H.J.A. 1998. Isolation of *Aeromonas hydrophila* in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Veterinaria Mexico* 29: 117-119.
- Fuller, R. 1992. History and development of probiotics. In: *Probiotics: The Scientific Basis*, Vol. 232 (ed. by R. Fuller), pp.1-18. Chapman&Hall, London, UK.
- Gianoulis, T.A., Raes, J., Patel, P.V., Bjornson, R., Korbel, J.O. y Letunic, I. 2009. Quantifying environmental adaptation of metabolic pathways in metagenomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 1374–1379.
- Glaubitz, S., Lueders, T., Abraham, W.R., Jost, G., Jürgens, K., y Labrenz, M. 2009. <sup>13</sup>C-isotope analyses reveal that chemolithoautotrophic Gamma- and Epsilonproteobacteria

- feed a microbial food web in a pelagic redoxcline of the central Baltic Sea. *Environ. Microbiol.* 11, 326–337.
- Glencross, B.D. 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Aquaculture*, 1(2), 71-124.
- Góngora, C.M. 1998 *Mecanismos de resistencia bacteriana ante la medicina actual*. McGraw-Hill, Barcelona, 456 pp.
- Gotelli, N. J., y Colwell, R. K. 2011. Estimating species richness. *Biological diversity: frontiers in measurement and assessment*. Edited by: Magurran AE, McGill BJ.
- Grote, J., Jost, G., Labrenz, M., Herndl, G. J., y Jurgens, K. 2008. Epsilon proteobacteria represent the major portion of chemoautotrophic bacteria in sulfidic waters of pelagic redoxclines of the Baltic and Black Seas. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7546–7551.
- Grote, J., Schott, T., Bruckner, C. G., Glöckner, F. O., Jost, G., Teeling, H. y Jürgens, K. 2012. Genome and physiology of a model Epsilon proteobacterium responsible for sulfide detoxification in marine oxygen depletion zones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(2), 506-510.
- Hansen, G.H. and J.A. Olafsen, 1999. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microb. Ecol.* 38(1): 1-26
- Heip, C. 1974. A New Index Measuring Evenness. *Journal of Marine Biological Association*, 54: 555-557.
- Himabindu, K.V., Narottam, P. S., y Kamal, K.J. 2004. Effect of feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research* 35:501-507.
- Hsieh, S.L., Ruan, Y.H., Li, Y.C., Hsieh, P.S., Hu, C.H., Kuo, C.M. 2007. Immune and physiological responses in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture* 275, 335-341.
- Huber, I., Spanggaard, B., Appel, K.F., Rossen, L., Nielsen, T. y Gram, L. 2004. Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* 96: 117-132.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 44, 223-270.

- Janssen, P. H. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology*, 72(3), 1719-1728.
- Jayaprakash, N.S., Pai, S.S., Anas, A., Preetha, R., Philip, R. y Singh, B.I.S. 2005. A marine bacterium, *Micrococcus* MCCB 104, antagonistic to vibrios in prawn larval rearing systems. *Diseases of Aquatic Organisms* 68: 39–45.
- Ju, Z.Y., Forster, I., Conquest, L., Dominy, W., Kuo, W.C. y Horgen, F.D. 2008 Determination of microbial community structures of shrimp floc cultures by biomarkers and analysis of floc amino acid profiles. *Aquaculture Research* 39: 118–133.
- Kerstens, K., De Vos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P. y Stackebrandt, E. 2006. Introduction to the Proteobacteria. In *The prokaryotes* (pp. 3-37). Springer New York.
- Kirchman, D.L. 2002. The ecology of Cytophaga–Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiol Ecol* 39: 91-100.
- Klaenhammer, T.D.y Kullen, M.J. 1999. Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 50, 45-57.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M. y Glockner F.O. 2012. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 2012, 1–11.
- Kurokawa, K., Itoh, T., Kuwahara, T., Oshima, K., Toh, H. y Toyoda, A. 2007. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Research* 14: 169–181.
- Lakshmanan, R., y Soundarapandian, P. 2008. Effect of commercial probiotics on large scale culture of black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). *Research journal of microbiology*, 3(3), 198-203.
- Lambert, C., Bergh, O., Torkildsen, L., y Magnusen, T. 1999. Alternative to antibiotic treatment in scallop larval culture: Introduction y first results. *Books of Abstracts: 12 International PectinidWorkshop*.
- Lande, R. 1996. Statistics and partitioning of species diversity, and similarity among multiple communities. *Oikos*, 5-13.
- Lee, D. E., Lee, J., Kim, Y. M., Myeong, J. I. y Kim, K. H. 2016. Uncultured bacterial diversity in a seawater recirculating aquaculture system revealed by 16S rRNA gene amplicon sequencing. *The Journal of Microbiology*, 54(4), 296.

- López-Elías, J. A., Moreno-Arias, A., Miranda-Baeza, A., Martínez-Córdova, L. R., Rivas-Vega, M. E., y Márquez-Ríos, E. 2015. Proximate composition of bioflocs in culture systems containing hybrid red tilapia fed diets with varying levels of vegetable meal inclusion. *North American Journal of Aquaculture*, 77(1), 102-109.
- Luis-Villaseñor, I. E., Voltolina, D., Audelo-Naranjo, J. M., Pacheco-Marges, M. R., Herrera-Espéricueta, V. E., y Romero-Beltrán, E. 2015. Effects of Biofloc Promotion on Water Quality, Growth, Biomass Yield and Heterotrophic Community in *Litopenaeus Vannamei* (Boone, 1931) Experimental Intensive Culture. *Italian Journal of Animal Science*, 14(3), 3726.
- Lyautey, E., Lacoste, B., Ten-Hage, L., Rols, J.L. y Garabetian, F. 2005 Analysis of bacterial diversity in river biolms using 16S rDNA PCR-DGGE: methodological settings and ngerprints interpretation. *Water Research* 39: 380-388.
- Maclaurin, J. y Sterelny, K. 2008. What is biodiversity? The University of Chicago Press, Chicago. 224 p.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., y Parker, J. 1997. Brock biology of microorganisms (Vol. 11). Upper Saddle River, NJ: prentice hall.
- Magurran, A. E. 1988. Ecological diversity and its measurement. Princeton University Press, New Jersey, 179 pp.
- Margalef, D.R. 1958. Information Theory in Ecology. *General Systematics*, 3: 36-71.
- Martínez-Córdova, L. R., Emerenciano, M., Miranda-Baeza, A., y 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., Emerenciano, M., Miranda-Baeza, A., y 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., y López-Torres, M. A. 2016. Bacterial diversity studied by next-generation sequencing in a mature phototrophic *Navicula* sp-based biofilm promoted into a shrimp culture system. *Aquaculture Research*.
- Martins, P., Cleary, D.F., Pires, A.C., Rodrigues, A.M., Quintino, V., Calado, R., y Gomes, N.C. 2013. Molecular analysis of bacterial communities and detection of potential pathogens

- in a recirculating aquaculture system for *Scophthalmus maximus* and *Solea senegalensis*. PloS one, 8(11), e80847.
- McIntosh, D., Ji, B., Forward, B.S., Puvanendran, V., Boyce, D., y Ritchie, R. 2008. Culture-independent characterization of the bacterial populations associated with cod (*Gadus morhua* L.) and live feed at an experimental hatchery facility using denaturing gradient gel electrophoresis. *Aquaculture*, 275(1), 42-50.
- Menhinick, E.F. 1964. A Comparison of some Species-Individuals Diversity Indices Applied to Samples of Field Insects. *Ecology*, 45 (4): 859-861.
- Mishra, J. K., Samocha, T. M., Patnaik, S., Speed, M., Gandy, R. L., y Ali, A. M. (2008). Performance of an intensive nursery system for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, under limited discharge condition. *Aquacultural Engineering*, 38(1), 2-15.
- Monroy-Dosta, M.D.C., Lara-Andrade, D., Castro-Mejía, J., Castro-Mejía, G., y Coelho-Emerenciano, M.G. 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.
- Moreno, C.E. 2001. Métodos para medir la biodiversidad. MT Manuales y Tesis Sociedad Entomológica aragonesa (SEA). Zaragoza, España.
- Moreno-Arias, A., López-Elías, J. A., Miranda-Baeza, A., Rivas-Vega, M. E., Martínez-Córdova, L. R., & Ramírez-Suárez, J. C. 2017. Replacement of fishmeal by vegetable meal mix in the diets of *Litopenaeus vannamei* reared in low-salinity biofloc system: effect on digestive enzymatic activity. *Aquaculture Nutrition*.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., y Uitterlinden, A.G. 1993. Proling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700.
- Nhan, D.T., Wille, M., De Schryver, P., Defoirdt, T., Bossier, P., y Sorgeloos, P. 2010. The effect of poly  $\beta$ -hydroxybutyrate on larviculture of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 302, 76-81.
- Nielsen, H.B., Almeida, M., Juncker, A.S., Rasmussen, S., Li, J., Sunagawa, S., y Pelletier, E. 2014. Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex

- metagenomic samples without using reference genomes. *Nature biotechnology*, 32(8), 822-828
- Noss, R.F. 1990. Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical approach. *Conservation biology*, 4(4), 355-364.
- Pérez, T., Balcázar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., Halaihel, N., Vendrell, D., de Blas, I., y Muzquiz, J.L. 2010. Hostmicrobiota interactions within the fish intestinal ecosystem. *Mucosal Immunology*. 3: 355-360.
- Perner, M., Hansen, M., Seifert, R., Strauss, H., Koschinsky, A., y Petersen, S. 2013. Linking geology, fluid chemistry, and microbial activity of basalt- and ultramafic-hosted deep-sea hydrothermal vent environments. *Geobiology* 11, 340–355.
- Pielou, E.C. 1969. *An Introduction to Mathematical Ecology*. Wiley-Interscience John Wiley & Sons, 285 p.
- Porchas-Cornejo, M.A., Martínez-Porchas, M., Vargas-Albores, F., Gollas-Galvan, T., Martínez-Córdova, L.R., Vazquez-Euan, R., y Peña-Messina, E. 2017. High-resolution detection of bacterial profile of ocean water, before and after being used by shrimp farms. *Aquaculture International*, 1-11.
- Porteous, L.A., Seidler, R.J., Watrud, L.S. 1997. An improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications. *Mol Ecol* 6:787–791
- Quintana, A.A., 2001. Riesgo sanitario asociado al comercio de animales acuáticos. *Revista Aquatic*, 14 (1), 36-41.
- Rodríguez, P., y Vázquez-Domínguez, E. 2003. Escalas y diversidad de especies. Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía. Facultad de Ciencias. UNAM. México, 109-114.
- Sánchez-Romero, A., Miranda-Baeza, A., Antonio López-Elías, J., Rafael Martínez-Córdova, L., Tejeda-Mansir, A., y Marquez-Ríos, E. 2013. Effect of the photoperiod and the shrimp-macroalgae rate on removal of total ammonia nitrogen by *Gracilaria vermiculophylla*, cultivated with *Litopenaeus vannamei*, without water exchange. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41(5), 888-897.

- Samocha, T.M., Patnaik, S., Speed, M., Ali, A.M., Burger, J.M., Almeida, R. V., y Brock, D. L. 2007. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. *Aquacultural Engineering*, 36(2), 184-191.
- Schlesner, H., Rensmann, C., Tindall, B.J., Gade, D., Rabus, R., Pfeiffer, S., y Hirsch, P. 2004. Taxonomic heterogeneity within the Planctomycetales as derived by DNA–DNA hybridization, description of *Rhodopirellula baltica* gen. nov., sp. nov., transfer of *Pirellula marina* to the genus *Blastopirellula* gen. nov. as *Blastopirellula marina* comb. nov. and emended description of the genus *Pirellula*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(5), 1567-1580.
- Schluter, D., y Ricklefs, R.E. 1993. Species diversity: an introduction to the problem. *Species diversity in ecological communities*, 1-10.
- Serra, F.P., Gaona, C.A., Furtado, P.S., Poersch, L.H., y Wasielesky, 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(6), 1325-1339.
- Shannon, C.E. y WEAVER, W. 1949. *The Mathematical Theory of Communication*. University Illinois Press, Urbana, IL.
- Shao, M., Zhang, T., y Fang, H.H.P. 2009. Autotrophic denitrification and its effect on metal speciation during marine sediment remediation. *Water Res.* 43, 2961–2968.
- Sheldon, A.L. 1969. Equitability Indices: Dependence on the Species Count. *Ecology*, 50: 466-467.
- Shmida, A., y Wilson, M.V. 1985. Biological determinants of species diversity. *J. Biogeogr.*, 12: 1-20.
- Silva, E.F., Soares, M.A., Calazans, N.F., Vogeley, J.L., do Valle, B.C., Soares, R., y Peixoto, S. 2012. Effect of probiotic (*Bacillus* spp.) addition during larvae and postlarvae culture of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 44(1), 13-21.
- Simpson, E.H. 1949. Measurement of diversity. *Nature* 163: 688.
- Sissons, J.W. 1989. Potential of probiotic organisms to prevent diarrhoea and promote digestion in farm animals. *Journal of Science Food and Agriculture* 49,1-13.
- Staats, N., De Winder B., Stal L. y Mur L. 1999. Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipelagic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum*. *European Journal of Phycology* 34, 161–169.



- Stackebrandt, E. y Ebers, J. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology. Today* 8, 6–9
- Steele, H.L., y Streit, W.R. 2005. Metagenomics: advances in ecology and biotechnology. *FEMS Microbiology Letters* 247: 105–111.
- Suttle, C.A. 2007. Marine viruses major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology* 5: 801–812.
- Tacon, A.G.J., Cody J.J., Conquest L.D., Divakaran, S., Forster I.P. y Decamp, O.E. 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nutrition* 8, 121 – 138.
- Thompson, F.L., Abreu, P.C., y Cavalli, R.O. 1999. The use of microorganisms as food source for *Penaeus paulensis* larvae. *Aquaculture* 174: 139–153.
- Timmons, M. B., Holder, J. L., y Ebeling, J. M. 2006. Application of microbead biological filters. *Aquacultural engineering*, 34(3), 332-343.
- Tsai, S.H., Selvam, A., Chang, Y.P., y Yang, S.S. 2009. Soil bacterial community composition across different topographic sites characterized by 16S rRNA gene clones in the Fushan Forest of Taiwan. *Bot Stud*, 50, 57-68.
- Urbance, J.W., Bratina, B.J., Stoddard, S.F., y Schmidt, T.M. 2001. Taxonomic characterization of *Ketogulonigenium vulgare* gen. nov., sp. nov. and *Ketogulonigenium robustum* sp. nov., which oxidize L-sorbose to 2-keto-L-gulonic acid. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(3), 1059-1070.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos y Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological agents in aquaculture, *Micro. And Mole. Biol. Rev.*, 64 (4) 655-671.
- Vieira, F.N., Buglione, C.C., Mourino, J.P.L., Jatoba, A., Martins, M.L. y Schleder, D.D. 2010. Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harveyi*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 62: 631–638.
- Villarreal, H., Álvarez, M., Córdoba, S., Escobar, F., Fagua, G., Gast, F., y Umaña, A.M. 2006. Métodos para el análisis de datos: una aplicación para resultados provenientes de caracterizaciones de biodiversidad. *Manual de Métodos Para el Desarrollo de Inventarios de Biodiversidad*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia, 185-226.

- Wang, Y.B., Xu, Z.R., y Xia, M.S. 2005. The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds. Fisheries science, 71(5), 1036-1041.
- Wasieliesky, W., Atwood, H., Stokes, A., y 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), 396-403.
- Whittaker, R.H. 1960. Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. Ecological Monographs 30:279-338.
- Whittaker, R.H. 1972. Evolution and measurement of species diversity. Taxon 21:213-251.
- Whittaker, R.J., Willis, K.J., y Field, R. 2001. Scale and species richness: Towards a general, hierarchical theory of species diversity. J. Biogeogr., 28: 453-470.
- Wilson, M.B. y Shmida, A. 1984. Measuring beta diversity with presence-absence data. J. Ecol., 72: 1055-1064.
- Woebken, D., Fuchs, B.M., Kuypers, M.M., y Amann, R. 2007. Potential interactions of particle-associated anammox bacteria with bacterial and archaeal partners in the Namibian upwelling system. Applied and environmental microbiology, 73(14), 4648-4657.
- Wood, D. y Salzberg, S. 2014. Kraken: Ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. Genome Biol. 15: R46
- Wu, L., Peng, C., Peng, Y., Li, L., Wang, S., y Ma, Y. 2012. Effect of wastewater COD/N ratio on aerobic nitrifying sludge granulation and microbial population shift. Journal Environment Science 24(2): 234-241.
- Yuniasari, D., y Ekasari, J. 2010. Nursery culture performance of *Litopenaeus vannamei* with Probiotics Addition and Different C/N ratio under laboratory condition. HAYATI Journal of Biosciences, 17(3), 115.
- Zhou, X.X., Wang, Y.B., y Li, W.F. 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. Aquaculture, 287(3), 349-353.
- Zokaefifar, H., Balcázar, J. L., Saad, C. R., Kamarudin, M. S., Sijam, K., Arshad, A., y Nejat, N. 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish & shellfish immunology, 33(4), 683-689.

Žure, M., Munn, C.B., y Harder, J. 2015. Diversity of *Rhodopirellula* and related planctomycetes in a North Sea coastal sediment employing carB as molecular marker. FEMS microbiology letters, 362(17), fnv127.