



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**TRANSFORMACIÓN DE COMPUESTOS NITROGENADOS  
DURANTE EL CULTIVO DE CAMARÓN (*Litopenaeus vannamei*)  
BAJO CONDICIONES DE BIOFLÓCULOS Y EVALUACIÓN DE  
LOS PERFILES TAXONÓMICOS Y FUNCIONALES  
INVOLUCRADOS EN LA OXIDACIÓN DE AMONIO**

---

Por:

**Glen Ricardo Robles Porchas**

TESIS APROBADA POR LA

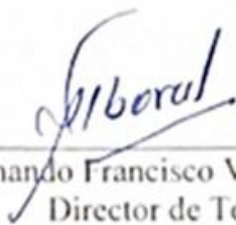
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Glen Ricardo Robles Porchas, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctorado en Ciencias.




---

Dr. Armando Francisco Vargas Albores  
Director de Tesis




---

Dr. Marcel Martínez Porchas  
Integrante del comité de tesis



---

Dr. Luis Rafael Martínez Córdova  
Integrante del comité de tesis



---

Dr. Anselmo Miranda Baeza  
Integrante del comité de tesis

---

Dra. Teresa Gollas Galván (†)  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Transformación de Compuestos Nitrogenados Durante el Cultivo de Camarón (*Litopenaeus vannamei*) Bajo Condiciones de Bioflóculos y Evaluación de los Perfiles Taxonómicos y Funcionales Involucrados en la Oxidación de Amonio" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Glen Ricardo Robles Porchas, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.  
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Graciela Cañe Juvera', is written over a horizontal line.

Dra. Graciela Cañe Juvera  
Directora General

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo económico otorgado durante la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) por darme la oportunidad de realizar mis estudios en su programa de maestría.

A Dios por prestarme vida, poner los medios para permitirme cumplir esta meta y nunca soltarme de la mano.

A mi asesor, Dr. Armando Francisco Vargas Albores por aceptarme en su equipo de trabajo, hacerme sentir en familia desde el primer momento, abrir las puertas de su laboratorio brindándome plena confianza desde aquella tarde de octubre del 2017. Por todas sus enseñanzas desde los primeros semestres hasta este momento, por aquellas platicas interminables en su oficina frente al pizarrón blanco, con el respectivo cafecito, por las anécdotas compartidas, por todas las sugerencias para mejorar mis bioensayos, artículos y tesis, sobre todo cuando hubo dificultades, que fueron bastantes. Por su apoyo incondicional en cualquier cosa que necesité durante mi doctorado, incluso aun estando en período vacacional. Por los buenos momentos que tuvimos todo el grupo de trabajo, incluidas las carnitas asadas, festejos y días de reunión de laboratorio, etcétera. Es difícil expresar mi agradecimiento en palabras hacia usted por toda su ayuda en estos más de cinco años, sin embargo, de lo que no tengo duda es que sin su apoyo no lo hubiera logrado. Solamente puedo decirle “Muchas gracias Dr. Vargas”. Fue un honor ser su alumno.

Al Dr. Marcel Martínez Porchas por su apoyo durante mi doctorado, por siempre estar presente cuando necesité de su ayuda, por permitirme trabajar en su laboratorio desde el primer momento y nunca escatimar recursos cuando se necesitó. Siempre le estaré muy agradecido por la confianza depositada en mí desde el inicio del posgrado y nunca dudar que lo lograría, gracias por todas esas palabras de ánimo, enseñanzas y platicas que tuvimos en el laboratorio, acompañados de un buen café, tanto a nivel académico, pero sobre todo a nivel personal, especialmente en las etapas más

difíciles de mi vida. Definitivamente compartimos muchos buenos momentos, aunque también hubo algunos tristes, pero aun así siempre atesoraré todos esos recuerdos. Mi agradecimiento por todo, usted fue una pieza fundamental para poder cumplir esta meta. Simplemente puedo decirle “Muchas gracias Dr. Marcel”. Pero dicho con más confianza, por el gran primo que eres y el cariño que te tengo, “Muchas gracias Marcel”.

A la Dra. Teresa Gollas Galvan (QEPD), le agradezco su excelente disposición de ayudarme el tiempo que estuvo con nosotros, por todas las sugerencias enriquecedoras para mi trabajo y por la disponibilidad de atenderme en todo momento. “Gracias Dra. Tere”.

Al Dr. Luis Rafael Martínez Córdova por aceptar formar parte de mi comité, por brindarme todas las facilidades para realizar los bioensayos en las instalaciones del DICTUS y siempre animarme a seguir adelante aun cuando algún bioensayo falló. Le agradezco su entera disposición para atender cada una de las ocho reuniones de comité que tuvimos, incluso cuando alguna de ellas fue en horarios complicados para usted. Le agradezco todas sus aportaciones y sugerencias durante el doctorado, sobre todo la confianza que depositó en mi tanto a nivel académico al encargarme tareas extras, como a nivel personal. “Muchas gracias por todo Dr. Luis”.

Al Dr. Anselmo Miranda Baeza por aceptar la invitación de formar parte de mi comité cuando se lo solicitamos, le agradezco porque aún a la distancia, siempre estuvo disponible para estar presente en todas las reuniones de comité por videoconferencia. Le agradezco todos sus comentarios y aportaciones, primeramente, durante la fase experimental y también en el documento de tesis. “Muchas gracias Dr. Anselmo”.

Al MC. Enrique Villalpando Canchola por todo su apoyo en el laboratorio desde el primer momento, especialmente por siempre estar disponible para realizar salidas de campo a las granjas acuícolas, “Muchas gracias Enrique”.

A Azucena Santacruz Granillo por el apoyo técnico brindando en el laboratorio durante mi doctorado, por siempre ayudarme cuando se lo solicité y por su amistad. “Gracias Azu”.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio durante la primera mitad de mi doctorado: Miguel Antonio Arvayo Porchas (QEPD), Jannel Vega Figueroa, Melissa Camberos Solano y Gilberto Carrillo Lozano, primeramente, por su amistad, pero también, por todos los buenos momentos que compartimos en el laboratorio, convivencia que nos hizo más amena la estancia en CIAD, pero sobre todo por los momentos fuera del laboratorio, festejos, carnes asadas, etcétera. Sin embargo, también es imposible olvidar cuando hubo complicaciones en algún experimento, a pesar de trabajar en proyectos diferentes, el apoyo como grupo siempre se hizo presente. Solamente puedo agradecer el haberlos conocido y decirles mi amistad siempre estará para ustedes. “Muchas gracias amigos”.

A mis compañeras de laboratorio en la segunda y última parte de mi doctorado con quienes hice una gran amistad: Dra. Estefanía Garibay Valdez, Dra. Diana Medina Félix, Dra. Rocío Valenzuela, por todos los buenos momentos compartidos en el laboratorio siempre llenos de risas, alegrías, bromas, etcétera. Pero también, por siempre apoyarnos en todo lo que necesitábamos aun cuando implicaba trabajar fuera del horario laboral, por haber formado un verdadero equipo de trabajo y demostrar ese apoyo sincero cuando las cosas no iban bien, así como tener las palabras adecuadas para animarnos entre todos a seguir adelante. Principalmente, porque todos comprendemos el sacrificio que implica estar en un posgrado. También, imposible olvidar las reuniones fuera del laboratorio, especialmente los viernes, cuando no ocupábamos motivo para salir a convivir, incluidas las carnitas asadas. El tiempo que convivimos lo disfruté mucho y siempre los recordaré. Definitivamente mi estancia en CIAD no hubiera sido igual sin ustedes. Muchas gracias amigas por haber sido parte de esto, mi amistad sincera siempre estará para usted, “Gracias LBT Team”.

Al MC. José Luis Nieblas Larreta por el apoyo técnico brindado en DICTUS con los bioensayos realizados durante la primera mitad de mi doctorado. Le agradezco toda su ayuda y enseñanzas en ese período de tiempo, así como por siempre haber estado al pendiente de mis bioensayos, incluso en fines de semana. No puedo dejar de agradecerle también por las salidas de campo a las granjas acuícolas. “Gracias José Luis”.

Agradezco a toda mi familia, mis tíos y primos por todo su apoyo, consejos y palabras de aliento

cuando me veían cabizbajo, por siempre estar cuando los necesité y demostrarme su cariño de una y mil maneras, “Muchas gracias”.

Finalmente, agradezco a todos mis amigos y a todas aquellas personas que estuvieron presentes y me ayudaron de una u otra forma durante mi doctorado.

¡GRACIAS!

## DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis primeramente a mis padres, **Rosa Porchas Cornejo y Ricardo Robles Quintana** quienes han sido mi mayor orgullo, ejemplo de vida y un pilar fundamental en mi formación tanto académica como personal, demostrándome su apoyo incondicional desde el momento que salí de casa para estudiar la licenciatura aquel 16 de agosto del 2009, hasta el día de hoy que culmino mi doctorado. No existen palabras que puedan describir el amor y agradecimiento que siento por ustedes, gracias por todo lo que han hecho por mí, por todo su apoyo en los momentos buenos, pero sobre todo en los momentos difíciles de mi vida, gracias por nunca dejarme caer y por siempre tener las palabras correctas para animarme. Gracias por haberme acompañado en este largo camino que fue el doctorado y nunca soltarme de la mano, por siempre estar al pendiente, escucharme, aconsejarme y entenderme aun en mis momentos de frustración. Gracias por todas sus enseñanzas, por haber formado en gran parte el hombre que ahora soy, y por todas las experiencias compartidas conmigo, siempre atesoraré todos esos recuerdos con mucho cariño. Mi agradecimiento hacia ustedes será eterno y sé que nunca podré pagarles lo que han hecho por mí. Esto no hubiera sido posible sin ustedes y siempre estaré agradecido con Dios por los maravillosos padres que me dio, este logro también es suyo, espero hacerlos sentir tan orgullosos de mí, así como yo me siento de ser su hijo.

GRACIAS POR TODO.

A mis hermanas, Araicel y Roseedlín Robles Porchas, gracias por todo el apoyo y sus muestras de cariño, gracias por todos los momentos que hemos compartido y por demostrarme su amor sincero. Me siento más que bendecido por tenerlas a ustedes como hermanas, y agradezco mucho a Dios por ello.

A mis sobrinos Eduardo y Sara Loera Robles, quienes a pesar de no ser conscientes de lo que su tío/nino está logrando, son tan importantes en mi vida que me motivaron a seguir adelante. Agradezco a Dios por su vida pequeños.

Quiero dedicar mi tesis a una persona muy especial pero que desafortunadamente se nos adelantó en el camino. Mi primo **Miguel Antonio Arvayo Porchas** (QEPD), a quién de cariño le decíamos



“**Micky**”, y con quien además de convivir de manera familiar tuve la dicha de compartí el mismo lugar de trabajo en CIAD, especialmente en su último año de vida. Sé que estarías muy contento por este logro ya que siempre me lo manifestaste. Lejos de reprochar tu partida le agradezco a Dios el tiempo que nos permitió compartir, a pesar de lo doloroso que ha sido tu ausencia, en tu honor he intentado e intentaré vivir lo más normal posible. Sé que así lo hubieras querido. Nunca podré olvidar los buenos momentos que pudimos compartir, ya que fueron demasiados, tanto adentro como afuera del laboratorio, así que no terminaría de contarlos. Pero, aquellas pláticas en el laboratorio que parecían no tener fin, y como siempre esperábamos la llegada de nuestro primo Marcel para seguir platicando, siempre las llevare en mis recuerdos. Nunca te olvidaremos. Un abrazo hasta el cielo **Micky**, sé que algún día nos volveremos a ver.

Por último, pero no menos importante, dedico esta tesis a cuatro grandes ángeles que tengo en el cielo, a quienes siempre les estaré agradecido por los maravillosos padres que me dieron y por sus enseñanzas. A pesar de haberse adelantando, siempre los llevo en mi corazón y los recuerdo con cariño.

**Mis abuelos:**

**Miguel Porchas Jiménez** †

**María Enriqueta Cornejo Trujillo** †

**Gilberto Robles Coronado** †

**Eloisa Quintana Figueroa** †

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	2
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	8
<b>CONTENIDO</b> .....	10
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	12
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	14
<b>RESUMEN</b> .....	15
<b>ABSTRACT</b> .....	17
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	19
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	33
2.1. Bacterias no Cultivables .....	33
2.2. Plataformas de Secuenciación .....	34
2.3. Procesamiento Bioinformático .....	35
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	37
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	38
4.1. Objetivo General.....	38
4.2. Objetivos Específicos .....	38
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	39
5.1. Bioensayo #1 .....	39
5.1.1. Colecta y Conservación del Consorcio Microbiano .....	39
5.1.2. Reactivación del Consorcio Liofilizado y Generación del Inóculo .....	39
5.1.3. Monitoreo Durante la Fase de Generación y Maduración del Bioflóculo .....	39
5.1.4. Diseño Experimental.....	40
5.1.5. Biometría .....	41
5.1.6. Análisis estadístico. ....	41
5.2. Bioensayo #2 .....	41
5.2.1. Generación y Maduración del Bioflóculo.....	41
5.2.2. Oxidación de Amonio .....	43
5.2.3. Análisis Metagenómico .....	44
5.2.4. Construcción de Genotecas.....	44
5.2.5. Descripción Taxonómica .....	46
5.2.6. Predicción Funcional .....	48
5.2.7. Análisis Estadístico.....	49
<b>6. RESULTADOS</b> .....	51
6.1. Consorcio Inicial .....	54

## CONTENIDO (continuación)

6.1.1. Reactivación y Preparación del Inóculo Inicial .....	54
6.1.2. Composición Taxonómica del Consorcio Inicial.....	55
6.2. Maduración del Bioflóculo.....	57
6.2.1. Generación y Maduración del Bioflóculo.....	57
6.2.2. Fase de Oxidación de Amonio.....	73
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>85</b>
7.1. Consorcio Inicial .....	87
7.1.1. Reactivación y Preparación del Inóculo Inicial .....	87
7.1.2. Composición Taxonómica del Consorcio Inicial.....	88
7.2. Maduración del Bioflóculo.....	89
7.2.1. Generación y Maduración del Bioflóculo.....	89
7.2.2. Clasificación Taxonómica de los Bioflóculos Maduros .....	91
7.2.3. Predicciones Funcionales de las Comunidades de los Bioflóculos Maduros .....	93
7.3. Fase de Oxidación de Amonio.....	94
7.3.1. Clasificación Taxonómica de los Bioflóculos Maduros Durante la Fase de Oxidación de Amonio .....	95
7.3.2. Predicciones Funcionales.....	97
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>99</b>
<b>9. REFERENCIAS .....</b>	<b>100</b>
<b>10. ANEXOS .....</b>	<b>122</b>
10.1. Diagrama General de Trabajo Durante las Fases de Generación y Maduración del Bioflóculo.....	122
10.2. Diagrama de Trabajo Durante la Fase de Oxidación de Amonio.....	123
10.3. Flujo de Trabajo Durante la Preparación de las Muestras Secuenciadas .....	123
10.4. Lista de ID (KEGG) de las Funciones L3 Encontradas Durante la Fase de Oxidación de Amonio .....	124

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Proceso de nitrificación llevado a cabo por bacterias nitrificantes.....	25
2	Diagrama general de trabajo del programa QIIME2.....	47
3	Parámetros de calidad del agua durante el cultivo de camarón blanco ( <i>L. vannamei</i> ) en todos los tratamientos por diez semanas.....	52
4	Biomasa generada durante las diez semanas del bioensayo con cultivo de camarón blanco ( <i>L. vannamei</i> ).....	53
5	Concentración de compuestos nitrogenados en el cultivo de camarón blanco ( <i>L. vannamei</i> ) durante las diez semanas del bioensayo.....	54
6	Sobrevivencia de <i>L. vannamei</i> en los tratamientos de bioflóculo, control con recambio de agua y control sin recambio de agua durante las diez semanas del bioensayo.....	55
7	Composición taxonómica del consorcio inicial a nivel de filo.....	57
8	Parámetros de calidad del agua durante las ocho semanas del bioensayo #2 en todos los tratamientos.....	60
9	Concentración de compuestos nitrogenados durante las ocho semanas del bioensayo #2.....	61
10	Composición taxonómica de los bioflóculos a nivel de filo en los tres tratamientos (bioensayo #2).....	64
11	Mapa de calor de la composición taxonómica del consorcio inicial y de los tratamientos con bioflóculos (bioensayo #2).....	65
12	Diagrama de ven a nivel de filo con una abundancia >1% por tratamiento (bioensayo #2).....	66
13	Clasificación taxonómica a nivel de familia durante la maduración de los bioflóculos (bioensayo #2).....	67
14	Participación de grupos bacterianos a nivel de familia con el 1% de abundancia durante la fase de maduración de los bioflóculos.....	68
15	Diagrama de ven de los grupos taxonómicos a nivel de familia compartidas en todos los tratamientos durante la maduración de los bioflóculos (bioensayo #2).....	69
16	Análisis de beta diversidad (PCoA) durante la maduración de los bioflóculos (bioensayo #2).....	73
17	Concentración del nitrógeno amoniacal total (NAT) durante la fase de oxidación de amonio a las 24 y 48 h en los bioflóculos maduros.....	78
18	Composición taxonómica de los bioflóculos durante la fase de oxidación de amonio (bioensayo #2).....	79

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
19	Análisis taxonómico a nivel de familia durante la fase de oxidación de amonio para el T 0h= Tiempo0 a b c, T 24h= Tiempo24 a b c, T 48h= Tiempo48 a b c. (bioensayo #2).....	80
20	Análisis de componentes principales (PCoA) de beta diversidad durante la fase de oxidación de amonio (bioensayo #2).....	83
21	Mapa de calor de las funciones predichas por PICRUSt2 durante la fase de oxidación de amonio a las 0, 24 y 48h (bioensayo #2).....	85
22	Modificación de la abundancia funcional enzimática durante la fase de oxidación de amonio (bioensayo #2).....	86

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Porcentaje promedio de las familias presentes en el consorcio, originalmente liofilizado, que ha sido activado y se usó como inóculo inicial.....	58
2	Porcentaje promedio de los filos en los bioflóculos madurados en agua de mar con diferente tratamiento. En negritas los filos con mayor participación (en promedio > del 3%).....	63
3	Porcentaje promedio de las familias con mayor participación ( $\geq 1\%$ ) en todos los bioflóculos, en función del tipo de agua donde fueron madurados.....	70
4	Índices de alfa diversidad (media $\pm$ desviación estándar) durante la maduración de los bioflóculos.....	71
5	Resultados del análisis multivariante permutacional de la varianza (PERMANOVA) tras la comparación por pares (A: Bray-Curtis, B: Jaccard, C: Unifrac ponderada y D: Unifrac no ponderada distancias [4999 permutaciones]) entre los tratamientos.....	72
6	Vías KEGG nivel-1 involucradas durante la fase de maduración de los bioflóculos.....	75
7	Claves en la base de datos KEGG para identificación de rutas metabólicas a nivel 3 y 4.....	76
8	Enzimas implicadas en el metabolismo del nitrógeno según la base de datos KEGG.....	76
9	Composición taxonómica de los bioflóculos durante la oxidación de amonio: Familias con participación $\geq 1\%$ .....	81
10	Vías KEGG nivel-1 durante la fase de oxidación de amonio.....	84
11	Asociación entre rutas KEEG-L2 y funciones KEGG-L3.....	87
12	Potencial de diversidad funcional KEGG-L3 que aumentaron o disminuyeron su abundancia a las 24 y 48 h posterior a la adición de amonio.....	88

## RESUMEN

En los estanques de producción acuícola, el nitrógeno amoniacal total (NAT), nitritos ( $\text{NO}_2$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3$ ) son tóxicos, en diferentes escalas; por ello es necesario reducir su concentración. La tecnología de bioflóculos (BFT) es una alternativa eficiente en la transformación de dichos compuestos, principalmente a través del proceso de nitrificación y por la conversión de nitrógeno en biomasa bacteriana llevada a cabo por comunidades bacterianas nitrificantes y heterotróficas, respectivamente. En un primer bioensayo con duración de diez semanas fueron cultivados juveniles de *Litopenaeus vannamei* en acuarios con bioflóculos. En dicho tratamiento hubo una sobrevivencia del 67%, la biomasa incrementó de 43 a 128 g y no fueron generadas aguas de desecho.

En un segundo bioensayo se buscó obtener bioflóculos maduros en ausencia de organismos cultivables. A partir de ahí, se haría la demostración de la capacidad bioquímica para oxidar NAT y definir la composición bacteriana de los bioflóculos, así como las predicciones de las capacidades funcionales. La generación y maduración de los nuevos bioflóculos fue hecha con inóculos preparados en agua marina esterilizada (AME), agua marina clorinada (AMCl) y agua marina cruda (AMC). La maduración de los bioflóculos fue alcanzada en la semana seis. La oxidación del NAT fue más eficiente en el tratamiento con bioflóculos respecto al control en 24 h, con una tasa de oxidación en promedio de hasta 0.24 mg/L de NAT/h.

Taxonómicamente, el core bacteriano (a nivel de filo) de los bioflóculos maduros está constituido por: Proteobacteria (51.4%), Planctomycetes (17.5%), Bacteroidetes (8.7%), Chloroflexi (4.7%), Actinobacteria (4.4%), Firmicutes (3.9%), Cyanobacteria (3.3%) y Otros (6.1%). A nivel de familia, de los 150 taxones que fueron encontrados, el 14% de los casos el nivel de clasificación fue menor. De estas familias, 47 tuvieron en promedio una participación  $\geq 1\%$  en al menos un tratamiento. Quince familias fueron compartidas en todos los tratamientos; Halomonadaceae (6.2%), Rhodobacteraceae (5.7%), Pirellulaceae (5.5%), Phycisphaeraceae (4.5%), entre otros.

Las predicciones funcionales realizadas a los bioflóculos maduros y durante la oxidación de NAT, arrojaron que las funciones relacionadas al metabolismo (KEGG-L1) fueron las más abundantes (74%), A nivel L2 (KEGG) fueron encontradas funciones relacionadas al metabolismo energético, y dentro de esta última ruta metabólica fueron encontrados los procesos relacionados al

metabolismo del nitrógeno (KEGG-L3), incluido el proceso de nitrificación. Adicionalmente, en los bioflóculos fueron encontradas 21 enzimas implicadas en el metabolismo del nitrógeno según la base de datos KEGG.

**Palabras claves.** Tecnología de bioflóculos (BFT), maduración de bioflóculos, oxidación de NAT, perfiles taxonómicos, predicciones funcionales y KEGG.



## ABSTRACT

In aquaculture production ponds, total ammonia nitrogen (NAT), nitrites (NO<sub>2</sub>), and nitrates (NO<sub>3</sub>) are toxic on different scales; therefore, it is necessary to reduce their concentration. The biofloc technology (BFT) is an efficient alternative for these compound's transformation, mainly through the nitrification process and the conversion of nitrogen into bacterial biomass carried out by nitrifying and heterotrophic bacterial communities, respectively. Juvenile *Litopenaeus vannamei* were cultured under biofloc conditions in a first bioassay lasting ten weeks. This treatment had a 67 % survival rate, biomass increased from 43 to 128 g, and no wastewater was generated.

In a second bioassay lasting eight weeks, without the culture of organisms, the following aspects were evaluated to obtain mature biofloc; a) generation and maturation biofloc process, b) biochemical verification of the ability to oxidize NAT, c) identification of taxonomic profiles, and d) predictions of functional capacities. The generation and maturation of the new biofloc were done with three different inocula; sterilized seawater (SSW), chlorinated seawater (CSW), and raw seawater (RSW). Biofloc maturation was reached at week six. NAT oxidation was more efficient in the biofloc treatment than in control at 24 h, with an average oxidation rate up to 0.24 mg/L NAT/h.

Taxonomically, the bacterial core (at the phylum level) of mature biofloc consists of Proteobacteria (51.4%), Planctomycetes (17.5%), Bacteroidetes (8.7%), Chloroflexi (4.7%), Actinobacteria (4.4%), Firmicutes (3.9%), Cyanobacteria (3.3%) and Others (6.1%). Of the 150 taxa found at the family level, the classification level was lower in 14% of the cases. Of these families, 47 had, on average,  $\geq 1\%$  participation in at least one treatment. Fifteen families were shared in all treatments; Halomonadaceae (6.2%), Rhodobacteraceae (5.7%), Pirellulaceae (5.5%), Phycisphaeraceae (4.5%), among others.

Functional predictions made on mature biofloc and during NAT oxidation showed that functions related to metabolism (KEGG-L1) were the most abundant (74%), functions related to energy metabolism were found at the L2 level (KEGG), and within this last metabolic pathway, processes related to nitrogen metabolism (KEGG-L3) were found, including the nitrification process. Additionally, according to the KEGG database, 21 enzymes involved in nitrogen metabolism were

found in the biofloc.

**Keywords:** Biofloc technology (BFT), biofloc maturation, NAT oxidation, taxonomic profiles, functional predictions and KEGG.

## 1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de los años la seguridad alimentaria ha representado un reto a superar para cualquier sociedad, principalmente por el incremento acelerado de la población mundial, ya que se espera que para el año 2100 la población alcance los 9,100 millones de habitantes, con la agravante de la disminución de los recursos naturales y los cambios climáticos. En la búsqueda de alternativas que permitan la producción de alimentos de buena calidad y brinden la posibilidad de cubrir la creciente demanda alimentaria (Willett *et al.*, 2019; Desa, 2019), los alimentos provenientes del mar a través de la pesca podrían representar una de las mejores opciones (Park *et al.*, 2018), principalmente por su alto contenido proteico y de ácidos grasos poli-insaturados Omega-3 ( $\omega 3$ ), pero también, por ser bajos en grasas saturadas y colesterol (Cantoral *et al.*, 2017). Sin embargo, la pesca no alcanza a satisfacer la demanda de alimento y, además, pone en riesgo la sustentabilidad debido a la sobreexplotación de los recursos naturales (Eayrs, 2007).

A través de la acuicultura se vuelve posible la obtención de este tipo de alimentos, pero sin las desventajas que representa la pesca (Martínez-Córdova *et al.*, 2009; Gibbs, 2007). Esta actividad económica puede ser desarrollada tanto en agua salada como dulce, permitiendo el cultivo de diversas especies acuáticas, tanto de animales como vegetales, incluyendo los crustáceos, moluscos, equinodermos, peces, anfibios y algas (Greaves Fernández, 2015; Luchini, 2016). Si bien la acuicultura busca satisfacer la demanda de alimento, también se observan otros beneficios inherentes (Valenti *et al.*, 2018), como el desarrollo de las zonas rurales debido al aumento de los ingresos económicos, y la generación de nuevos puestos de trabajo, tanto de hombres como de mujeres, de diferentes edades y, muy importante, la generación de conocimiento de frontera en el área (Foale *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2017).

A pesar de las bondades que ha representado la producción de alimento a través de la acuicultura tradicional, esta sigue siendo rebasada por la demanda, motivo por el que se ha optado por la intensificación de los cultivos acuícolas, lo que permite aumentar la densidad de la siembra en el mismo espacio, pero sin incrementar el uso de agua y suelo (Oddsson, 2020). Sin embargo, esto ha ocasionado otro tipo de problemas, específicamente relacionados con la producción y acumulación de materia orgánica, compuestos nitrogenados en el agua y sedimentos en los estanques.

En este sentido, el excedente de la materia orgánica proviene del alimento no consumido, cadáveres

y otros detritos; mientras que los compuestos nitrogenados como el nitrógeno amoniacal total (NAT), el cual es la suma del amonio ( $\text{NH}_4^+$ , forma ionizada) y amoniaco ( $\text{NH}_3$ , forma no ionizada), donde la proporción de estos está definida principalmente por el pH, la temperatura y la salinidad (Khodami *et al.*, 2011), provienen de los desechos del catabolismo de los aminoácidos, representando entre 70-95% del aporte de nitrógeno en el agua (Bartoli *et al.*, 2008) y de las excretas de los organismos cultivados (25-30%) (Legarda *et al.*, 2021). Los nitritos ( $\text{NO}_2$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3$ ), provienen de la oxidación de NAT a nitrito, y posteriormente a nitrato, a través del proceso de nitrificación (Yun *et al.*, 2019).

Los compuestos nitrogenados existen de forma natural en los ambientes acuáticos; sin embargo, la concentración de estos suele aumentar en los cultivos intensivos, debido a las densidades de siembra. Esto puede llegar a representar un serio problema para la calidad del agua (Camargo *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2017; Liaset *et al.*, 2019), ya que la acumulación de compuestos tóxicos representa un riesgo para la salud de los organismos cultivados (Barbieri y Bondioli, 2015; Luo *et al.*, 2020; Romano y Zeng, 2013; Edwards, 2015; Henriksson *et al.*, 2018; Rosa *et al.*, 2020). La toxicidad de NAT es inmediata, lineal y depende de la dosis (Park *et al.*, 2007; Hegazi *et al.*, 2010). Por ejemplo, en la tilapia, además de afectar a la respuesta inmunitaria, este metabolito provoca una reducción del crecimiento, degeneración del tejido hepático, hiperplasia de las branquias, hiperexcitabilidad y, en última instancia, la muerte (Yilmaz, 2019).

En el camarón, los altos niveles de NAT en el agua afectan la asimilación de nutrientes, el crecimiento, la respuesta inmunitaria, el transporte y captación de oxígeno disuelto a través de las branquias, la muda y la supervivencia (Cheng *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2019; Lin y Chen, 2001; Lin y Chen, 2003; Camargo *et al.*, 2005; Kuhn *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010). Además, la exposición prolongada al NAT aumenta el riesgo de infección por patógenos, como *Vibrio alginolyticus*, *Lactococcus garvieae* y *Enterococcus* spp. (Li *et al.*, 2018). En términos generales, la presencia de NAT resulta inevitable en los cultivos acuícolas, razón por la cual este compuesto recibe mayor relevancia en cuanto a su monitoreo. No obstante, es posible regular su acumulación y favorecer su transformación en compuestos menos tóxicos.

La presencia de  $\text{NO}_2$  en los ecosistemas acuáticos, incluidos los estanques acuícolas, únicamente es posible como producto de la oxidación de NAT durante el proceso de nitrificación. La exposición prolongada a este compuesto afecta el intercambio cloruro-bicarbonato ( $\text{Cl}/\text{HCO}_3$ ) y el equilibrio de potasio (K). La intoxicación por nitritos, así como por el nitrógeno amoniacal total se

produce tras la difusión de estos compuestos a través de las membranas celulares en las branquias de los organismos acuáticos (Roumieh *et al.*, 2012) y el transporte activo a través de los canales iónicos dentro de las células (Huertas *et al.*, 2002). En el torrente sanguíneo, NO<sub>2</sub> oxidan reversiblemente el hierro de la hemoglobina, pasando del estado ferroso al férrico, y provocan la formación de metahemoglobina (Lewis y Morris, 1986; Martinez y Souza, 2002; Ciji *et al.*, 2012), en este estado, no puede realizar el intercambio O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (Jensen, 2003). Esto resulta en una clara manifestación de hipoxia y anemia hemolítica (Tucker *et al.*, 1989), lo que produce dificultades respiratorias en peces y puede conducir a la muerte (Dos Santos Silva *et al.*, 2018).

En los crustáceos, a diferencia de la hemoglobina, la hemocianina contiene dos átomos de cobre (Cu) en cada sitio de unión al O<sub>2</sub>, que cambia su estado de oxidación cuando se une al O<sub>2</sub>, lo que se observa fácilmente porque la proteína se vuelve azul, color característico de la oxihemocianina. Sin embargo, cuando entran en contacto con la hemolinfa, los nitritos oxidan irreversiblemente al Cu formando metahemocianina, la cual tiene baja afinidad por el O<sub>2</sub> (Cheng y Chen, 1999). En este sentido, el oxígeno que es transportado a los diferentes tejidos, así como la cantidad de O<sub>2</sub> disponible para el metabolismo disminuye hasta causar una hipoxia severa. En el caso de los camarones, estos pueden hiperventilar durante un período limitado de tiempo para compensar la demanda de oxígeno, pero, si la hipoxia es prolongada puede ocurrir la muerte por asfixia (Souza *et al.*, 2019).

Los nitratos, último subproducto derivado de la nitrificación, son considerados significativamente menos tóxicos que NAT y NO<sub>2</sub> (van Bussel *et al.*, 2012), y su concentración en los sistemas de acuicultura suele ser mayor (Camargo *et al.*, 2005; Hamlin, 2006). No obstante, la exposición prolongada y las concentraciones excesivas pueden llegar tener algunas implicaciones fisiológicas a largo plazo, e incluso causar la muerte de los animales acuáticos (Romano y Zeng, 2009; Romano y Zeng, 2007; Furtado *et al.*, 2014). Al igual que los nitritos, la intoxicación por nitratos en los peces ocurre por la formación de metahemoglobina (van Bussel *et al.*, 2012); sin embargo, los nitratos tienen menos afinidad por la hemoglobina, por lo que no se presenta una hipoxia aguda. Algunos peces como a trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y la carpa común (*Cyprinus carpio*), pueden tolerar concentraciones de nitrato de hasta 500 mg/L<sup>1</sup>; no obstante, a partir de 125 mg/L<sup>1</sup> se produce una disminución de la capacidad de osmorregulación y manifestaciones de metahemoglobinemia (Cheng y Chen, 2002a; Cheng y Chen, 2002b; Camargo *et al.*, 2005). También, en peces de agua dulce se han observado alteraciones en la función endocrina,

deformidades, dificultad en la natación y otros problemas en general (Steinberg *et al.*, 2018; Steinberg y Saba, 2008).

Con relación a lo anterior, la presencia de compuestos nitrogenados en el agua tiene efectos graves, lo que puede causar pérdidas económicas. Es importante buscar alternativas que permitan la remoción de estos compuestos tóxicos de los estanques acuícolas. La primera opción consiste en realizar recambios de agua; sin embargo, esto genera un impacto ambiental (Dauda, 2020), debido a que los efluentes generados son vertidos directamente al medio ambiente sin algún tipo de tratamiento previo de purificación (Dauda, 2020). Además, los recambios de agua producen: a) aumento en los costos operativos en cuanto a consumo de agua y energía, ya que en un día pueden llegar al 15% del volumen total; b) eliminación de los nutrientes del estanque (Jackson *et al.*, 2003; Crispim *et al.*, 2009); c) aumenta el riesgo de introducción de patógenos a los estanques al reponer el volumen de agua expulsada y d) impacto ambiental causado por las aguas de desecho, principalmente estar cargadas con materia orgánica, desechos de alimento no consumido, heces, etcétera, compuestos que son ajenos a los ecosistemas donde son vertidos (Flores *et al.*, 2007; Soria Freire, 2005; Li *et al.*, 2016; Finlay *et al.*, 2013). Lo anterior evidencia que el realizar recambios de agua en ocasiones representa más desventajas que beneficios, por lo que sería importante considerar otras alternativas.

Dentro de las opciones que reducen las desventajas de los recambios de agua surgieron los sistemas de recirculación o RAS (Recirculating Aquaculture Systems). Estos son considerados de alta complejidad estructural y donde, tal como su nombre lo indica, la calidad del agua se mantiene en óptimas condiciones al hacerla circular constantemente a través de diferentes tipos de filtros, incluyendo mecánicos y biológicos, así como por radiación ultravioleta (Verdegem *et al.*, 2006; Ray *et al.*, 2017; Dalsgaard *et al.*, 2013; Badiola *et al.*, 2012). Esta serie de filtros permiten mantener la calidad del agua en condiciones adecuadas para el cultivo de organismos acuáticos, y avanzar hacia una acuicultura sostenible (Rurangwa y Verdegem, 2015). Sin embargo, también presentan algunas desventajas, como, el costo de inversión inicial, los requerimientos tanto estructurales como tecnológicos, y lo relacionado al mantenimiento; recambio de filtros saturados y/o dañados, controladores de pH, clarificadores de sólidos, entre otros, así como la acumulación de residuos (Brailo *et al.*, 2019; Samocha, 2019; Zou *et al.*, 2018; Ray *et al.*, 2017).

Una segunda estrategia que ha sido utilizada exitosamente en la acuicultura es la tecnología de bioflóculos o BFT (Biofloc Technology), la cual presenta algunas ventajas y es económicamente

más accesible que RAS. Los sistemas BFT presentan beneficios tanto financieros como ambientales y está basado en la producción y mantenimiento de comunidades microbianas *in situ*, que deben permanecer en suspensión en la columna de agua (Crab *et al.*, 2010; Wasielesky *et al.*, 2006; De Schryver *et al.*, 2008). La versatilidad de esta tecnología permite utilizarla tanto en cultivos intensivos como hiperintensivos de peces, como la tilapia (Tubin *et al.*, 2020; Zaki *et al.*, 2020; Laice *et al.*, 2021; Khanjani y Sharifinia, 2021), y crustáceos como el camarón (*Litopenaeus vannamei*) (Sánchez-Muros *et al.*, 2020; Addo *et al.*, 2021; Khanjani *et al.*, 2017; de Melo Filho *et al.*, 2020; Legarda *et al.*, 2021).

Los sistemas BFT se basan en el uso de consorcios microbianos que se agregan para formar los bioflóculos, y tienen la capacidad de reciclar los nutrientes presentes en el agua y la conversión directa de NAT a biomasa bacteriana (Yun *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2019; Avnimelech, 2009). Esto permite reducir considerablemente los recambios de agua, y los costos involucrados, mientras se incrementa la bioseguridad (Wasielesky *et al.*, 2006; Avnimelech, 2007; Martínez-Córdova *et al.*, 2022). En los bioflóculos existe una gran diversidad de organismos microbianos, donde las bacterias y las microalgas predominan, pero también, aunque en menor proporción se encuentran: hongos, protozoarios, y otros organismos del fitozooplankton; así como restos de alimento, de heces y detritus orgánico (Hargreaves, 2006; Llarío *et al.*, 2019; Menaga *et al.*, 2019; Pilotto *et al.*, 2020; Marella *et al.*, 2020; da Paz Serra *et al.*, 2021).

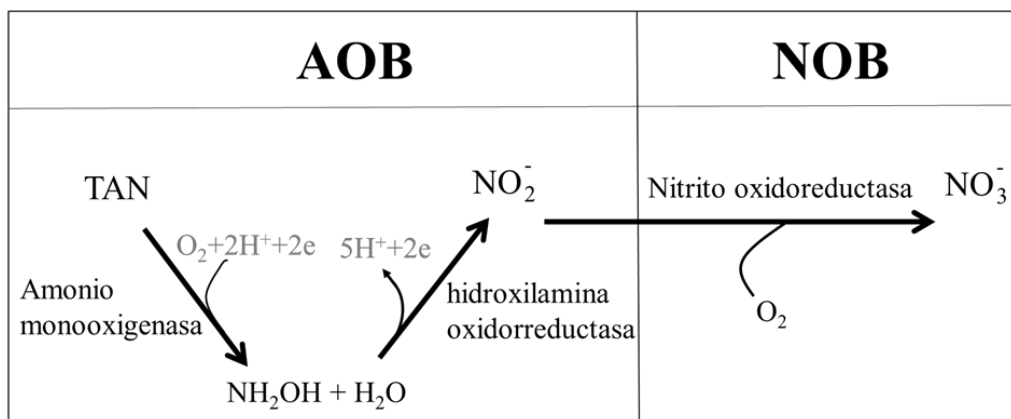
Los primeros microorganismos colonizadores de los bioflóculos son aquellos con la capacidad de aglutinarse entre sí y mantenerse unidos hasta la formación de flóculos, proceso que puede ser acelerado con el uso de una matriz orgánica (Hargreaves, 2013). Una vez que los colonizadores logran establecerse, las nuevas condiciones fisicoquímicas favorecen la incorporación de otros microorganismos presentes en el agua. Al paso de los días, la composición microbiana de los bioflóculos se va estabilizando hasta parecer casi constante, al alcanzar la madurez (Martínez-Córdova *et al.*, 2018b). En los bioflóculos deberán concurrir comunidades autotróficas, como las bacterias nitrificantes, y comunidades heterotróficas, las cuales son las responsables del reciclaje de nutrientes en el agua. La adecuada proporción de estas comunidades garantiza el éxito de los bioflóculos (Samocha, 2019; Dauda *et al.*, 2019).

La presencia de las bacterias tanto nitrificantes como heterotróficas hacen posible que los parámetros de calidad del agua se mantengan en rangos adecuados para el cultivo de organismos acuáticos, tanto en sistemas intensivos como hiperintensivos, lo que, adicionalmente, permite

trabajar con cero o mínimos recambios de agua, atenuando el impacto ambiental generado por la descarga de aguas de desecho cargadas con materia orgánica, detritus, alimento no consumido y metabolitos nitrogenados (Adineh *et al.*, 2019; Ahmad *et al.*, 2017). El reciclaje de nutrientes llevado a cabo por los bioflóculos se debe a dos procesos que, en conjunto, transforman los compuestos nitrogenados potencialmente tóxicos en productos inocuos o, mejor aún, en biomasa (Pierri *et al.*, 2015; Giatsis *et al.*, 2015);

**a)** La nitrificación es el primer proceso, que consiste en dos etapas vinculadas entre sí y llevadas a cabo por bacterias autótrofas bajo condiciones aeróbicas (Zhu *et al.*, 2012; Alzate Marin *et al.*, 2016; Pan *et al.*, 2018; Zou *et al.*, 2018): la oxidación del NAT a  $\text{NO}_2$  por acción de un grupo de bacterias denominado bacterias oxidantes de amoníaco (AOB, Ammonia oxidizing bacteria), el cual comprende dos reacciones, el primero con la formación de hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) como un intermedio crítico en los procesos de nitrificación (Arp y Stein, 2003; Vajjala *et al.*, 2013). Esta reacción es catalizada por la enzima amonio monooxigenasa (AMO) (Yin *et al.*, 2015), incluidas las subunidades amoA, B y C (Calvó-Perxas, 2005) unidas a la membrana, lo que requiere oxígeno molecular y un par de electrones para la oxidación de amoníaco a hidroxilamina. El segundo paso es una reacción catalizada por otra enzima, hidroxilamina oxidoreductasa (HAO), donde la hidroxilamina se oxida a nitrito usando oxígeno del agua y un oxígeno molecular adicional como aceptor de electrones terminales (Wunderlin *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2008). Posteriormente, el último paso de la nitrificación involucra la oxidación de  $\text{NO}_2$  a  $\text{NO}_3$  por las bacterias oxidantes de nitritos (NOB, Nitrite oxidizing bacteria) (Zhao *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2018), reacción catalizada por la enzima nitrito oxidoreductasa (Adineh *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2019) tal como muestra la figura 1, este último metabolito se acumula (Furtado *et al.*, 2014).





**Figura 1.** Proceso de nitrificación llevado a cabo por bacterias nitrificantes.

**b)** El segundo proceso de reciclaje de nutrientes en los bioflóculos es llevado a cabo por las bacterias heterotróficas, estas consumen tanto la materia orgánica presente en el medio como el nitrógeno, esto para mantener dos mecanismos: el primero es el anabolismo, producción de estructuras celulares y multiplicación, donde, finalmente, se genera biomasa bacteriana que puede ser una fuente natural de alimento de alta calidad y consumida por los organismos cultivados, el segundo mecanismo es el catabolismo, de donde se genera energía pero también se consume oxígeno (Gallardo-Collí *et al.*, 2019; Avnimelech, 2007; Kumar *et al.*, 2018; Gaona *et al.*, 2016). Al ser una rica fuente de proteínas, lípidos, carbohidratos, fibra, aminoácidos, ácidos grasos y algunos compuestos bioactivos (Hosain *et al.*, 2021; Panigrahi *et al.*, 2018), proporciona nutrición complementaria (Durigon *et al.*, 2020; Reis *et al.*, 2019; Ray y Lotz, 2017; Hosain *et al.*, 2021; Panigrahi *et al.*, 2018), lo que indirectamente se puede traducir en una reducción en los costos de producción relacionados a la alimentación (García-Ríos *et al.*, 2019).

Esto último resulta interesante para la acuicultura donde la alimentación representa entre el 40-60% de los costos operativos (Khatoon *et al.*, 2016). Así, BFT es una opción atractiva por permitir la reducción en los gastos de producción y adicionalmente, es ambientalmente amigable (Crab *et al.*, 2012; Braga *et al.*, 2015; García-Ríos *et al.*, 2019; Shao *et al.*, 2017; Hamidoghli *et al.*, 2018). Los bioflóculos además, favorecen el desarrollo de bacterias benéficas que pueden fungir como los probióticos (Hai, 2015; Kumar *et al.*, 2020). Los probióticos son microorganismos vivos que contribuyen en el crecimiento, desarrollo y supervivencia de los organismos cultivados, esto por tener implicaciones en la digestibilidad y asimilación de los alimentos y promover la respuesta inmune (Kumar *et al.*, 2021; Dash *et al.*, 2018; Duan *et al.*, 2017). Entre los mecanismos de acción

de los probióticos contra bacterias patógenos está la competencia directa por nutrientes y espacio, esto a través de la producción de compuestos inhibitorios e interfiriendo con la comunicación de detección de quorum (Holt *et al.*, 2021; Abakari *et al.*, 2021; AftabUddin *et al.*, 2020; Pilotto *et al.*, 2018; Abakari *et al.*, 2022).

Entre las bacterias probióticas presentes en los bioflóculos se encuentran las que pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Lactobacillus*, principalmente, donde su efecto benéfico es reconocido por la producción natural de compuestos antimicrobianos, antioxidantes y por contribuir al mejoramiento tanto de la morfología intestinal como de la microbiota de los organismos cultivados (Hai, 2015; Xu y Pan, 2013; Thy *et al.*, 2017; Long *et al.*, 2015; Ogello *et al.*, 2021; Ferreira *et al.*, 2015; Abdollahi-Arpanahi *et al.*, 2018; Samocha, 2019). La capacidad de los probióticos del género *Bacillus* ha sido demostrada al inhibir el crecimiento de *V. harveyi*, *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*, (Boopathy *et al.*, 2015; Tapaamorndech *et al.*, 2018; Aguilera-Rivera *et al.*, 2014). También, al suplementar la alimentación del camarón blanco (*L. vannamei*) con *B. aryabhatai* se estimula la expresión de los genes que codifican péptidos antimicrobianos y enzimas antioxidantes, incluyendo la lectina tipo C, la penaeidina-3, la proteína de choque térmico, la tiorredoxina y la ferritina (Tapaamorndech *et al.*, 2018).

Por otra parte, la suplementación combinada del probiótico *Clostridium butyricum* con el alimento tienen un efecto probiótico en el camarón kurama, *Marsupenaeus japonicus*, aumentando el rendimiento del crecimiento y la capacidad antioxidante del intestino (Duan *et al.*, 2017). En este sentido, el uso de probióticos comerciales parece ser una buena alternativa en la acuicultura, para cultivo de peces como la tilapia y los crustáceos como el camarón. Un ejemplo práctico es el uso de; PondPlus, Efinol y Epicin que, según sus etiquetas, incluyen; *Carnobacterium*, *Artrobacter*, *Bacillus* (*B. amyloliquefacins*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. subtilis* and *B. licheniformis*), *Brevibacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus sp*, *Lactobacillus acidophilus*, *Megaterium*, *Mycobacterium* y *Streptococcus faecium* (Huerta-Rábago *et al.*, 2019; Miranda-Baeza *et al.*, 2019).

Además, el uso de probióticos en la acuicultura se considera como una estrategia efectiva en el control de algunas enfermedades, como en el caso de la necrosis aguda del hepatopáncreas o AHPND (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease), causada por *Vibrio parahaemolyticus* y el virus de la mancha blanca o WSSV (White spot síndrome) (Panigrahi *et al.*, 2020; de Souza Valente *et al.*, 2020). También, la combinación de probióticos y bioflóculos ha permitido aumentar la

bioseguridad de los cultivos, mientras que se reduce la necesidad de utilizar antibióticos (Hernández-Mancipe *et al.*, 2019; Ekasari *et al.*, 2015; Ali *et al.*, 2016; Martínez-Córdova *et al.*, 2018a; Amenyogbe *et al.*, 2020).

Los bioflóculos están siendo ampliamente utilizado en la acuicultura por los beneficios que representan, incluyendo el mejoramiento en la calidad del agua, como una fuente complementaria de alimento y contar con capacidad protectora de las comunidades probióticas que conforman su biomasa (Plascencia y Almada, 2012; Durigon *et al.*, 2020; Reis *et al.*, 2019; Ray y Lotz, 2017). Sin embargo, la información referente al proceso de obtención y maduración, o fase “startup” de los bioflóculos, no ha sido totalmente descrita, motivo por el cual se ha dificultado el poder proporcionar condiciones idóneas para que las comunidades microbianas logren crecer y establecerse en los sistemas (Emerenciano *et al.*, 2017), y así, cumplir eficazmente las funciones mencionadas. En este sentido, es importante destacar que el manejo de los bioflóculos involucra el monitoreo constante de ciertos parámetros ambientales incluyendo la calidad del agua y así como contar con la capacidad de modificarlos. Adicionalmente es crucial el establecimiento de criterios de maduración de manera que el funcionamiento metabólico de los consorcios microbianos que forman la biomasa del biofloc sea el esperado, lo que mejorará las probabilidades de éxito.

En primer lugar, hay que considerar que la formación de los bioflóculos comúnmente comienza durante la primera semana de cultivo, y que dicho proceso puede ser acelerado a través de diversas estrategias, como es la utilización de un inóculo inicial. Estos inóculos pueden provenir de: a) bioflóculos establecidos previamente, el cual puede estar en forma de liofilizado, b) inóculos comerciales y, c) combinación de cepas bacterianas específicas, especialmente cepas probióticas (Ponce-Palafox *et al.*, 2019; de Melo Filho *et al.*, 2020; Braga *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2020; Pacheco-Vega *et al.*, 2018).

Sin embargo, el uso de algún inóculo inicial no necesariamente definirá la composición taxonómica final de los bioflóculos, ya que éstos estarán constituidos por todas las comunidades microbianas que se encuentren en el agua en ese momento y tendrán una interacción dinámica que favorecerá a unos durante las primeras etapas y a otros durante etapas más tardías. Aunque estos cambios dinámicos llevan su tiempo, es posible reducir el tiempo de floculación al utilizar un nucleadores que sirvan como un matriz adherente para las bacterias heterotróficas, principalmente; algunos ejemplos de nucleadores naturales son salvado de trigo, avena, amaranto, entre otros. Respecto al nucleador a utilizar es importante considerar el costo y disponibilidad (Martínez-Córdova *et al.*,

2018b; Lara-Espinoza *et al.*, 2016; Jia *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2017).

Además, los bioflóculos pueden ser producidos siguiendo diversas estrategias para obtener la comunidad inicial, por ejemplo, al ser cultivado tanto de manera *in-situ*, en presencia de organismos acuáticos, como *ex-situ*, en ausencia de los mismos (Samocho, 2019). A pesar de que en ambos casos hay similitudes en cuanto a las condiciones de cultivo, existen algunas consideraciones que diferencian ambos procedimientos. Cuando los bioflóculos son generados en la presencia de organismos, donde el proceso de maduración puede prolongarse debido al aporte constante de amonio, tanto de los organismos cultivados, alimento no digerido e incluso animales muertos. Estos factores no afectan cuando los bioflóculos son generados *ex-situ*.

En general, los aspectos que deben de ser considerados durante la generación y maduración de los bioflóculos son los siguientes:

- a) **El manejo de la relación Carbono:Nitrógeno (C:N)** por adición de una fuente de carbono orgánico y una de nitrógeno, lo que estimulará el crecimiento de las bacterias heterotróficas y nitrificantes involucradas en la transformación del nitrógeno en el estanque (Gaona *et al.*, 2016; Panigrahi *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2015). En caso de cultivo *in-situ*, la relación C:N inicial depende principalmente del alimento incorporado al estanque a través del alimento. Si se desea incrementarla, es necesario agregar una cantidad de C orgánico adicional, para lo cual se han propuesto una variedad de fuentes, incluyendo melaza de caña de azúcar (Garibay-Valdez *et al.*, 2022), dextrosa & salvado de arroz (Serra *et al.*, 2015), almidón de tapioca (Deng *et al.*, 2018) y celulosa vegetal (Oliveira *et al.*, 2022), entre otros. Para el caso de las bacterias heterotróficas, el mejor crecimiento es logrado al manejar una relación C:N >10:1, mientras que a una relación C:N <10:1 es favorecido el crecimiento de las bacterias nitrificantes (Martins *et al.*, 2020). Una relación C:N recomendada al trabajar con bioflóculos está entre 12-20:1 (Emerenciano *et al.*, 2017).
- b) **La medición de los sólidos sedimentables** permite estimar la producción de biomasa microbiana en el agua, aspecto clave durante la maduración y mantenimiento de los bioflóculos, además de ser un indicativo de la salud del entorno. Adicionalmente, esta biomasa bacteriana puede ser consumida por los organismos cultivados como alimento natural (Dauda, 2020; Durigon *et al.*, 2020; Braga *et al.*, 2015; Hosain *et al.*, 2021). Sin embargo, en el caso del cultivo *in-situ* es necesario monitorear el crecimiento de los bioflóculos, ya que una cantidad excesiva en el agua (>15 ml/L) puede llegar a obstruir las

branquias de los organismos cultivados (Luo *et al.*, 2020; Zemor *et al.*, 2019). En contra parte, en los cultivos *ex-situ* el monitoreo de la biomasa se vuelve necesaria para controlar la adición de sustratos. En este sentido, una de las formas de cuantificar el crecimiento de los bioflóculos es a través de mediciones de sólidos sedimentables en conos de sedimentación (conos Imhoff), donde niveles a partir de SS >15 ml/L pueden llegar a ser perjudiciales (Hargreaves, 2013). En cualquier caso, el exceso de biomasa puede ser retirada del estanque y desecharse, o puede ser reincorporada a nuevas preparaciones de alimento, e incluso, utilizarse para inocular otros estanques. Finalmente, si la masificación de los bioflóculos ha sido exitosa, se puede liofilizar una porción que podría ser reactivada posteriormente para la generación de nuevos bioflóculos.

- c) **Los manejos de los parámetros fisicoquímicos del agua durante el proceso de maduración de los bioflóculos son** de gran importancia, ya que la calidad de agua puede llegar a afectar tanto positiva como negativamente a las comunidades microbianas que conforman los bioflóculos, así como a los organismos cultivados. En este sentido, los parámetros que deben de ser monitoreados durante este proceso son: temperatura (28-30 °C, rango de temperatura ideal para especies tropicales), pH (6.8-8, valores por debajo de 7 en los bioflóculos pueden ser normales, pero podrían afectar el proceso de nitrificación), salinidad (30-35 UPS, pero para el caso del proceso *in-situ*, dependerá del organismo que se cultive, ya sea de agua dulce o agua salada o salobre), oxígeno disuelto (>4.0 mg/L para garantizar la demanda de O<sub>2</sub> de los organismos cultivados, y cubrir la tasa de respiración de las bacterias, lo que, además, evitaría caer en hipoxia). Así también, la intensidad de la aireación debe de ser suficiente para mantener las partículas de los bioflóculos en suspensión, pero no tan vigorosa como para llegar a destruirlas. Los niveles de alcalinidad (>100 gm/L) también son importantes, ya que valores adecuados ayudan a la asimilación del nitrógeno por parte de las bacterias heterótrofas y al proceso de nitrificación realizado las bacterias quimioautótrofas, además de mantener un rango de pH estable (Emerenciano *et al.*, 2017; Samocha, 2019; Abakari *et al.*, 2022; Bartoli *et al.*, 2008; Pierri *et al.*, 2015; Gonzalez-Ruiz *et al.*, 2020).
- d) **La luz solar** favorece el crecimiento de organismos fotoautótrofos en los bioflóculos como las microalgas (diatomeas, dinoflagelados), cianobacterias, etcétera. Sin embargo, la prioridad es promover el crecimiento de los grupos bacterianos involucrados directamente en

el metabolismo de los compuestos nitrogenados en el agua, es decir, a las bacterias heterotróficas y quimioatotróficas, por lo que es necesario reducir al máximo el contacto con la luz solar, o incluso llegar a condiciones de completa oscuridad (Samocha, 2019; Hargreaves, 2013).

- e) **La coloración del agua** durante el cultivo de bioflóculos es un indicativo de una transición de las comunidades microbianas predominantes y de la maduración. Un cambio de tonalidades color verde a café en el agua, es indicativo de una transición de microalgas a bacterias (Samocha, 2019; Hargreaves, 2013). Una vez que las comunidades bacterianas que conforman los bioflóculos logran establecerse en el sistema, proceso que puede tomar hasta 50 días (Emerenciano *et al.*, 2017), el reciclaje biológico de nutrientes que están presentes en el agua, como los compuestos nitrogenados, se vuelve posible. Este proceso ocurre tanto por asimilación heterotrófica (transformación de amonio a biomasa bacteriana), o a través de la nitrificación autotrófica por bacterias nitrificantes (Xu *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2019).

Por último, la prueba de confirmación que demuestra que los bioflóculos han madurado es a través de la medición de su capacidad bioquímica para oxidar NAT, independientemente de la concentración de este compuesto, lo que indicaría que los bioflóculos están listos para eliminar la materia orgánica y transformar los residuos tóxicos nitrogenados producidos por los organismos cultivados, en metabolitos para la síntesis de proteínas y otros compuestos activos (García-Ríos *et al.*, 2019; Ge *et al.*, 2015; Yun *et al.*, 2019). Si bien es conocido que los procesos de eliminación del nitrógeno que ocurren en los bioflóculos son llevados a cabo por acciones de las comunidades bacterianas nitrificantes y heterotróficas, el poder identificarlas brindaría un mayor panorama en cuanto a su participación en dichos procesos; sin embargo, la identificación bacteriana por técnicas tradicionales como el cultivo ha sido tarea difícil, principalmente debido a la escasa información sobre los requerimientos nutricionales y ambientales para su cultivo (Hernández-León *et al.*, 2010; Riesenfeld *et al.*, 2004). Adicionalmente, considerando que alrededor del 80% de las bacterias que coexisten en cualquier muestra ambiental son no cultivables o no fácilmente cultivables (Rashid y Stingl, 2015), la identificación de este tipo de bacterias se vuelve aún más complicada. No obstante, la secuenciación de alto rendimiento de marcadores genéticos taxonómicos está revelando la existencia de una diversidad considerable de bacterias no cultivables, incluidas las nitrificantes y heterotróficas (Daims *et al.*, 2016; Purkhold *et al.*, 2000; Koops y Pommerening-Röser, 2001). Además, la secuenciación del ADN genómico y las nuevas herramientas de ensamblaje *de novo*

podrían contribuir a conocer mejor estos organismos (Ortiz-Estrada *et al.*, 2019).

La identificación de bacterias a través de la secuenciación del ADN ha facilitado los avances en el conocimiento de los sistemas vivos, y generado gran cantidad de logros científicos importantes, como la identificación de genes nuevos. La tecnología de secuenciación masiva de nueva generación (NGS, Next Generation Sequencing) permite generar millones de secuencias de ácidos nucleicos en corto tiempo y con costos cada vez menores (Patel y Jain, 2012; Reza y Teresa, 2014), ya que esta metodología permite alcanzar la producción de “Gigabases” o “Terabases” de información genómica en un solo experimento (Sedano y Carrascal, 2012). En este sentido, la mayor ventaja que presenta la metagenómica con respecto a los métodos que son dependientes de cultivos, es que a partir de los genomas presentes es posible la descripción de la estructura de las comunidades microbianas en cuanto a su riqueza y distribución. A partir de la información genómica es posible realizar el análisis funcional de genes, proteínas, enzimas, análisis filogenéticos, taxonómicos y funcionales a nivel de especie de diversos tipos de microorganismos, entre los cuales destacan las bacterias, hongos, arqueas y virus (Cadena-Zamudio *et al.*, 2016).

El gen ribosomal 16S (16S-ARNr) codifica para un componente de la subunidad 16S de los ribosomas procariontes y, debido a la presencia de regiones muy conservadas, fue propuesto por Carl Woese a principios de la década de los 70' (Bou *et al.*, 2011) como un marcador universal y/o cronómetro molecular, siendo actualmente el más utilizado en los estudios de filogenia y taxonomía bacteriana (del Rosario Rodicio y del Carmen Mendoza, 2004; Medina *et al.*, 2010; García-Sánchez *et al.*, 2015). La taxonomía puede realizarse por medio de este gen cuyo resultado es más certero, sólido y reproducible que los análisis fenotípicos, ya que es capaz de resolver aproximadamente el 90% de las identificaciones. Además, no se necesita analizar la secuencia de todo el gen y puede ser realizada con cualquier región variables (V1-V3 o V1, V2, V3, V4, V3-V4 o V6). Aunque tiene algunas debilidades, esta metodología se encuentra dentro de las más eficientes, confiables y modernas (Cuadra, 2017).

El análisis del gen 16S-ARNr se lleva a cabo por la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction), técnica molecular que permite reproducir exponencialmente copias de ADN (Lorenz, 2012). El procedimiento consiste en tratar al ADN con temperaturas (95 °C) para desdoblarse su cadena y permitir a los “primers” o “cebadores” alinearse con ella al disminuir la temperatura, así, la enzima ADN polimerasa puede iniciar la copia de cada hebra al aplicar temperatura óptima para su actividad. Repitiendo este procedimiento, se pueden obtener una gran

cantidad de copias de fragmentos de ADN en pocas horas (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Por todo lo anterior, esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto del proceso de maduración de bioflóculos en el cultivo de camarón (*L. vannamei*), así como determinar el efecto de un cultivo iniciador para la generación y maduración de bioflóculos nuevos, e identificar sus comunidades de bacterias y clasificar a aquellas involucradas en los procesos relacionados con el metabolismo del nitrógeno.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Bacterias no Cultivables

Se ha observado que en sedimentos marinos o fuentes termales solo entre el 0.01 y el 1% de las células microscópicamente visibles llegan a formar colonias en una caja Petri. Este resultado, conocido como “la gran anomalía del recuento de placas”, es un problema aún sin resolver por la microbiología tradicional (D'Onofrio *et al.*, 2010). En el caso de la acuicultura, el uso de métodos dependientes de cultivo ha sido útil para el estudio de una pequeña fracción de las comunidades bacterianas. Entre el 85 y el 99% de las bacterias del medio marino, incluyendo a las comunidades bacterianas que conforman los bioflóculos, son consideradas no cultivables (Martínez-Porchas y Vargas-Albores, 2017). En el caso de algunos ecosistemas terrestres, existen reportes donde se describe que en un gramo de suelo se pueden encontrar alrededor de 3,000 genomas, de los cuales solamente el 1% puede ser aislado por técnicas dependientes de cultivo (Cadena-Zamudio *et al.*, 2016; Ghazanfar *et al.*, 2010). Por otra parte, hablando de la gran biodiversidad microbiana marina, un gran número de ella es desconocida, debido básicamente a la ausencia de medios y condiciones de cultivo en laboratorio, de hecho, se estima que la proporción de los microbios marinos conocidos no es mayor del 2% (Simon y Daniel, 2009).

En realidad, este grupo de bacterias alcanzan un estado de inactividad que les impide crecer en los medios de cultivos en el laboratorio, por ello, también son conocidas como bacterias viables no cultivables (VBNC, viable but nonculturable). No obstante, están vivas y tienen la capacidad de sobrevivir bajo condiciones desfavorables, además de realizar actividades metabólicas, siendo las responsables de mantener el equilibrio en los ecosistemas, pero también siendo capaces de causar algunas enfermedades (Ducret *et al.*, 2014; Tamagnini y Paraje, 2015). Así, a pesar de ser las encargadas de sostener la vida en nuestro planeta, aún falta mucho que entender sobre la riqueza metabólica del mundo microbiológico de los diferentes ecosistemas. Sin embargo, el interés en descubrir más especies bacterianas y su fisiología va en aumento ya que representan, además de conocimiento, un gran potencial para su aplicación benéfica en actividades agrícolas, biomédicos, entre otras (Morales-García *et al.*, 2010).

En este contexto, para reducir la limitante impuesta por la falta de técnicas de cultivo, se han explorado otras estrategias. Con el advenimiento de la secuenciación masiva, la amplificación del gen ribosomal 16S (Hernández-León *et al.*, 2010) ha resultado ser exitosa para determinar la composición de comunidades microbianas.

## 2.2. Plataformas de Secuenciación

El primer método de secuenciación fue propuesto por Sanger (Peña-Castro *et al.*, 2013), el cual se considera de primera generación. Es una técnica sencilla y precisa que se basa en la utilización de dideoxynucleótidos, los cuales carecen del grupo hidroxilo del carbono 3', por lo que cuando los nucleótidos se agregan a la cadena de ADN en crecimiento, la cadena no se puede continuar alargando (Peña-Castro *et al.*, 2013). Después, surge la secuenciación masiva o secuenciación de siguiente generación, la cual se caracteriza por la utilización de nucleótidos marcados con fluoróforos que bloquean inversamente el alargamiento de la cadena, de este modo, después de la incorporación del fluoróforo y la eliminación del mismo, es posible continuar con un nuevo ciclo de adición de un nuevo nucleótido, a lo que se le conoce como secuenciación por síntesis (Moya, 2017). Entre las tecnologías de secuenciación masiva más utilizadas se encuentran: 454 GSflex de Roche, Genome Analyzer o HiSeq de Illumina y SOLiD de Life Technologies. Illumina es la tecnología más utilizada actualmente, debido a que ofrece plataformas efectivas, capaces de obtener resultados confiables a precios razonables (Rodríguez-Santiago y Armengol, 2012).

La plataforma de Illumina en términos generales se basa en la incorporación de nucleótidos marcados con terminadores reversibles donde en cada ciclo de ligación se une el nucleótido complementario al ADN molde, generando una señal luminosa la cual es captada por un sistema óptico. La química que utiliza Illumina tiene la capacidad de generar lecturas de hasta 300 nucleótidos y llegar a producir hasta 6000 GB en datos y 25 millones de lecturas. Entre las principales características de la plataforma Illumina se encuentra su costo-efectividad, puesto que ofrece un elevado rendimiento y una baja tasa de error en los resultados (Monzó *et al.*, 2017).

Según el manual de Illumina (MiSeq<sup>®</sup> System), el proceso de secuenciación de las NGS se centra en cuatro pasos básicos, que son: a) Preparación de la librería, b) Generación de clúster, c)

Secuenciación y d) Análisis de los datos. El sistema de secuenciación de Illumina MiSeq, brinda la primera solución de secuenciación de extremo a extremo, donde integra la generación de clúster, amplificación, secuenciación y análisis de los datos generados en un solo instrumento.

### 2.3. Procesamiento Bioinformático

La secuenciación produce una gran cantidad de secuencias crudas o “rawseqs”, cuya calidad es analizada, las secuencias agrupadas y limpiadas. Adicionalmente, dependiendo de la profundidad que se desee alcanzar en el análisis de las secuencias, y con el uso de ciertas técnicas y herramientas bioinformáticas como Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2 (QIIME2) y Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved State 2 (PICRUSt2), es posible realizar tanto clasificaciones taxonómicas, como predicciones funcionales de las capacidades metabólicas de comunidades bacterianas de estudio (Green *et al.*, 2023b; Mougin *et al.*, 2023) (Wanna *et al.*, 2023). Debido a la naturaleza de los resultados, se requiere de cierta capacidad de cómputo para el análisis de los datos.

La herramienta QIIME2, es un paquete de software que fue desarrollado tanto para el análisis como para la visualización de datos de comunidades microbianas derivados de tecnologías de secuenciación del alto rendimiento. Entre las tareas relacionadas con la ecología microbiana que realiza esta herramienta, están; procesamiento de datos de secuenciación (datos crudos), clasificación taxonómica, análisis de diversidad y análisis estadístico (Bolyen *et al.*, 2018). Esta herramienta ha sido ampliamente utilizada en la investigación de ecología microbiana (Wei *et al.*, 2023; Peiro-Alcantar *et al.*, 2022; Roquigny *et al.*, 2021; Green *et al.*, 2023a; Wang *et al.*, 2022), lo que ha permitido obtener información relevante de diferentes entornos. No obstante, QIIME2 no es la única herramienta bioinformática para realizar clasificación taxonómica, análisis de diversidad, entre otros, ya que existen otras herramientas como SIAMCAT, DeepMicro, BiomMiner, Mothur, entre otros (Ghannam y Techtmann, 2021).

Como siguiente paso del procesamiento de las secuencias, se puede llevar a cabo una predicción de las capacidades funcionales de las comunidades microbianas por PICRSUt2. Esta herramienta se basa en el uso de la información filogenética de los genes 16s ARNr para inferir la relación de

genes funcionales presentes en una comunidad microbiana. Las inferencias metabólicas son hechas con el supuesto de que los genes funcionales están altamente conservados en las bacterias y pueden ser inferidos a partir de la estructura filogenética de dichas comunidades tomando un árbol filogenético de referencia (Douglas *et al.*, 2020).

Esta herramienta bioinformática es ampliamente utilizada en estudios de microbioma y ecología microbiana, sobre todo por las mejoras realizadas a PICRUSt2 respecto a su antecesor (An *et al.*, 2023; Green *et al.*, 2023b; Zhao *et al.*, 2022; Chunmei Zhang *et al.*, 2023; Zhao *et al.*, 2023). Aquí, el procesamiento de la información en términos generales inicia con una alineación de los ASV obtenidos de la secuenciación con un árbol filogenético de referencia, para posteriormente realizar las inferencias del genoma para cada ASV y calcular las abundancias de familias de genes. Como siguiente paso son realizadas las inferencias a nivel de ruta y, por último, son agregadas las descripciones a cada función predicha. Sin embargo, a pesar de las bondades de esta herramienta bioinformática para realizar predicciones funcionales, es importante tener en cuenta que estas predicciones hechas por PICRUSt2 están basadas en modelos estadísticos, y pueden tener limitaciones y estimaciones aproximadas al ancestro filogenéticamente más cercano, por lo cual no puede ser considerada una herramienta infalible (Douglas *et al.*, 2020).

### **3. HIPÓTESIS**

En los bioflóculos maduros se encuentran comunidades bacterianas con capacidad de transformar los compuestos nitrogenados, mejorando la calidad del agua y las condiciones ambientales de los organismos cultivados.

## **4. OBJETIVOS**

### 4.1. Objetivo General

Identificar en los bioflóculos maduros los perfiles taxonómicos y funcionales involucrados en la transformación de compuestos nitrogenados que mejoran la calidad del agua y la producción de los organismos cultivados.

### 4.2. Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto de los bioflóculos en el crecimiento del camarón.
2. Determinar la influencia de la comunidad microbiana del agua en la formación de bioflóculos.
3. Determinar la diversidad y dinámica bacteriana de bioflóculos maduro por secuenciación masiva del Gen 16s ARNr.
4. Establecer por inferencias las capacidades funcionales de las comunidades asociadas a bioflóculos a través de análisis metagenómicos y herramientas bioinformáticas.
5. Determinar la capacidad de los bioflóculos maduros para realizar la oxidación de amonio.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Bioensayo #1

#### 5.1.1. Colecta y Conservación del Consorcio Microbiano

Los bioflóculos maduros fueron colectados de un cultivo intensivo de camarón (*L. vannamei*). Primero, se permitió la sedimentación de los sólidos y el exceso de agua fue removido mediante decantación. La biomasa fue congelada a -80 °C para su liofilización. Finalmente, el liofilizado fue mantenido en refrigeración hasta su utilización.

#### 5.1.2. Reactivación del Consorcio Liofilizado y Generación del Inóculo

El inóculo inicial fue preparado al resuspender 2.5g del consorcio liofilizado en 180 ml de agua de mar adicionada con 2.5 g de sacarosa. El matraz con capacidad de 200 ml conteniendo la mezcla anterior fue mantenido con aireación constante a temperatura ambiente (28 °C) durante dos días. Sucesivamente, el contenido del matraz fue utilizado para inocular 5 L de agua de mar adicionada con 5 g de sacarosa y 2.5 g de nutrientes comerciales para la formación de bioflóculos (ECO-NUTRIMAX®). Para determinar la madurez del inóculo y poder utilizarlo en la siguiente fase fueron hechas mediciones de densidad óptica ( $DO_{600nm}$ ) cada 30 minutos, hasta que fue alcanzada una absorbancia de 3.0.

#### 5.1.3. Monitoreo Durante la Fase de Generación y Maduración del Bioflóculo

Del paso anterior se inocularon 0.5 L en tres unidades experimentales que contenían 50 L de agua

de mar, adicionada con 22.2 g de salvado de trigo y 27.7 g de sacarosa, unidades que fueron mantenidas con aireación constante y fue reducido el contacto con la luz solar con una malla sombra. La formación de los bioflóculos fue monitoreada semanalmente con mediciones de sólidos sedimentables, según Wei *et al.* (2016). Para ello, 1 L de agua con bioflóculos fue agregado en conos Imhoff y después de 30 minutos la medición fue tomada. Cuando fue necesario, salvado de trigo y sacarosa fueron agregados nuevamente para alcanzar un volumen de sólidos sedimentables de 8-10 ml/L.

#### **5.1.4. Diseño Experimental**

Previo al experimento, juveniles de *Litopenaeus vannamei* ( $1.5 \pm 0.10$  g) fueron obtenidos de una granja camaronícola local. La fase de aclimatación fue llevada a cabo durante 30 días en un contenedor de 2 m<sup>3</sup> a una densidad de 200 organismos/m<sup>3</sup> (35 ‰ de salinidad, temperatura  $27 \pm 2$  °C, iluminación 12 h luz 12 h oscuridad). Los organismos recibieron alimentación dos veces por día con una dieta comercial (Zeigler®; 25% de proteína bruta) con una proporción de alimento del 4% de la biomasa total. Una vez que el proceso de maduración de los bioflóculos finalizó, 20 organismos ( $2.0 \pm 0.10$  g) fueron agregados a cada unidad experimental (UE).

Fueron utilizadas nueve UE en tres tratamientos (tres réplicas por tratamiento) enumeradas del 1-9 para su identificación. Tres UE (1-3) se asignaron al tratamiento con biofloc, tres correspondieron al control con recambio de agua (4-6), y las tres últimas (7-9) al tratamiento control sin recambio de agua. Todas las unidades experimentales se mantuvieron con aireación constante utilizando un soplador (1HP) durante las 10 semanas del bioensayo y todos los organismos fueron alimentados con el mismo alimento comercial a una tasa del 4% diario de la biomasa total.

Los recambios de agua fueron realizados semanalmente para las unidades control con recambio (4-6), con ello fue minimizada la acumulación de compuestos nitrogenados. El sedimento, mudas y organismos muertos fueron retirado todos los días por sifoneo. En todas las unidades experimentales el nivel de agua evaporada fue repuesto semanalmente con agua de mar (35 ‰). La temperatura (°C), el oxígeno disuelto (DO mg/L) y la salinidad (UPS) se midieron dos veces al día (8:00 am y 4:00 pm) utilizando un equipo YSI ProDSS (17F105714). También, de forma



semanal la concentración de los compuestos nitrogenados en el agua fue determinada siguiendo la metodología de Hernández-López y Vargas-Albores (2003).

### **5.1.5. Biometría**

Cinco camarones elegidos al azar fueron medidos semanalmente de cada unidad experimental, el peso fue anotado y la cantidad de alimento fue recalculada en base al crecimiento promedio. El cálculo de la cantidad de alimento administrado diariamente fue hecho de la siguiente manera

$$\text{Alimento por día} = \text{Camarones en cada UE} \times \text{Peso promedio} \times 0.04$$

El alimento fue proporcionado en dos raciones al día (8:00 am y 4:00 pm).

### **5.1.6. Análisis estadístico.**

Fue realizado un ANOVA de una vía para los parámetros de biomasa total, amoníaco y concentración de nitritos. Cuando se presentaron diferencias significativas se aplicó la prueba de Tukey-Kramer para la comparación de medias ( $p < 0,05$ ). Todo con el paquete estadístico NCSS 2007.

## **5.2. Bioensayo #2**

### **5.2.1. Generación y Maduración del Bioflóculo**

5.2.1.1 Colecta y conservación del consorcio microbiano. Los bioflóculos maduros fueron colectados de un cultivo intensivo de camarón (*L. vannamei*). Primero, se permitió la

sedimentación de los sólidos y el exceso de agua fue removido mediante decantación. La biomasa fue congelada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su liofilización. El liofilizado fue mantenido en refrigeración hasta su utilización.

5.2.1.1 Reactivación del consorcio liofilizado. Un gramo del consorcio liofilizado fue reactivado en 200 ml de agua de mar, adicionada con azúcar comercial y nitrato de amonio, manteniendo una relación C:N de 20:1. El cultivo fue incubado durante 18 h a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , manteniendo agitación constante a 150 rpm en un equipo Shaker mini (Benchmark, New Jersey, USA). Después de la incubación, se permitió la sedimentación de los sólidos mediante reposo durante dos horas, antes de recuperar 150 ml del sobrenadante y utilizarlos como inóculo inicial para la siguiente fase. Adicionalmente, 1 ml del sobrenadante fue utilizado para cuantificar las UFC (Unidades Formadoras de Colona) en placas de agar marino 2216 (Bacto<sup>®</sup>), preparado siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo A).

5.2.1.3 Generación de inóculos iniciales. Para observar la influencia de la microbiota nativa del agua de mar en la formación del inóculo la carga microbiana fue reducida de dos formas diferentes. En la primera, el agua de mar fue esterilizada (AME) en autoclave a  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos; en la segunda, el agua de mar fue clorada (AMCl), agregando  $162\text{ mg/L}^{-1}$  de hipoclorito de sodio, dejando reposar por 12 horas antes de ser neutralizado con  $159\text{ mg/L}^{-1}$  de tiosulfato de sodio. El agua de mar sin tratar (AMC) fue utilizada como control. En todos los casos, la relación C:N de 20:1 fue mantenida. Los inóculos iniciales, para los dos tratamientos y el control, fueron preparados en tres matraces de 250 ml con 60 ml del agua correspondiente y cada uno fue inoculado con 500  $\mu\text{l}$  del consorcio reactivado. Cada matraz fue incubado a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , con agitación constante de 150 rpm. Después de la inoculación, las UFC fueron determinadas en placas de agar marino 2216 (Bacto<sup>®</sup>).

5.2.1.4 Generación y maduración del bioflóculo. Para este paso, se utilizaron tres unidades experimentales de 20 L, por tratamiento, conteniendo 15 L del agua de mar correspondiente: AME,

AMCl, AMC. Cada una de las nueve unidades experimentales recibió 50 ml del inóculo preparado con agua de mar tratada en forma similar. Además, la generación de los bioflóculos fue estimulada al agregar a cada unidad experimental, 1.3 g/L de salvado de trigo, como un nucleador o matriz (Martínez-Córdova *et al.*, 2018b). Adicionalmente, como fuente de carbono y nitrógeno, se agregó azúcar comercial sin refinar y fertilizante triple 17<sup>®</sup> (Nitrógeno 17%, Fósforo 17% y Potasio 17%) respectivamente, en una relación C:N de 20:1, siguiendo las recomendaciones de Emerenciano *et al.* (2011) y Panigrahi *et al.* (2018).

El proceso de maduración de los bioflóculos fue monitoreado semanalmente mediante determinación de parámetros de calidad del agua (temperatura, pH, oxígeno disuelto y salinidad) utilizando una sonda multiparamétrica YSI ProDSS (17F105714). También, una vez por semana las concentraciones de los compuestos nitrogenados en el agua fueron determinadas siguiendo la metodología de Hernández-López y Vargas-Albores (2003), mientras que los sólidos suspendidos (SS) fueron medidos con conos de sedimentación (Imhoff) de un litro después de 10 minutos de sedimentación. Cuando los niveles de SS fueron <10 ml/L, se les agregó salvado de trigo, azúcar, y fertilizante, en las mismas cantidades anteriormente mencionadas.

### **5.2.2. Oxidación de Amonio**

Para demostrar la capacidad de los bioflóculos en la reducción de amonio se utilizaron bioflóculos preparados como se indicó con anterioridad, en unidades con 15 L de agua de mar sin tratamiento (AMC). Cuando los parámetros indicaron que los bioflóculos habían madurado (7-8 semanas), 30 mg de cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl) fueron agregados, para alcanzar una concentración equivalente a 0.67 mg de NH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>. El efecto de los bioflóculos fue monitoreado a través de mediciones cada cuatro horas de la concentración de amonio. Después de 24 h, una nueva dosis de NH<sub>4</sub>Cl fue agregada y la concentración del NAT fue determinada nuevamente. Tres UE sin bioflóculos, usadas como control, fueron manejadas y analizadas de la misma manera (Anexo B).

### 5.2.3. Análisis Metagenómico

Para el análisis metagenómico se tomaron las siguientes muestras: a) 250 mg del inóculo inicial en forma de liofilizado; b) 15 ml de sólidos sedimentables de cada uno de los tratamientos (bioflóculos maduros) mediante sedimentación en conos Imhoff y c) en la fase de oxidación de amonio se tomaron los SS a las 0, 24 y 48 horas. Todas las muestras fueron almacenadas a -20 °C para posteriormente realizar la extracción de ADN.

La extracción de ADN se realizó por homogeneización de 250 mg de cada muestra, en un equipo FastPrep-24™ 5G (MP Biomedicals™, Santa Ana, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Dicho procedimiento fue complementado usando el kit comercial DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit (QIAGEN) y siguiendo las instrucciones correspondientes.

La concentración de ADN recuperado fue determinada utilizando un fluorómetro Qubit 3.0 (thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La solución de trabajo fue preparada previamente, siguiendo las instrucciones del reactivo; cada muestra fue mezclada con la solución de trabajo a una relación 1:100 e incubada dos minutos en completa oscuridad. Las muestras de ADN fueron purificadas con el kit comercial Spin Column Wash Tube. Posteriormente, todas las muestras fueron diluidas 1:40, y nuevamente purificadas siguiendo las instrucciones del kit comercial GeneClean II<sup>MR</sup>. La concentración de ADN fue determinada y las muestras fueron almacenadas a -80 °C, hasta su utilización.

### 5.2.4. Construcción de Genotecas

La genoteca del gen ARN16s fue construida con los productos de la amplificación de la región hipervariable V4 del gen 16s rRNA, usando los cebadores propuestos por Apprill *et al.* (2015) y Parada *et al.* (2016):

**16S 515 forward 5':**

GTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA

**16S 806 reverse 5':**

CCGGACTACNVGGGTWTCTAAT

La PCR fue realizada siguiendo el protocolo Taq KAPA PCR kit (Sigma-Aldrich), con el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización (94°C / 3 min), 25 ciclos de amplificación 94°C / 45 s; 51°C / 60 s; 72 °C / 90 s y un ciclo final de extensión a 72 °C / 10 min. Los productos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizaron bajo luz ultravioleta.

5.2.4.1 Purificación de amplicones. Los amplicones, productos de PCR, fueron purificados usando las perlas magnéticas AMPure XP (Bechman Coulter, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada producto de PCR se mezcló con 10 µl de las perlas (AMPure) usando una micropipeta. Después de permitir la sedimentación en una placa magnética durante dos minutos, el sobrenadante fue descartado. Sin retirar de la placa magnética, las perlas se lavaron con 200 µl de etanol al 80% y el sobrenadante fue descartado después de 30 segundos. El etanol residual fue evaporado a temperatura ambiente durante 10 minutos. Los tubos fueron retirados de la placa magnética y las perlas fueron resuspendidas agregando 52.5 µl de TRIS 10 mM (pH 8.5). Después de dos minutos de incubación a temperatura ambiente, las muestras fueron colocadas nuevamente en la placa magnética por dos minutos. Los amplicones se recuperaron del sobrenadante clarificado y fueron transferidos (50 µl) a un tubo nuevo. La pureza de las muestras fue determinada por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Cuando fue necesario, se realizó un segundo paso de limpieza de los amplicones de PCR utilizando el kit comercial PureLink™ Quick PCR Purification KIT (Invitrogen), siguiendo las instrucciones correspondientes.

5.2.4.2 Indexado de las muestras. El indexado de las muestras/genoteca fue llevado a cabo siguiendo las instrucciones del protocolo de Illumina “16S Metagenomic Sequencing Library Preparation”. Cada genoteca fue identificada al agregar una combinación específica de índices, los cuales cuentan con una secuencia conocida de nucleótidos, mismos que pueden ser identificados posterior a la secuenciación. La combinación correcta y única de los índices (5 µl) con cada muestra (5 µl) se facilitó por el uso de una placa de fijación de índices TruSeq (Illumina). La PCR de indexado fue realizada con un ciclo de desnaturalización (94°C / 3 min), 25 ciclos de amplificación 94°C / 45 s; 51°C / 60 s; 72 °C / 90 s y un ciclo final de extensión a 72 °C / 10 min.

Las muestras indexadas en el paso anterior fueron centrifugadas a 280 xg/20 °C/1 minuto. Posteriormente, 56 µl del reactivo de perlas magnéticas AMPure XP fueron agregados a cada

muestra, dejando la incubación a temperatura ambiente por cinco minutos. Después, las muestras fueron colocadas dos minutos en una placa magnética para facilitar la sedimentación. El sobrenadante fue descartado, y las perlas se lavaron agregando 200  $\mu$ l de etanol al 80%; después de 30 segundos el sobrenadante fue descartado nuevamente y el lavado con etanol fue repetido. Después del segundo lavado con etanol, se permitió la evaporación del etanol residual a temperatura ambiente, durante 10 minutos. Las muestras fueron removidas de la placa magnética y a cada una se le agregaron 27.5  $\mu$ l de TRIS 10 mM (pH 8.5) y después de dos minutos, las muestras fueron colocadas en la placa magnética hasta que el sobrenadante clarificó. Finalmente, 25  $\mu$ l del sobrenadante de cada muestra fueron transferidos a tubos nuevos.

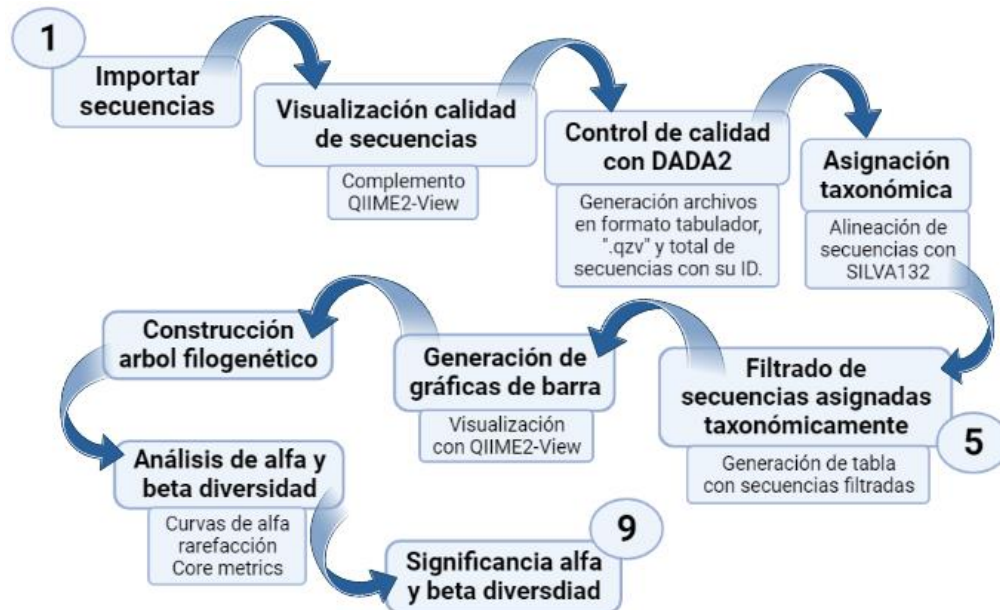
5.2.4.3 Preparación del pool para secuenciar. La concentración de ADN de las muestras fue determinada mediante electroforesis capilar y, posteriormente, se ajustó a 4 nM con la adición de Tris 10 mM (pH 8.5). Se preparó el pool para secuenciación tomando 5  $\mu$ l de cada muestra etiquetada. El pool fue desnaturalizado al combinar 5  $\mu$ l del pool con 5  $\mu$ l de NaOH 0.2N. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, fueron agregados 990  $\mu$ l del buffer de hibridación (HT1). De igual manera, la genoteca control Phix fue desnaturalizada con NaOH 0.2N. Ambas bibliotecas fueron ajustadas a 4 pM y 570  $\mu$ l de la genoteca con las muestras indexadas fueron mezcladas con 30  $\mu$ l de la genoteca control Phix. Posteriormente, la mezcla fue calentada a 96 °C, por dos minutos, e inmediatamente después fue puesta en incubación en hielo por cinco minutos. Finalmente, las muestras fueron cargadas en un cartucho de Illumina MiSeq, y la secuenciación se realizó utilizando las condiciones estándares para 500 ciclos, (2 x 250) (Anexo C).

Las secuencias sin procesar procedentes de la secuenciación fueron depositadas en la base de datos de NCBI con el número de acceso PRJNA984733.

### **5.2.5. Descripción Taxonómica**

El análisis bioinformático fue realizado siguiendo el diagrama de trabajo general del programa QIIME2, que se muestra en la Figura 2 (Bolyen *et al.*, 2018). La información descriptiva de las

secuencias, así como los nombres de las muestras y los tratamientos que fueron utilizados como variables de respuesta, fueron organizados y almacenados en un archivo metadata validado por Keemei (<https://keemei.qiime2.org/>). Las secuencias crudas fueron importadas a QIIME2 y separadas en archivos independientes (demultiplexadas) para poder observar su calidad. Estos archivos en formato “.qzv” fueron visualizados en <http://view.qiime2.org/>.



**Figura 2.** Diagrama general de trabajo del programa QIIME2.

En el siguiente paso fue realizado un control de calidad de las secuencias utilizando DADA 2 (Callahan *et al.*, 2016), con la finalidad de seleccionar la mayor cantidad de secuencias con un valor de calidad Phred (Q)  $\geq 30$ . Para el filtrado de todas las muestras, los cortes en las secuencias fueron hechos de 2 pb en los extremos 5´-3´, y 80 pb en el caso del extremo 3´-5´, para obtener una longitud mínima de 170 pb, lo cual garantizó una calidad de secuencias de Q30. Con las secuencias resultantes, fue realizada una primera exploración de la composición taxonómica de las muestras, por lo que fue utilizada una base de datos de referencia (SILVA 132 para 16S) para el alineamiento de las secuencias previamente filtradas. Después de dicha clasificación taxonómica, fue realizado un filtrado para eliminar aquellas secuencias que no lograron ser asignadas, así como aquellas secuencias menos representadas (frecuencia mínima), para obtener finalmente las secuencias más

representativas. Posteriormente, con los archivos de las secuencias más representativas fue posible llevar a cabo una exploración de la asignación taxonómica mediante graficas de barra o barplot. Después de que los barplots fueron obtenidos, el siguiente paso fue la generación de un árbol filogenético para el análisis de diversidad con el comando “qiime phylogeny align to-tree-mafft-fasttree \”. Posteriormente, los análisis de diversidad fueron realizados a través de dos enfoques, alfa y beta diversidad. En el caso de alfa diversidad, la curva de alfa-rarefacción fue hecha con el comando “qiime diversity alpha-rarefaction \”. También, fueron generados los índices: Chao1, Simpson, Shannon y Faith. Por otro lado, con el comando “qiime diversity core-metrics-phylogenetic \” fueron generados los análisis de coordenadas principales (PCoA) de beta diversidad para las matrices de distancias que fueron obtenidas a partir de los índices de disimilitud de Bray-Curtis, Jaccard y Unifrac (ponderado y no ponderado) (Lozupone y Knight, 2005).

Una vez que las métricas de alfa y beta diversidad fueron obtenidas en el paso anterior, lo siguiente fue conocer la significancia de alfa y beta diversidad, es decir, determinar si existen diferencias entre las comunidades bacterianas provenientes de distintas muestras. Para ello, lo primero fue determinar la significancia de alfa diversidad con el comando “qiime diversity alpha-group-significance \”. Posteriormente, la significancia de beta diversidad fue obtenida con el comando “qiime diversity beta-group-significance \”, donde a la par, fue realizado un análisis estadístico PERMANOVA para comprobar si existieron diferencias entre las muestras de diferentes grupos. Los índices de alfa diversidad en cuanto a la composición de las comunidades tanto de los bioflóculos maduros como durante la oxidación de amonio, fueron calculados utilizando QIIME2. Las comparaciones por pares de los valores de los índices de Chao1, Shannon, Simpson y Faith fueron realizados mediante ANOVA de una vía ( $p= 0.05$ ). Mientras que los índices de beta diversidad para las mismas fases fueron hechas mediante la matriz de disimilitud basada en Bray-Curtis y la matriz de distancia filogenética Unifrac (Ponderado y no ponderado).

### **5.2.6. Predicción Funcional**

La predicción de los perfiles funcionales se realizó por el programa PICRUSt2 (Douglas *et al.*, 2020), utilizando la base de datos de Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes, (KEGG) de



ortólogos y clasificación de enzimas. Los archivos provenientes de QIIME2, fueron exportados hacia PICRUST2, aprovechando la compatibilidad entre ambos programas. Los ASV (Amplicon Variant Sequence) fueron insertados en un árbol filogenético de referencia, el cual está basado en 20,000 secuencias del gen 16S ARNr depositadas en la base de datos Integrated Microbial Genomes. Posteriormente, fueron realizadas las predicciones del estado oculto de familias de genes, donde se realizaron las inferencias de los valores de rasgos probables para linajes desconocidos en un árbol filogenético. Siguiendo con el proceso, se realizaron las predicciones del metagenoma buscando las familias de genes previstas ponderadas por la abundancia relativa de ASV en la comunidad antes de establecer las inferencias a nivel de ruta. La inferencia se basó en las predicciones de ontología usando MetaCyc, base de datos que contiene vías implicadas en el metabolismo primario y secundario. Además, para hacer predicciones más estrictas, las inferencias de ruta fueron hechas en base a MinPath (Minimal set of pathways) (Douglas *et al.*, 2020). Finalmente, se agregaron las descripciones de cada “id” funcional en las tablas de salida de abundancia. De esta forma, fue posible relacionar las rutas metabólicas con cada muestra. Los resultados de las predicciones funcionales fueron visualizados a través de STAMP (statistical analysis of metagenomic profiles), así como la selección de las funciones relacionadas al metabolismo del nitrógeno.

### **5.2.7. Análisis Estadístico**

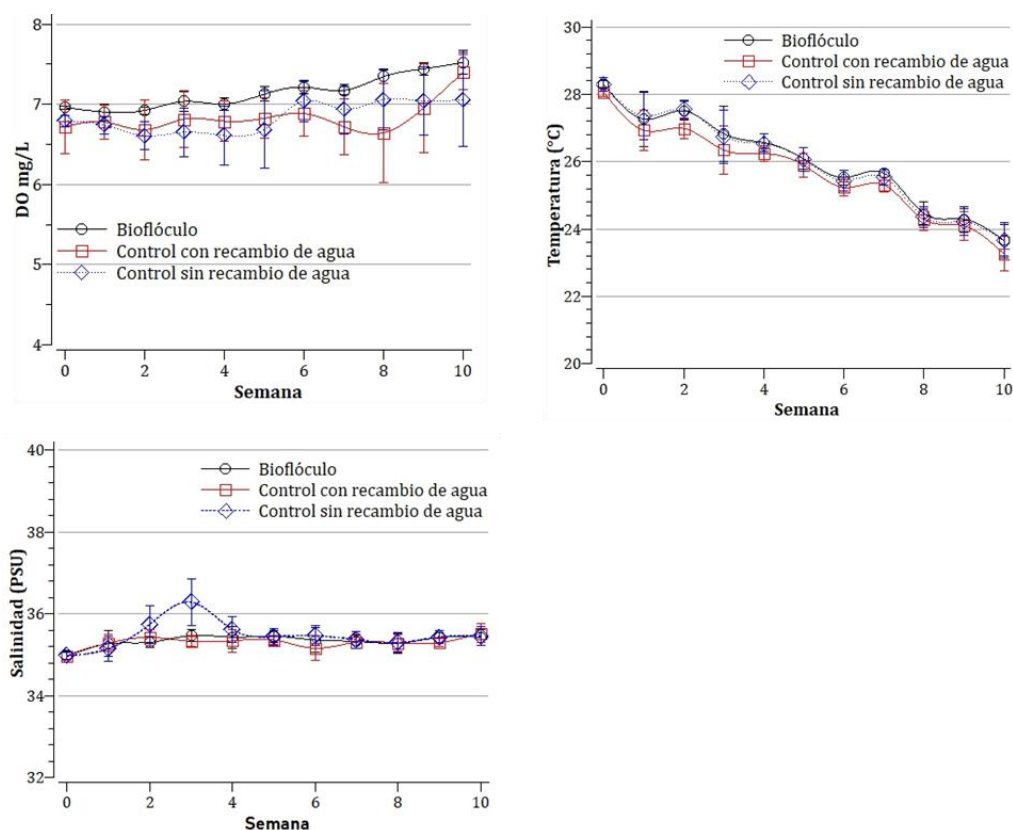
Se utilizó un análisis de varianza ANOVA de medidas repetidas con apoyo del software NCSS versión 2022 para los datos obtenidos de las fases de maduración del biofloc y oxidación del TAN. La variable respuesta del estudio fue la concentración de amonio y nitrito, mientras que los factores fueron el tratamiento y el tiempo. En caso de diferencias significativas, se aplicó la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0,05$ ).

Se evaluó una comparación por pares para establecer las diferencias entre los grupos analizados de las comunidades microbianas del biofloc. Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para los índices de diversidad alfa. Por otro lado, se realizó el análisis multivariante permutacional de la varianza (PERMANOVA) para la comparación de las matrices de distancia de diversidad beta dentro de

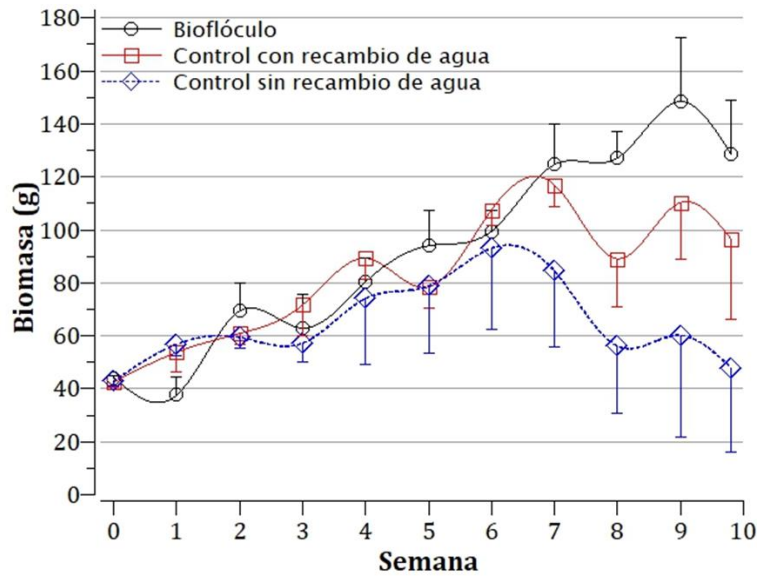
QIIME2 para establecer el grado de separación entre los grupos de muestras analizados. La significación estadística se evaluó mediante 4.999 permutaciones aleatorias ( $p < 0,05$ ) en la matriz de distancia/disimilitud.

## 6. RESULTADOS

La Figura 3, muestra la tendencia de los parámetros de calidad del agua en el bioensayo 1. Durante las primeras siete semanas, el oxígeno disuelto (DO mg/L) se mantuvo en un rango de 6,5 a 7 mg/L. En la octava semana, los niveles aumentaron a 7,52 mg/L en el tratamiento con biofloc; sin embargo, también se observaron incrementos en los controles con y sin recambios de agua (7,40 y 7,05 mg/L, respectivamente). La temperatura disminuyó con el progreso del bioensayo, comenzando a 28,0 °C y terminando a 23,3 °C. Los niveles de salinidad se mantuvieron en un rango de 35-36 UPS en todas las unidades experimentales durante las diez semanas del bioensayo. La biomasa total de camarón se determinó cada semana, comenzando con 43 g en el tiempo cero. Tras 10 semanas de bioensayo, la biomasa total en el tratamiento con bioflóculos fue de 128 g, mientras que en los controles con y sin recambio de agua fue de 97 y 59 g, respectivamente. (Figura 4).

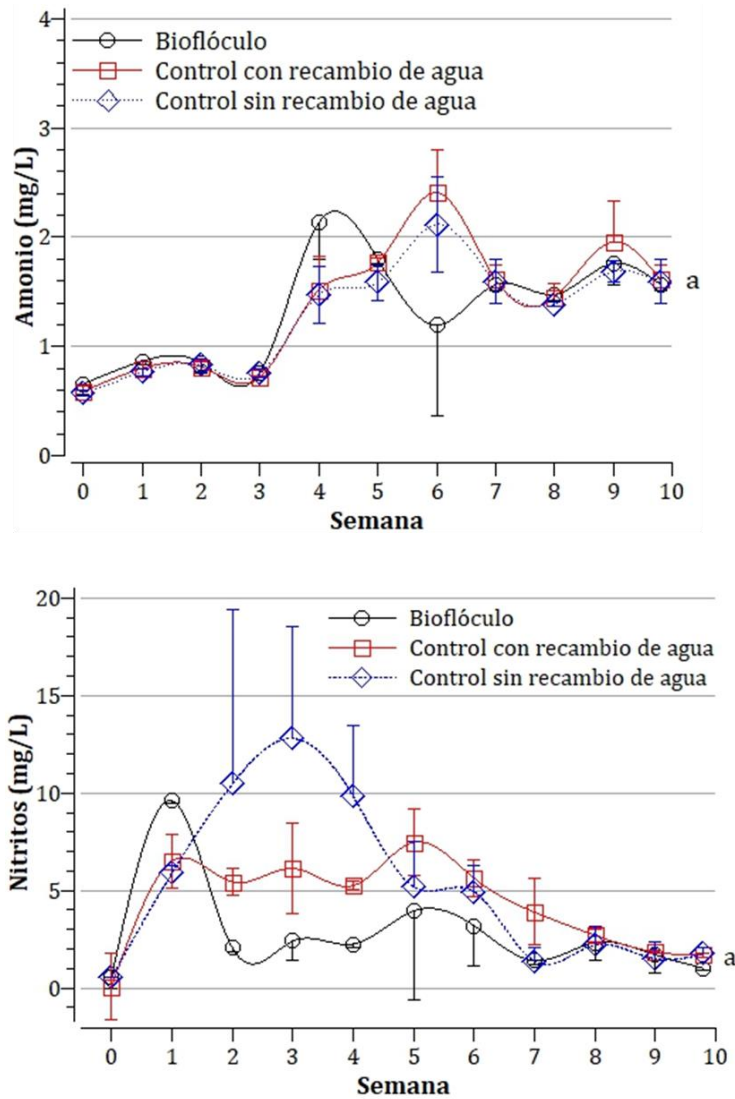


**Figura 3.** Parámetros de calidad del agua durante el cultivo de camarón blanco (*L. vannamei*) en todos los tratamientos por diez semanas.

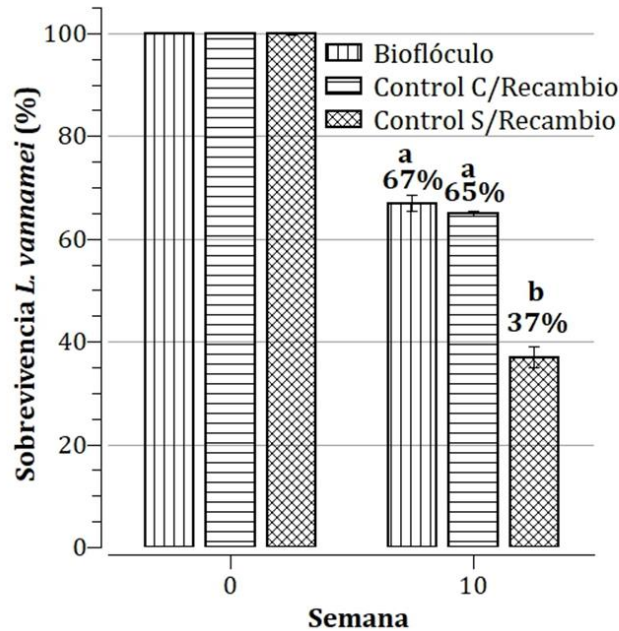


**Figura 4.** Biomasa generada durante las diez semanas del bioensayo con cultivo de camarón blanco (*L. vannamei*).

En el transcurso del bioensayo, la concentración del nitrógeno amoniacal total aumentó de forma similar en el tratamiento con bioflóculos y en los controles, pasando de 0,71 a 1,60 mg/L (Figura 5). Paralelamente, la concentración de nitrito aumentó de 0,54 a 1,74 mg/L al final del bioensayo, sin diferencias significativas entre tratamientos, como se muestra en la Figura 5. Por último, la sobrevivencia de los organismos en los tratamientos con bioflóculos y control con recambio de agua fue del 67 y 65 %, respectivamente, mientras que la sobrevivencia del tratamiento control sin recambio de agua fue del 37% (Figura 6).



**Figura 5.** Concentración de compuestos nitrogenados en el cultivo de camarón blanco (*L. vannamei*) durante las diez semanas del bioensayo.



**Figura 6.** Supervivencia de *L. vannamei* en los tratamientos de bioflóculos, control con recambio de agua y control sin recambio de agua durante las diez semanas del bioensayo.

El bioensayo #2 fue realizado sin camarones, en este caso, el manejo de los bioflóculos fue diferente respecto al bioensayo #1, principalmente por los cuidados y parámetros que fueron evaluados, pero también, por la incorporación de los análisis metagenómicos y la comprobación bioquímica de la eficiencia de los bioflóculos *per se*.

## 6.1. Consorcio Inicial

### 6.1.1. Reactivación y Preparación del Inóculo Inicial

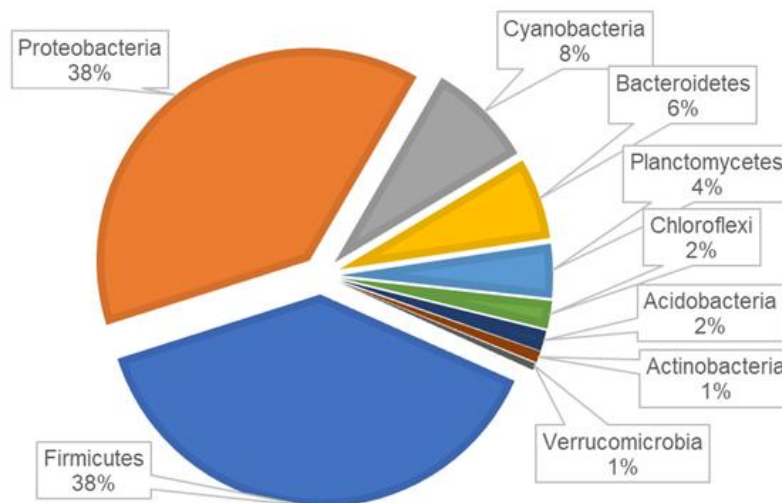
En el bioensayo #2, el consorcio microbiano liofilizado fue reactivado por incubación en agua de mar a 30°C por 24 h. Desde el inicio se observó material insoluble, por lo que, al concluir la incubación fue necesario separar el material insoluble del sobrenadante conteniendo las bacterias reactivadas. La activación del consorcio microbiano fue confirmada al encontrar  $2.6 \times 10^6$  UFC/ml,

por conteo en placas de agar marino. Después de 24 horas de incubación, el crecimiento bacteriano fue evaluado por conteo en placas de agar marino. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, indicando que la carga bacteriana no influye de forma importante. Las UFC de los tratamientos fueron  $5.94 \pm 5.64 \times 10^5$ ,  $1.01 \pm 1.29 \times 10^5$  y  $4.50 \pm 4.82 \times 10^4$  UFC/ml para el cultivo en AME, AMCI y AMC, respectivamente.

### **6.1.2. Composición Taxonómica del Consorcio Inicial**

La extracción del ADN fue abundante en el consorcio inicial reactivado, pero de baja calidad. Después de un proceso de limpieza usando los kits de Spin Colum Wash y GeneClean II se obtuvieron la cantidad y calidad suficiente para la secuenciación. En todo el proceso para la preparación de las muestras para secuenciación se siguieron los protocolos y recomendaciones de Illumina.

Las lecturas obtenidas fueron importadas a QIIME2 y separadas por etiquetas (demultiplexado) para su procesamiento. La calidad de las lecturas fue determinada usando DADA2, programa asociado a QIIME2, de donde se recuperaron y conservaron para los análisis posteriores. Como resultado del análisis taxonómico, en el consorcio microbiano inicial se detectaron nueve filos bacterianos, como se muestra en la Figura 7: Proteobacteria (38.4%) y Firmicutes (38.2%) fueron los filos más abundantes, seguidos por Cyanobacteria (8.1%) y Bacteroidetes (6.2%). Estos cuatro filos significan casi el 91%, dejando el resto para cinco filos menos representados (Planctomycetes, Chloroflexi, Acidobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia). Al analizar a nivel de familia se encontraron 25 taxones, de los cuales dos no alcanzaron el nivel correspondiente, como se observa en el Cuadro 1. La familia Bacillaceae (filo Firmicutes) es, con mucho (28.1%), la más abundante. Las siguientes familias más frecuentes, son miembros del filo Proteobacteria: Rhodobacteraceae (5.92%), Aeromonadaceae (5.76%) y Enterobacteriaceae (5.33%). También, se encontraron con frecuencia Cianobacterias, englobadas bajo la clasificación taxonómica de orden 'Cloroplastos'.



**Figura 7.** Composición taxonómica del consorcio inicial a nivel de filo.

**Cuadro 1.** Porcentaje promedio de las familias presentes en el consorcio, originalmente liofilizado, que ha sido activado y se usó como inóculo inicial.

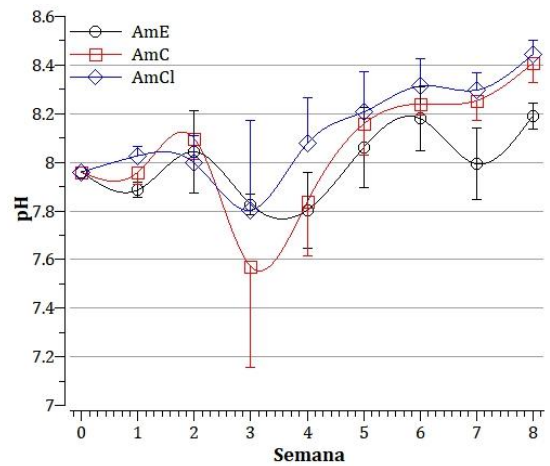
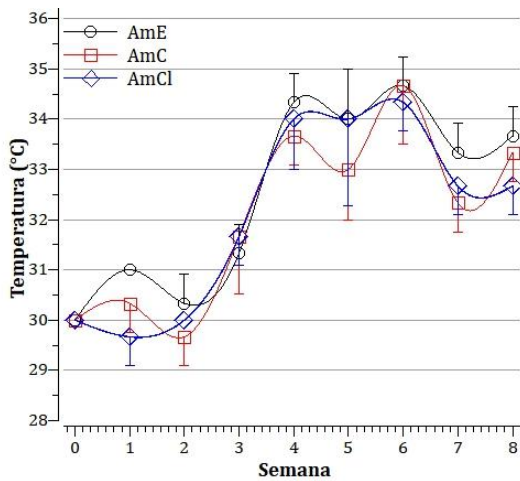
Filo	Clase	Orden	Familia	(%)	
Acidobacteria	Acidobacteriia	Solibacterales	Solibacteraceae (Subgroup 3)	0.27	
	Subgroup 6	_o	_f	1.25	
Actinobacteria	Actinobacteria	Propionibacterales	Nocardioideaceae	0.86	
Bacteroidetes	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	2.94	
			Saprosiraceae	3.25	
Chloroflexi	Chloroflexia	Thermomicrobiales	JG30-KF-CM45	2.08	
Cyanobacteria	Oxyphotobacteria	Chloroplast	_f	7.25	
		Nostocales	Oscillatoriaceae	0.82	
		Bacillales	Bacillaceae	28.13	
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	4.08	
		Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	3.25
		Negativicutes	Selenomonadales	Veillonellaceae	2.98
Planctomycetes	Planctomycetacia	Pirellulales	Pirellulaceae	4.04	
		Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	5.92	
	Alphaproteobacteria	Rickettsiales	Mitochondria	0.67	
		Deltaproteobacteria	Oligoflexales	0319-6G20	0.78
	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	5.76
			Betaproteobacterales	Burkholderiaceae	4.35
			Enterobacterales	Enterobacteriaceae	5.33
			Pasteurellales	Pasteurellaceae	3.96
			Pseudomonadales	Moraxellaceae	1.72
			Vibrionales	Pseudomonadaceae	3.29
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Vibrionales	Vibrionaceae	4.27	
		Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	2.23	
		Pedosphaerales	Pedosphaeraceae	0.51	

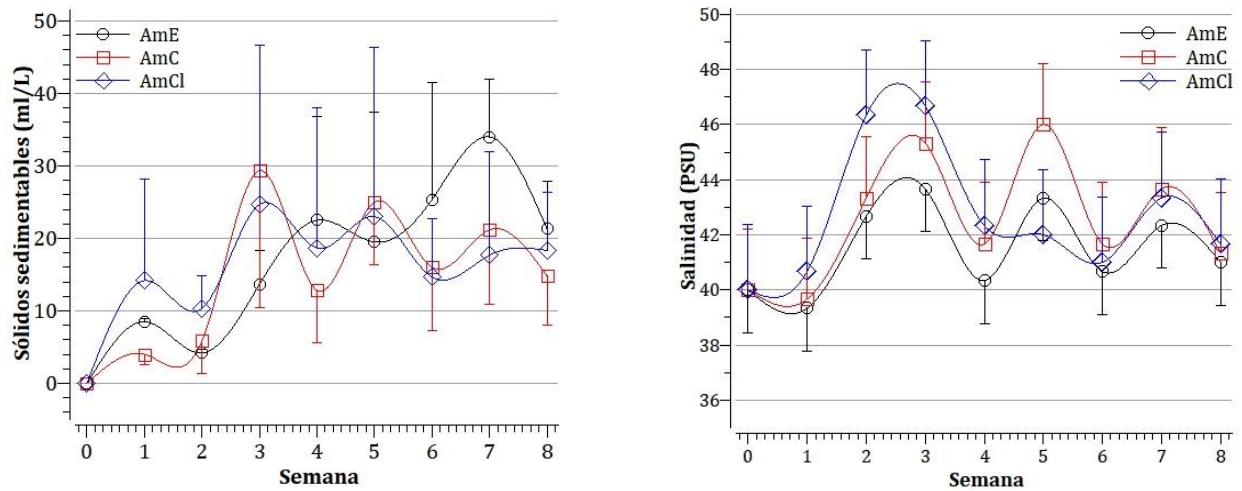


## 6.2. Maduración del Bioflóculo

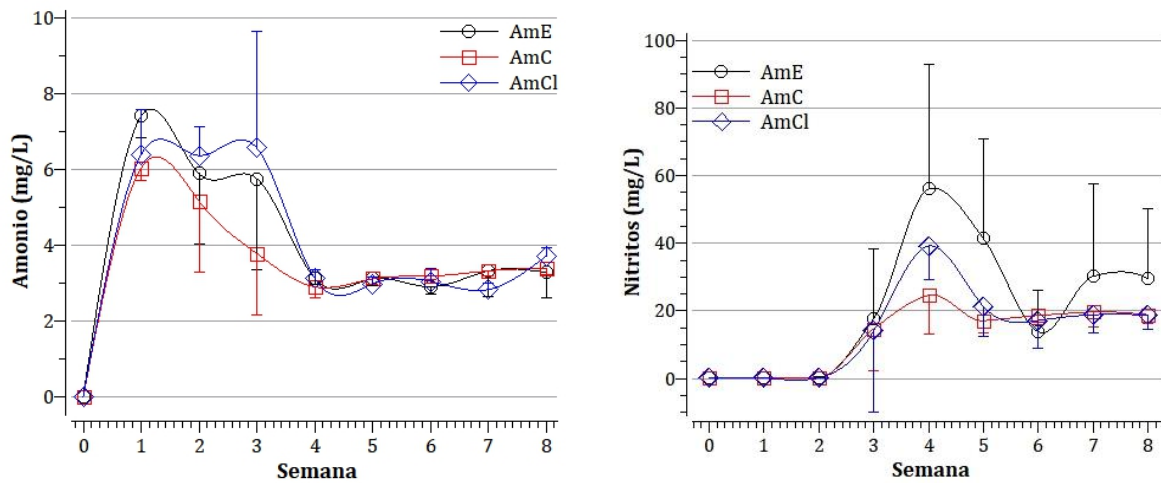
### 6.2.1. Generación y Maduración del Bioflóculo

Durante el proceso de generación de los bioflóculos los parámetros ambientales fueron mantenidos en rangos apropiados (temperatura 30-34°C, pH 7.4-8.4, oxígeno disuelto 5.5 – 6.6 mg/L, y salinidad 40-46 UPS). Los bioflóculos comenzaron a generarse desde la primera semana, con un incremento en la cantidad de sólidos sedimentables de cero a  $8.5 \pm 0.5$ ,  $14 \pm 13.9$ , y  $4 \pm 1.5$  ml/L para el agua de mar esterilizada, el agua de mar clorinada y el control, respectivamente. Para la semana ocho, estos valores se incrementaron hasta  $21.3 \pm 6.5$ ,  $14.8 \pm 6.8$ , y  $18.3 \pm 8$  ml/L para los mismos tratamientos (Figura 8). Finalmente, la concentración de NAT ( $\text{NH}_4/\text{NH}_3$ ) y nitritos ( $\text{NO}_2$ ) indicaron que, desde la semana seis, el proceso de nitrificación había logrado establecerse en el sistema y fue estable, durante un par de semanas más (Figura 9).





**Figura 8.** Parámetros de calidad del agua durante las ocho semanas del bioensayo #2 en todos los tratamientos.



**Figura 9.** Concentración de compuestos nitrogenados durante las ocho semanas del bioensayo #2.

Los valores del nitrógeno amoniacal total se incrementaron rápidamente en la primera semana y se mantuvieron en esos niveles hasta la tercera semana, después descendieron desde la cuarta semana y se mantuvieron hasta la octava semana. El aumento de nitritos comenzó en la tercera semana alcanzando el máximo a la cuarta semana; a partir de ahí descendieron y se mantuvieron alrededor de 20 mg/l desde la sexta semana. Los sólidos sedimentables se incrementaron desde la primera

semana y, después de la tercera semana, su concentración fue regulada con el manejo de las proporciones C:N, siguiendo las recomendaciones de Emerenciano *et al.* (2017) y mediante los cálculos indicados en materiales y métodos. La coloración de los bioflóculos también es un indicador de su madurez; a la sexta semana se observaron tonalidades color café en el agua en todas las unidades experimentales. Por ello, se consideró que los bioflóculos alcanzaron su madurez en la sexta semana y se mantuvo estable, hasta que terminó el ensayo, es decir, durante dos semanas más.

6.2.1.1 Clasificación taxonómica de los bioflóculos maduros. A la octava semana, se tomaron las muestras de los bioflóculos maduros para determinar la composición taxonómica. La extracción del ADN fue abundante, pero de baja calidad y su amplificación por PCR no fue posible. Sin embargo, después de un proceso de limpieza usando los kits de Spin Colum Wash y GeneClean II se obtuvieron  $22.1 \pm 8.8$  ng/ $\mu$ l de ADN (8.16-32.3 ng/ $\mu$ l) con la calidad suficiente para conseguir la amplificación e iniciar el proceso de secuenciación. En todo momento se siguieron los protocolos y recomendaciones de Illumina.

Del procedimiento de secuenciación se obtuvieron 424,521 lecturas, las cuales fueron importadas a QIIME2, donde fueron separadas por etiquetas (demultiplexado) para su procesamiento. Después, la calidad de las lecturas fue determinada usando DADA2, programa asociado a QIIME2, de donde se recuperaron y conservaron 58,303 lecturas para los análisis posteriores.

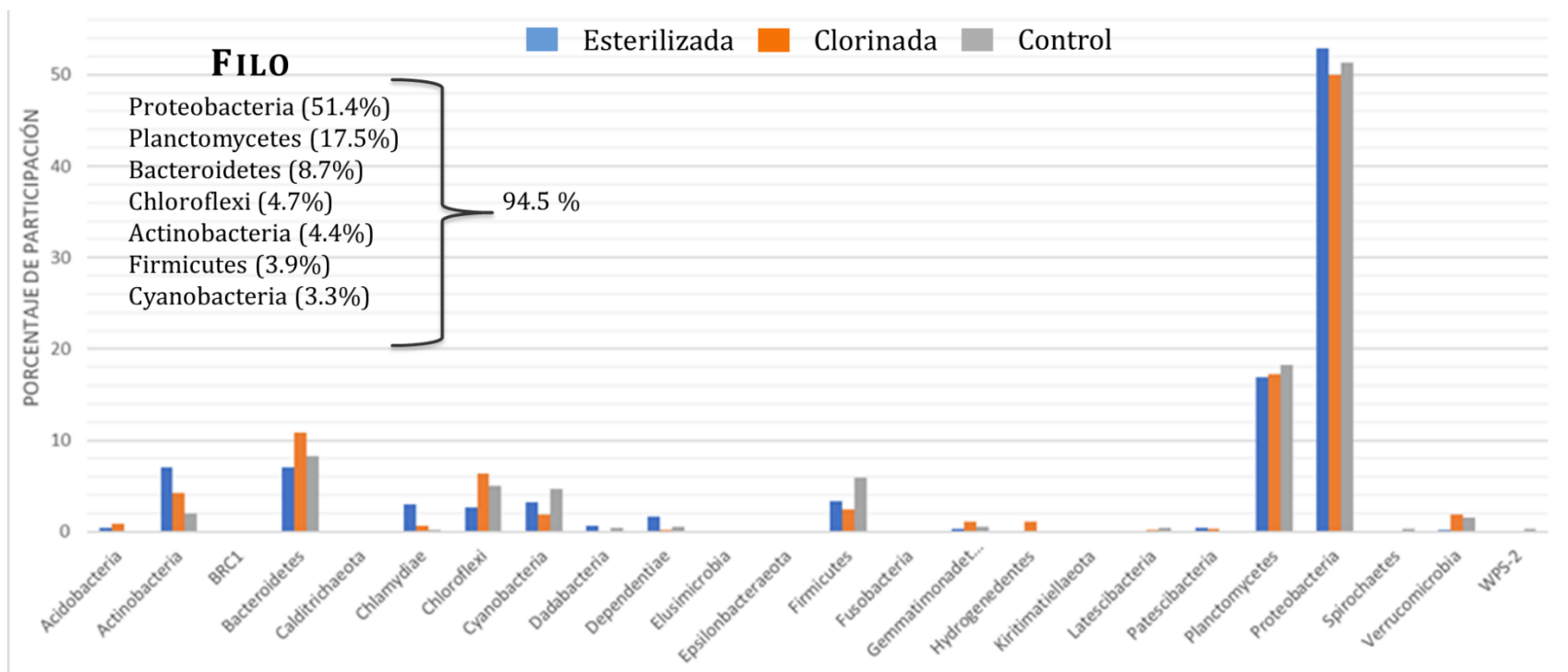
Como resultado del análisis taxonómico, en las muestras de los bioflóculos maduros se pudieron detectar 24 filos bacterianos, siete de los cuales representaron, en promedio, más del 3% de la abundancia. Como se puede ver en el Cuadro 2, los siete filos predominantes, y sus porcentajes de participación, fueron: Proteobacteria (51.4), Planctomycetes (17.5), Bacteroidetes (8.7), Chloroflexi (4.7), Actinobacteria (4.4), Firmicutes (3.9), Cyanobacteria (3.3). La composición bacteriana, a este nivel y aproximación, parece ser muy similar en todas las muestras, indicando el bajo efecto de tratamiento (Figura 10). Tanto los bioflóculos madurados en agua clorinada, como esterilizada son similares a los bioflóculos madurados en el agua de mar sin tratamiento. Interesantemente, esta composición no es aportada por el consorcio liofilizado que fue utilizado como inóculo, el cual tiene composición notoriamente diferente. Como se aprecia en el mapa de agrupamiento (clustermap) (Figura 11) los filos representativos hacen que el consorcio liofilizado

(inóculo inicial) se ubique en un lado diferente al que agrupa a las muestras de los bioflóculos, independientemente de los tratamientos.

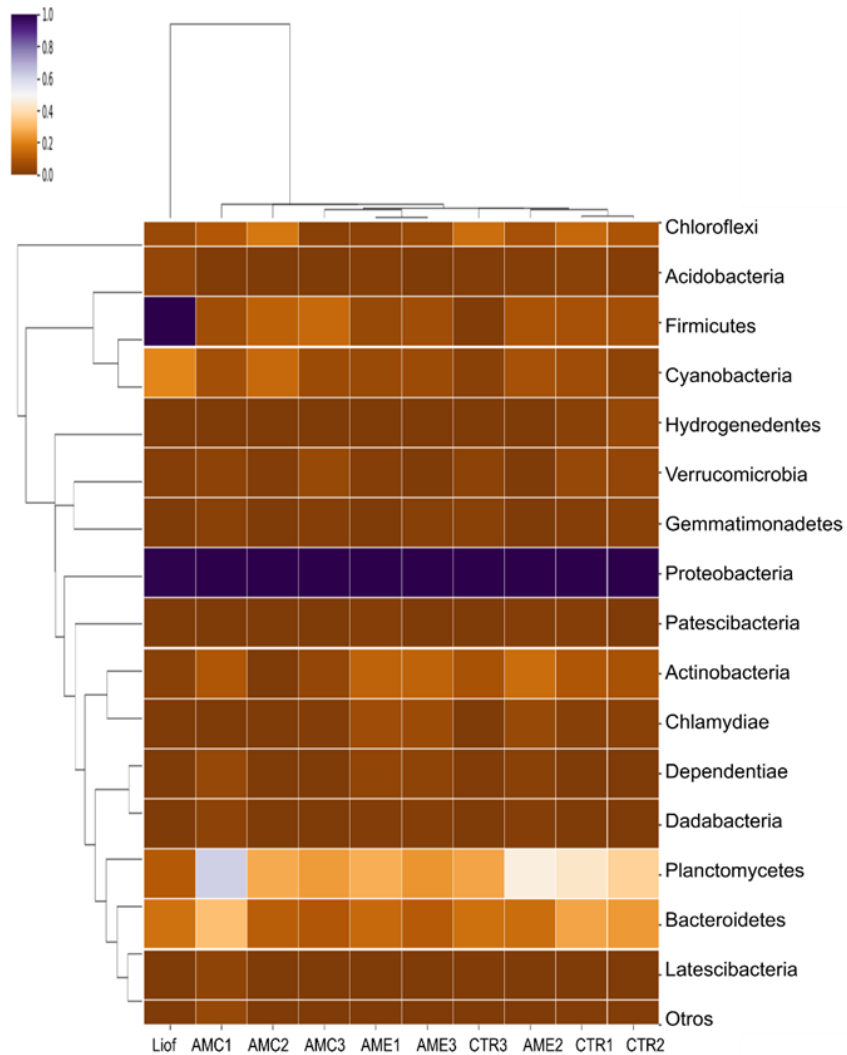
**Cuadro 2.** Porcentaje promedio de los filos en los bioflóculos madurados en agua de mar con diferente tratamiento. En negritas los filos con mayor participación (en promedio > del 3%).

<b>Filo</b>	<b>Esterilizada</b>	<b>Clorinada</b>	<b>Control</b>	<b>Promedio</b>
Acidobacteria	0.5 ± 0.4	0.1 ± 0.2	0.9 ± 0.4	0.5 ± 0.3
<b>Actinobacteria</b>	7.1 ± 0.1	2.0 ± 1.9	4.2 ± 0.3	4.4 ± 0.8
BRC1	0	0	0	0
<b>Bacteroidetes</b>	7.0 ± 0.8	8.2 ± 3.9	10.9 ± 1.7	8.7 ± 2.2
Calditrichaeota	0	0	0.0	0
Chlamydiae	3.0 ± 0.5	0.2 ± 0.3	0.7 ± 0.6	1.3 ± 0.5
<b>Chloroflexi</b>	2.7 ± 1.0	5.0 ± 4.2	6.4 ± 2.2	4.7 ± 2.5
<b>Cyanobacteria</b>	3.2 ± 0.4	4.7 ± 2.7	1.9 ± 0.9	3.3 ± 1.3
Dadabacteria	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.7	0.1 ± 0.2	0.4 ± 0.3
Dependentiae	1.6 ± 0.6	0.6 ± 1.0	0.2 ± 0.2	0.8 ± 0.3
Elusimicrobia	0	0	0	0
Epsilonbacteraeota	0	0	1.1 ± 1.0	0
<b>Firmicutes</b>	3.4 ± 0.7	5.9 ± 3.0	2.5 ± 1.9	3.9 ± 1.9
Fusobacteria	0	0	0.1 ± 0.1	0
Gemmatimonadetes	0.3 ± 0.5	0.6 ± 0.5	1.1 ± 0.2	0.6 ± 0.4
Hydrogenedentes	0	0	1.1 ± 1.2	0.4 ± 0.4
Kiritimatiellaeota	0	0	0.1 ± 0.1	0
Latescibacteria	0	0.5 ± 0.8	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.3
Patescibacteria	0.4 ± 0.4	0	0.3 ± 0.5	0.2 ± 0.3
<b>Planctomycetes</b>	16.9 ± 4.4	18.3 ± 5.9	17.3 ± 2.0	17.5 ± 4.1
<b>Proteobacteria</b>	52.9 ± 4.9	51.3 ± 9.9	50.0 ± 6.7	51.4 ± 7.2
Spirochaetes	0	± b0.5	0	0.1 ± 0.2
Verrucomicrobia	0.2 ± 0.4	1.6 ± 1.3	1.9 ± 0.3	1.2 ± 0.6
WPS-2	0	0.3 ± 0.6	0	0.2

Nota. En negritas los filos con mayor participación (en promedio > del 3%)



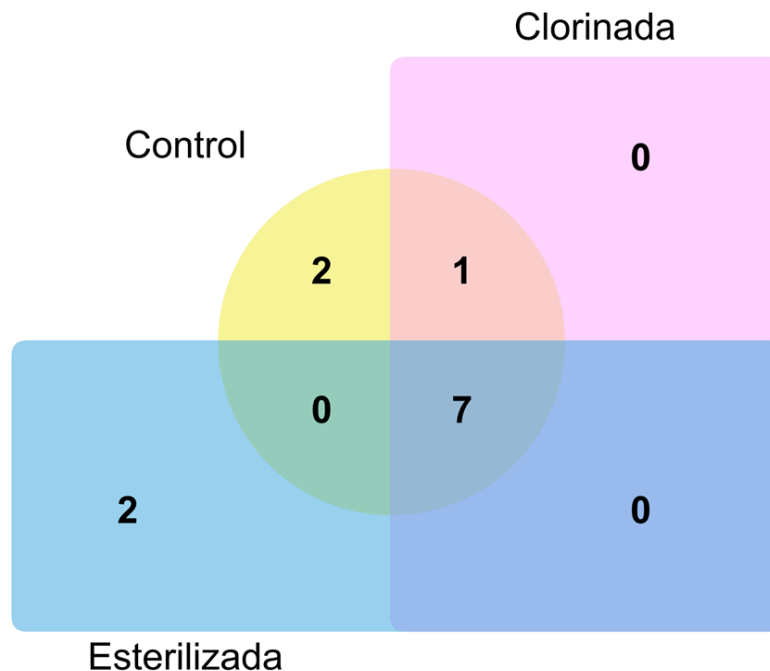
**Figura 10.** Composición taxonómica de los bioflóculos a nivel de filo en los tres tratamientos (bioensayo #2).



**Figura 11.** Mapa de calor de la composición taxonómica del consorcio inicial y de los tratamientos con bioflóculos (bioensayo #2).

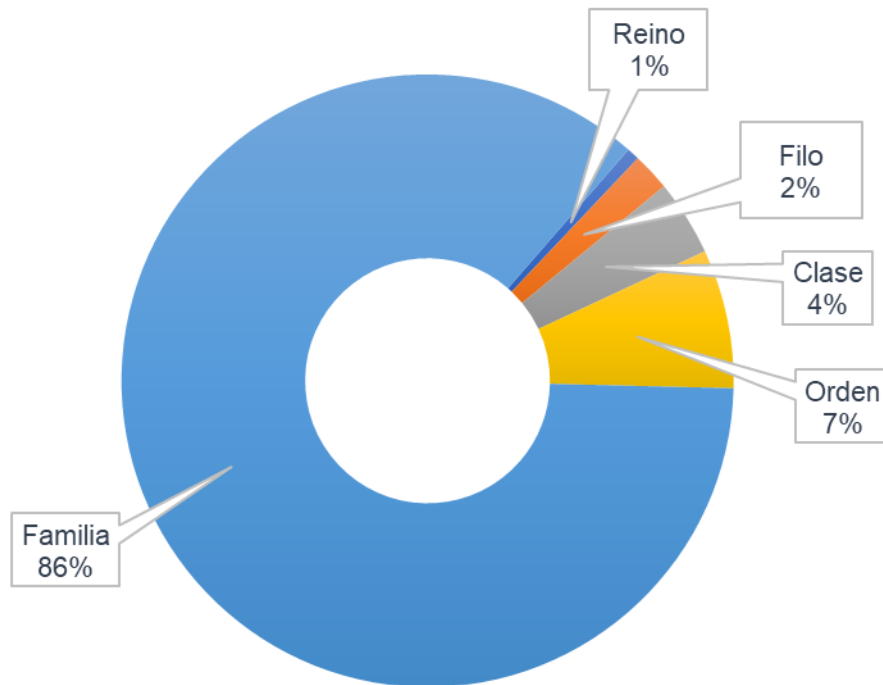
Sin embargo, cuando consideramos una participación del 1% o más, se aprecian que no todos los filos están representados en todos los tratamientos. Mientras que en el control hay diez filos con más de 1% de participación, en el agua esterilizada y en la clorinada hay nueve y ocho, respectivamente. Con este nivel de participación, siete filos (Proteobacteria, Planctomycetes, Bacteroidetes, Chloroflexi, Actinobacteria, Firmicutes, Cyanobacteria) están presentes en todas las muestras, independientemente del tratamiento, por lo que podrían ser considerados como el núcleo (core) de la microbiota de los bioflóculos maduros (Figura 12). El filo Verrucomicrobia estuvo presente en el control y clorinada, pero no en los bioflóculos en agua de mar esterilizada, al menos no en la proporción del 1% (solamente 0.2%). Los filos Dependientiae y Chlamydiae solamente

aparecen, en proporción mayor del 1%, en el agua de mar esterilizada. *Dependentiae* estuvo presente en los bioflóculos madurados en el agua clorinada y en el control con una participación del 0.6% y 0.2%, respectivamente. Mientras que la participación de *Chlamydiae* fue de 0.2 y 0.7% en los bioflóculos de agua clorinada y el control, respectivamente.



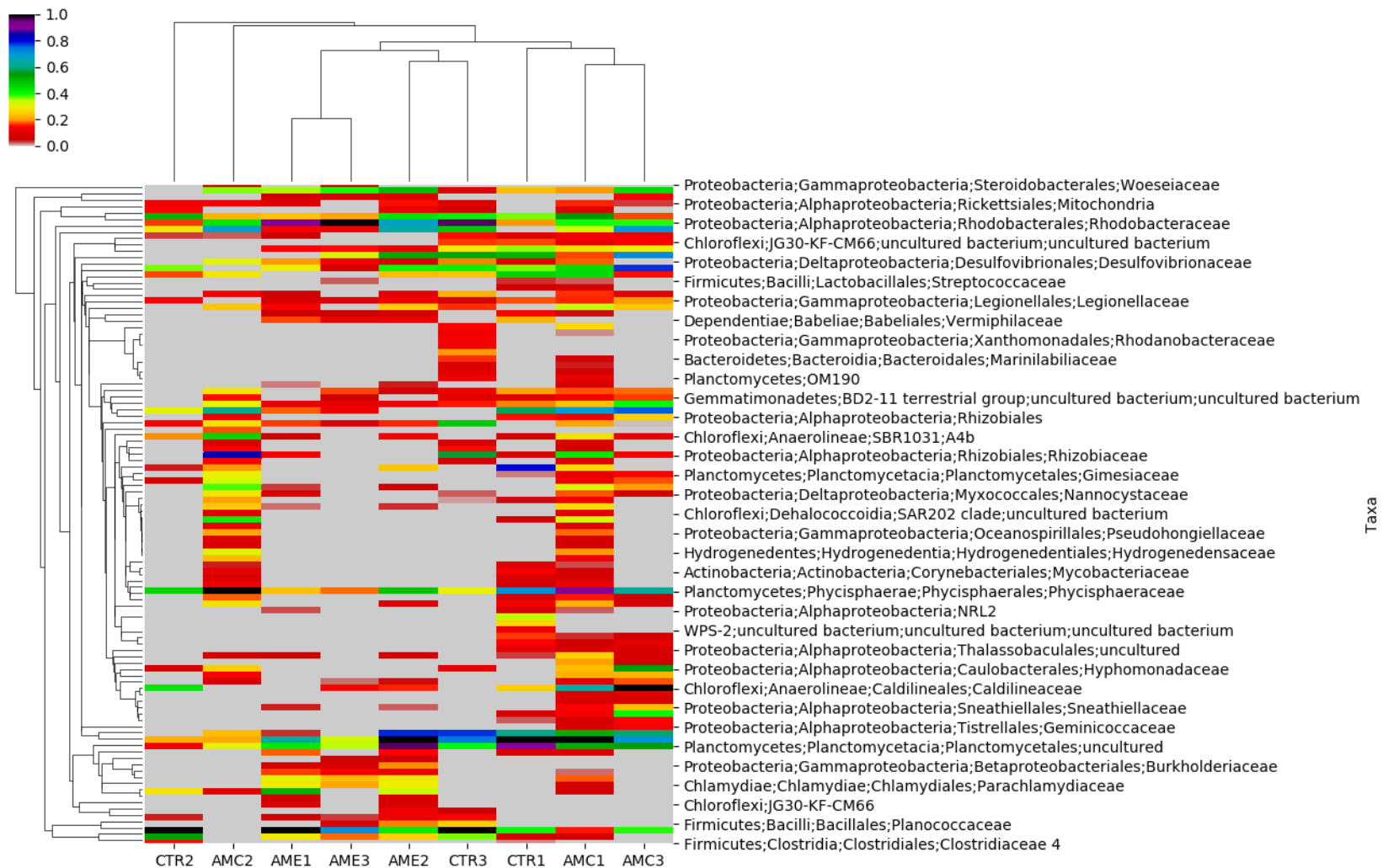
**Figura 12.** Diagrama de venn a nivel de filo con una abundancia >1% por tratamiento (bioensayo #2).

Al incrementar la profundidad en el análisis taxonómico a nivel de familia, se encontraron 150 taxones. No todos ellos alcanzaron el nivel de familia, como se puede ver en la Figura 13, donde en el 14% de los casos el nivel de clasificación fue menor. A nivel de familia, las diferencias parecieron acentuarse entre los bioflóculos producidos en agua marina esterilizada, clorinada o sin tratamiento. Igualmente, las diferencias en la composición se aprecian al establecerse un clustermap considerando los grupos bacterianos que participan con el 1% de abundancia (Figura 14). Sin embargo, fueron 47 familias que tuvieron en promedio una participación mayor o igual al 1%, en al menos un tratamiento. Como se puede apreciar en la Figura 15, 15 de ellas se encuentran en los tres tratamientos (Cuadro 3), mientras que 21 familias se encuentran solamente en un tratamiento.

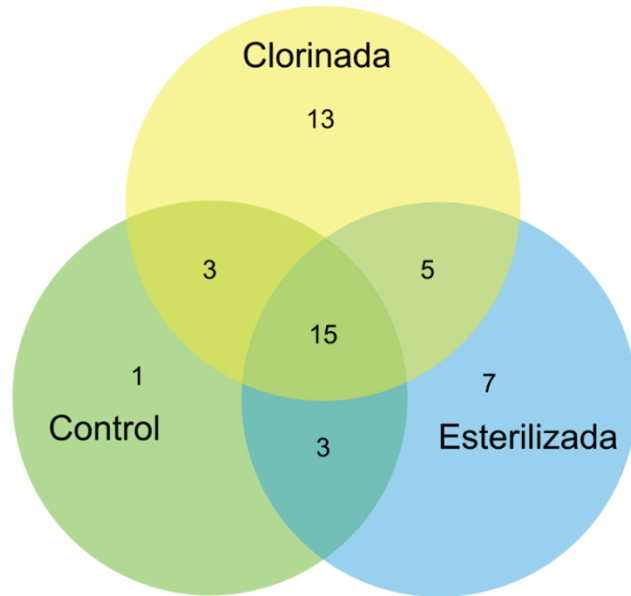


**Figura 13.** Clasificación taxonómica a nivel de familia durante la maduración de los bioflóculos (bioensayo #2).





**Figura 14.** Participación de grupos bacterianos a nivel de familia con el 1% de abundancia durante la fase de maduración de los bioflóculos.



**Figura 15.** Diagrama de venn de los grupos taxonómicos a nivel de familia compartido en todos los tratamientos durante la maduración de los bioflóculos (bioensayo #2).

**Cuadro 3.** Porcentaje promedio de las familias con mayor participación ( $\geq 1\%$ ) en todos los bioflóculos, en función del tipo de agua de mar donde fueron madurados.

<b>Nivel taxonómico</b>	<b>Esterilizada</b>	<b>Clorinada</b>	<b>Control</b>
Bacteroidetes;Bacteroidia;Chitinophagales;Saprospiraceae	1.37	4.4	3.14
Chloroflexi;Anaerolineae;Caldilineales;Caldilineaceae	1.14	3.43	2.88
Cyanobacteria;Oxyphotobacteria;Chloroplast;_f	3.2	1.92	4.69
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Clostridiaceae 1	1.62	1.07	1.99
Planctomycetes;Phycisphaerae;Phycisphaerales;Phycisphaeraceae	3.16	5.43	5.05
Planctomycetes;Planctomycetacia;Pirellulales;Pirellulaceae	6.8	3.93	5.77
Planctomycetes;Planctomycetacia;Planctomycetales;uncultured	6.01	2.91	4.12
Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;Methyloligellaceae	2.24	2.84	3.7
Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodobacterales;Rhodobacteraceae	10.45	2.66	3.99
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;_o;_f	2.61	2.58	3.97
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Alteromonadales;Marinobacteraceae	1.67	1.19	1.75
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Enterobacteriales;Enterobacteriaceae	2.85	1.66	3.96
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Nitrosococcales;Methylophagaceae	3.07	1.96	2.78
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Oceanospirillales;Halomonadaceae	8.61	1.18	8.83
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Vibrionales;Vibrionaceae	2.87	3.84	2.78

En cuanto a la alfa diversidad no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos después de la comparación por pares según los índices que fueron analizados: Shannon ( $5.59 \pm 0.75 - 5.65 \pm 0.74$ ,  $p=0.16$ ), Chao1 ( $65 \pm 20 - 140 \pm 72$ ,  $p=0.09$ ), Faith ( $9.2 \pm 1.6 - 17.2 \pm 6.7$ ,  $p=0.16$ ) y Simpson ( $0.973 \pm 0.016 - 0.987 \pm 0.005$ ,  $p=0.11$ ), lo cual fue un indicio de la similitud entre la diversidad en cuanto a riqueza, abundancia, dominancia y diversidad filogenia (Cuadro 4). Por su parte, los análisis de beta diversidad tampoco arrojaron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.6**). En los gráficos de análisis de coordenadas principales (PCoA) de los índices de beta diversidad hubo una agrupación de los tres tratamientos, aunque el liofilizado permaneció alejado del resto de las muestras, no hubo diferencia significativa. En los análisis de distancia Bray-Curtis, Ponderado, No ponderado y Jaccard fueron explicados en un 46.85, 72.02, 61.84 y 39.35% por los ejes 1, 2 y 3, respectivamente. Del mismo modo, la significancia establecida mediante el análisis PERMANOVA sobre las matrices de distancia de diversidad Beta estimadas (Bray-Curtis, Jaccard, ponderada y no ponderada) no mostró diferencias significativas entre las comunidades microbianas de los bioflóculos maduros (Cuadro 5)

**Cuadro 4.** Índices de alfa diversidad (media  $\pm$  desviación estándar) durante la maduración de los bioflóculos.

Tratamiento	Chao1	Shannon	Faith	Simpson
Esterilizada	$65 \pm 20$	$5.62 \pm 0.43$	$10 \pm 2.2$	$0.975 \pm 0.008$
Clorinada	$68 \pm 27$	$5.59 \pm 0.75$	$9.2 \pm 1.6$	$0.973 \pm 0.016$
Control	$140 \pm 72$	$6.65 \pm 0.74$	$17.2 \pm 6.7$	$0.987 \pm 0.005$
Liofilizado	36	4.54	6.6	0.943

**Cuadro 5.** Resultados del análisis multivariante permutacional de la varianza (PERMANOVA) tras la comparación por pares (A: Bray-Curtis, B: Jaccard, C: Unifrac ponderada y D: Unifrac no ponderada distancias [4999 permutaciones]) entre los tratamientos.

Grupo 1	Grupo 2	pseudo-F	p-value	q-value
<b>A</b>				
AMCI	AMCI	1.21860961	0.1002	0.2004
	AME	1.37293819	0.0952	0.2004
AMC	AME	1.76182557	0.0984	0.2004
<b>B</b>				
AMCI	AMC	1.08884736	0.1066	0.2132
	AME	1.14855125	0.0998	0.2132

<b>AMC</b>	AME	1.2621014	0.0992	0.2132
<b>C</b>				
<b>AMCI</b>	AMC	1.77309718	0.0998	0.29688
	AME	1.23879695	0.2986	0.2986
<b>AMC</b>	AME	4.93615412	0.1008	0.29688
<b>D</b>				
<b>AMCI</b>	AMC	1.61698524	0.2054	0.2488
	AME	1.80238744	0.0968	0.2488
<b>AMC</b>	AME	2.9610964	0.0924	0.2488

---

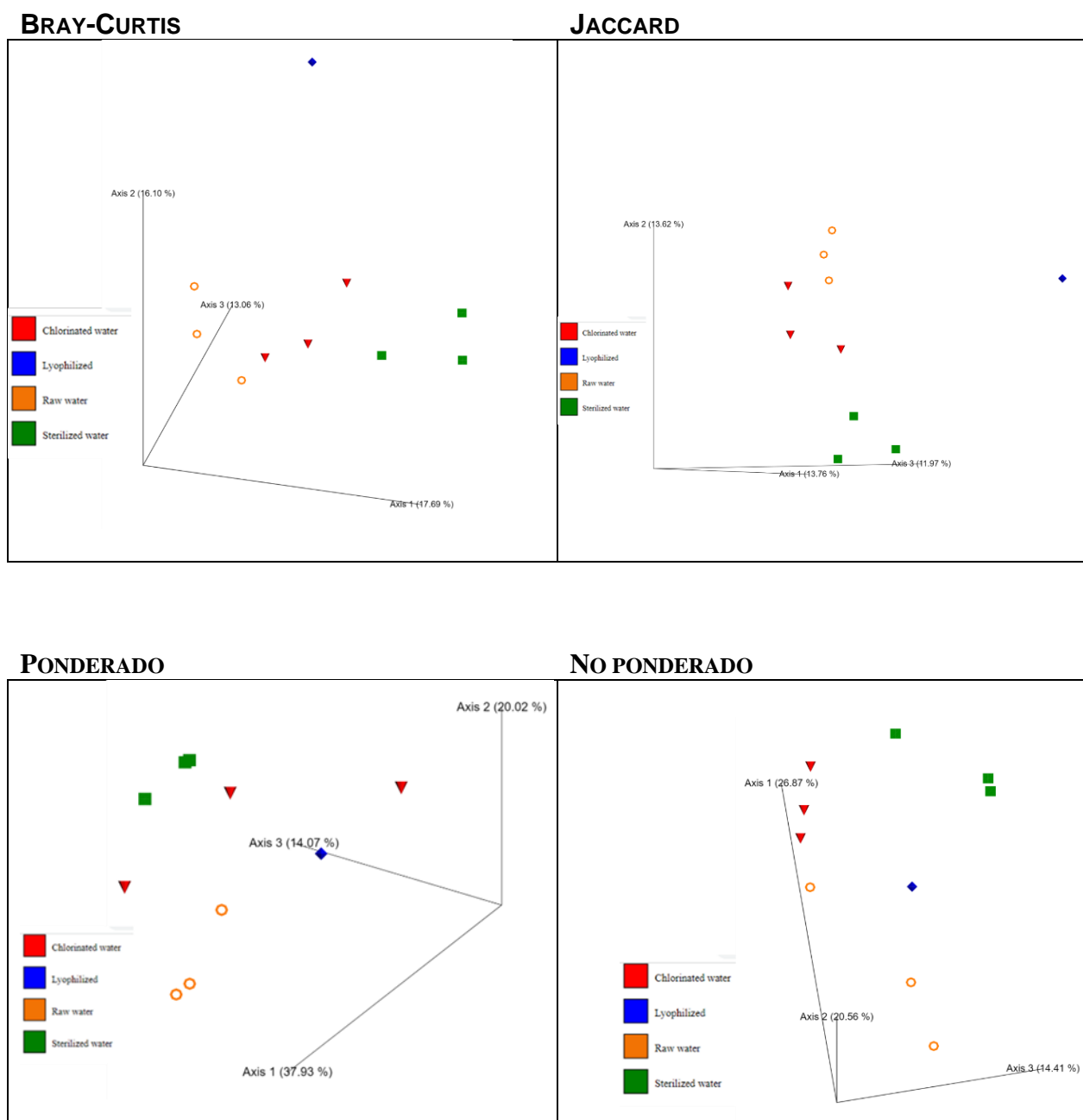


Figura 16. Análisis de beta diversidad (PCoA) durante la maduración de los bioflóculos (bioensayo #2).

6.2.1.2. Predicciones funcionales de las comunidades de los bioflóculos maduros. Las predicciones funcionales fueron realizadas con el uso de la herramienta PICRUST2. Se observó que la mayor parte de las vías KEGG nivel-1 (L1) que fueron predichas para las comunidades bacterianas durante

la maduración de los bioflóculos están asociadas al metabolismo (74%), seguido por procesamiento de información genética (12%), procesos celulares (5%), procesos de información ambiental (2%) y otros de menor abundancia, como muestra el Cuadro 6. Por otro lado, las funciones metabólicas (L2) predominantes fueron la biodegradación y metabolismo de xenobióticos, el metabolismo de carbohidratos, lípidos, aminoácidos, terpenoides y policétidos, cofactores y vitaminas, así como las asociadas al metabolismo energético (Cuadro 6). Es en esta última ruta metabólica (L2) donde son encontrados los procesos relacionados con el metabolismo del nitrógeno (L3), tales como: fijación del nitrógeno (M00175), reducción asimilatoria de nitratos (M00531), reducción disimilatoria de nitratos (M00530), desnitrificación (M00529), nitrificación (M00528) y nitrificación completa, comammox (M00804) (Cuadro 7), todos ellos procesos importantes en la transformación del amonio. Adicionalmente, existen algunas enzimas involucradas en el metabolismo del nitrógeno las cuales juegan un papel fundamental en dicho proceso, enzimas que pudieron ser identificadas según la base de datos KEGG (EC-KYOTO), tal como muestra el Cuadro 8 y que estuvieron presentes en los tres tratamientos (AME, AMCI y AMC) durante la maduración de los bioflóculos.

**Cuadro 6.** Vías KEGG nivel-1 involucradas durante la fase de maduración de los bioflóculos.

<b>Jerarquía-KEGG</b>	<b>Rutas</b>	<b>Repeticiones</b>	<b>Abundancia (%)</b>
<b>Metabolismo</b>	Biodegradación y metabolismo de xenobióticos	19	74.0
	Metabolismo de los carbohidratos	17	
	Metabolismo de terpenoides y policétidos	13	
	Metabolismo de lípidos	11	
	Metabolismo de aminoácidos	11	
	Metabolismo de cofactores y vitaminas	11	
	Metabolismo energético	8	
	Biosíntesis de otros metabolitos secundarios	7	
	Metabolismo de otros aminoácidos	6	
	Biosíntesis y metabolismo de glicanos	3	
	Metabolismo de los nucleótidos	2	
	<b>Procesamiento de información genética</b>	Transcripción	
Replicación y reparación		6	
Plegamiento, clasificación y degradación		5	
<b>Procesamiento de información</b>	Transporte de membrana	3	2.0
	Transducción de señales	2	

<b>medioambiental</b>	Moléculas señalizadoras e interacción	1	
	Transporte y catabolismo	3	
<b>Procesos celulares</b>	Crecimiento y muerte celular	3	5.0
	Motilidad celular	2	
	Comunidad celular - procariotas	1	
	Sistema endocrino	2	
<b>Sistemas orgánicos</b>	Sistema inmunitario	1	0.3
	Sistema digestivo	1	
	Adaptación al medio ambiente	1	
<b>No asignado</b>	No asignado	7	6.0

**Cuadro 7.** Claves en la base de datos KEGG para identificación de rutas metabólicas a nivel 3 y 4.

<b>Ruta metabólica. Nivel 3-KEGG</b>	<b>Proceso</b>	<b>Clave en KEGG</b>
	Nitrificación	M00528
	Denitrificación	M00529
Metabolismo del nitrógeno (KO00910)	Fijación de nitrógeno	M00175
	Reducción disimilatoria de nitrato	M00530
	Reducción asimilatoria de nitrato	M00531
	Nitrificación completa (comammox)	M00804

**Cuadro 8.** Enzimas implicadas en el metabolismo del nitrógeno según la base de datos KEGG.

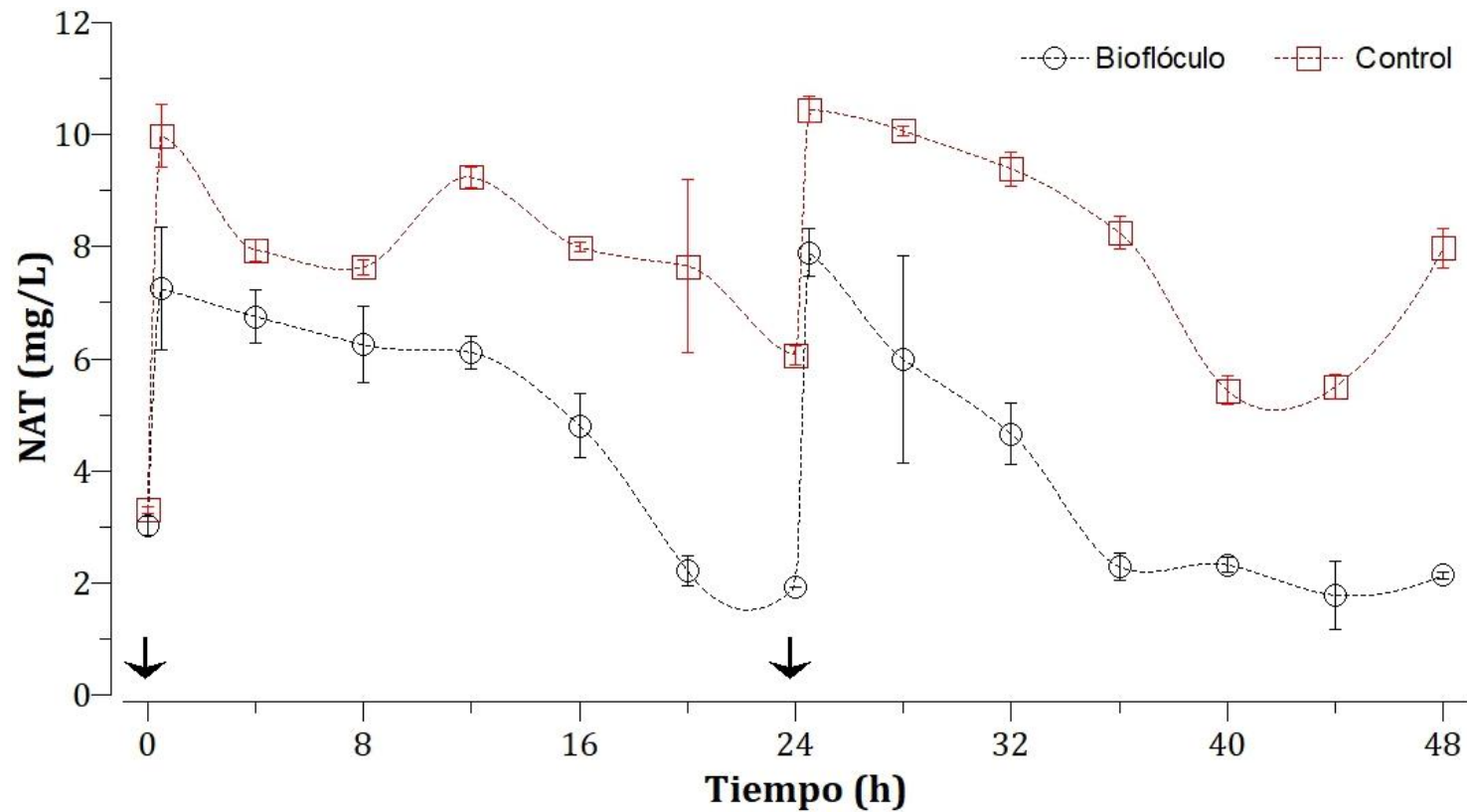
<b>Enzimas</b>	<b>Abreviación</b>
Nitrato reductasa	NasB
Ferreoxidina-nitrato reductasa	NarB
Amonio monooxigenasa subunidad A	AmoA
Amonio monooxigenasa subunidad B	AmoB
Amonio monooxigenasa subunidad C	AmoC
Nitrato reductasa (citocromo)	NapB
Óxido nítrico reductasa subunidad C	NorC
Nitrato reductasa subunidad gamma	Narl
Hidroxilamina deshidrogenasa	Hao
Menaquinol-citocromo C reductasa subunidad hierro azufre	NrfH
Nitrito reductasa (formadora de NO)	NirK
Nitrato reductasa/nitrato oxidoreductasa subunidad alfa	NxrA
Nitrato reductasa (citocromo c552)	NrfA
Nitrato reductasa/Nitrito oxidoreductasa subunidad beta	NxrB
Nitrito reductasa ferroxidina	NirA
Nitrito-óxido reductasa	NosZ
Óxido nitroso reductasa subunidad I de citocromo b	NorB
Nitrato reductasa subunidad catalítica	NasB



Nitrato reductasa periplásmica	NapA
Nitrato reductasa subunidad pequeña	NirD
Nitrato reductasa subunidad alargada	NirB

### 6.2.2. Fase de Oxidación de Amonio

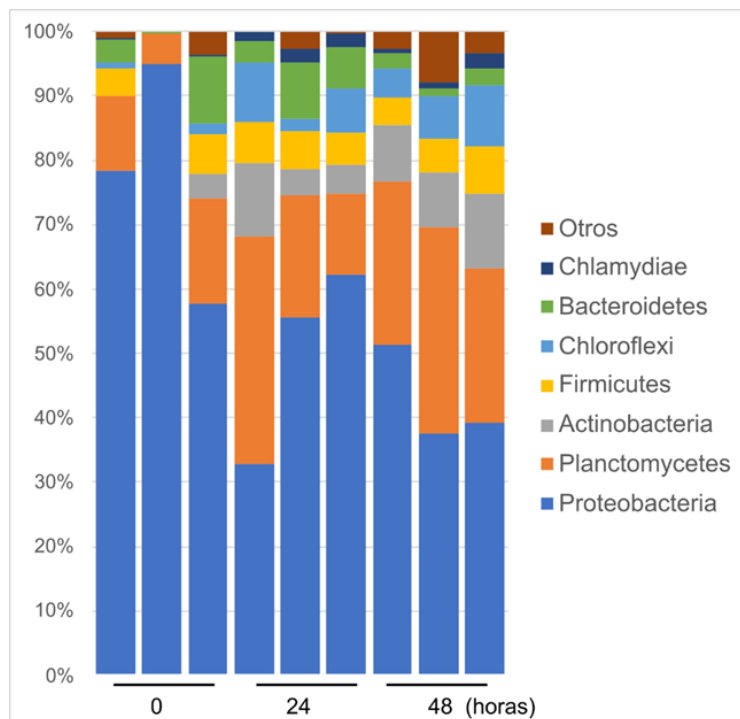
Además del color y los SS, la concentración de compuestos nitrogenados ( $\text{NH}_3/\text{NH}_4$  y  $\text{NO}_2$ ) en el agua, fue indicativo de que los bioflóculos habían alcanzado la madurez. Así mismo, su capacidad para oxidar el amonio también fue probada. En este caso, los bioflóculos fueron madurados por triplicado, durante ocho semanas, en agua de mar sin tratamiento. Respecto a la capacidad de oxidar el amonio se comprobó que a los 30 minutos después de la aplicación de cloruro de amonio, la concentración de éste se elevó, pero dicho incremento fue menor en las unidades con bioflóculos (7 mg/l de NAT) que en los controles (10 mg/l de NAT). De igual manera, el descenso fue más pronunciado en las unidades con bioflóculos, llegando a la concentración inicial a las 20 horas después de la adición del cloruro de amonio (Figura 17), con una tasa de oxidación de 0.22 mg/L de NAT/hora. En el control también hubo reducción de 0.16 mg/L de NAT/hora, pero sin regresar a los valores iniciales. A las 24 horas de la primera aplicación y con los niveles de NAT bajos, se hizo una segunda aplicación de cloruro de amonio. Como se aprecia en la Figura 17, en las unidades con bioflóculos los niveles de cloruro descienden aún más rápido regresando a los valores basales a las 16 horas después de la aplicación, donde la tasa de oxidación aumento a 0.24 mg/L de TAN/hora. Por su parte, el control también mostró actividad, reduciendo los niveles de NAT, pero con menor velocidad y eficiencia con una tasa de oxidación de 10 mg/L de TAN/hora; además, el control no regresó a los niveles basales y la concentración nunca fue menor a 6 mg/L



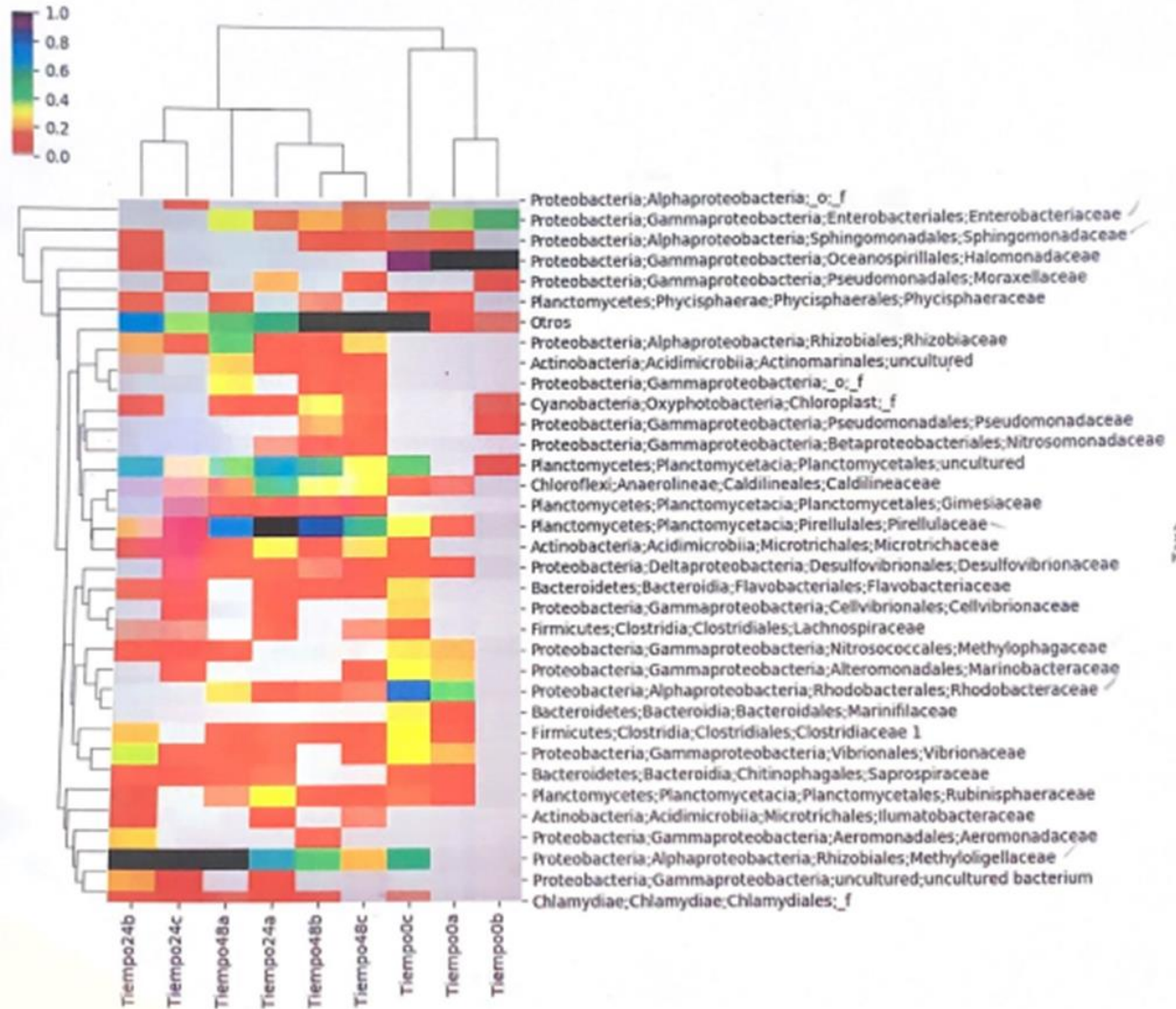
**Figura 17.** Concentración del nitrógeno amoniaco total (NAT) durante la fase de oxidación de amonio a las 24 y 48 h en los bioflóculos maduros.

Nota. Las flechas indican el tiempo en el que se aplicó cloruro de amonio.

6.2.2.1 Clasificación taxonómica de los bioflóculos maduros durante la fase de oxidación de amonio. Durante la fase de oxidación del amonio, el análisis metagenómico del contenido bacteriológico de los bioflóculos arrojó un total de 16 filos bacterianos, donde los siete más abundantes en conjunto representaron el 97% (Figura 18). Los filos con mayor fueron Proteobacteria (56.64%), Planctomycetes (20.11%), Actinobacteria (5.86%), Firmicutes (4.93%), Chloroflexi (4.61%), Bacteroidetes (4.29%) y Chlamydiae (1.17%). Al profundizar en el análisis taxonómico, a nivel de familia se encontraron 97 grupos bacterianos, de los cuales 84 alcanzaron la descripción taxonómica de familia, ocho de orden, tres de clase, uno de filo y uno de reino. Las familias más abundantes se presentan en la Figura 19, donde la población en el tiempo inicial fue ligeramente diferente a la de las 24 y 48 horas. Las familias con una participación igual o mayor a 1%, son enlistadas en el Cuadro 9, donde se pueden apreciar las diferencias en el porcentaje de participación en algunos casos.



**Figura 18.** Composición taxonómica de los bioflóculos durante la fase de oxidación de amonio (bioensayo #2).



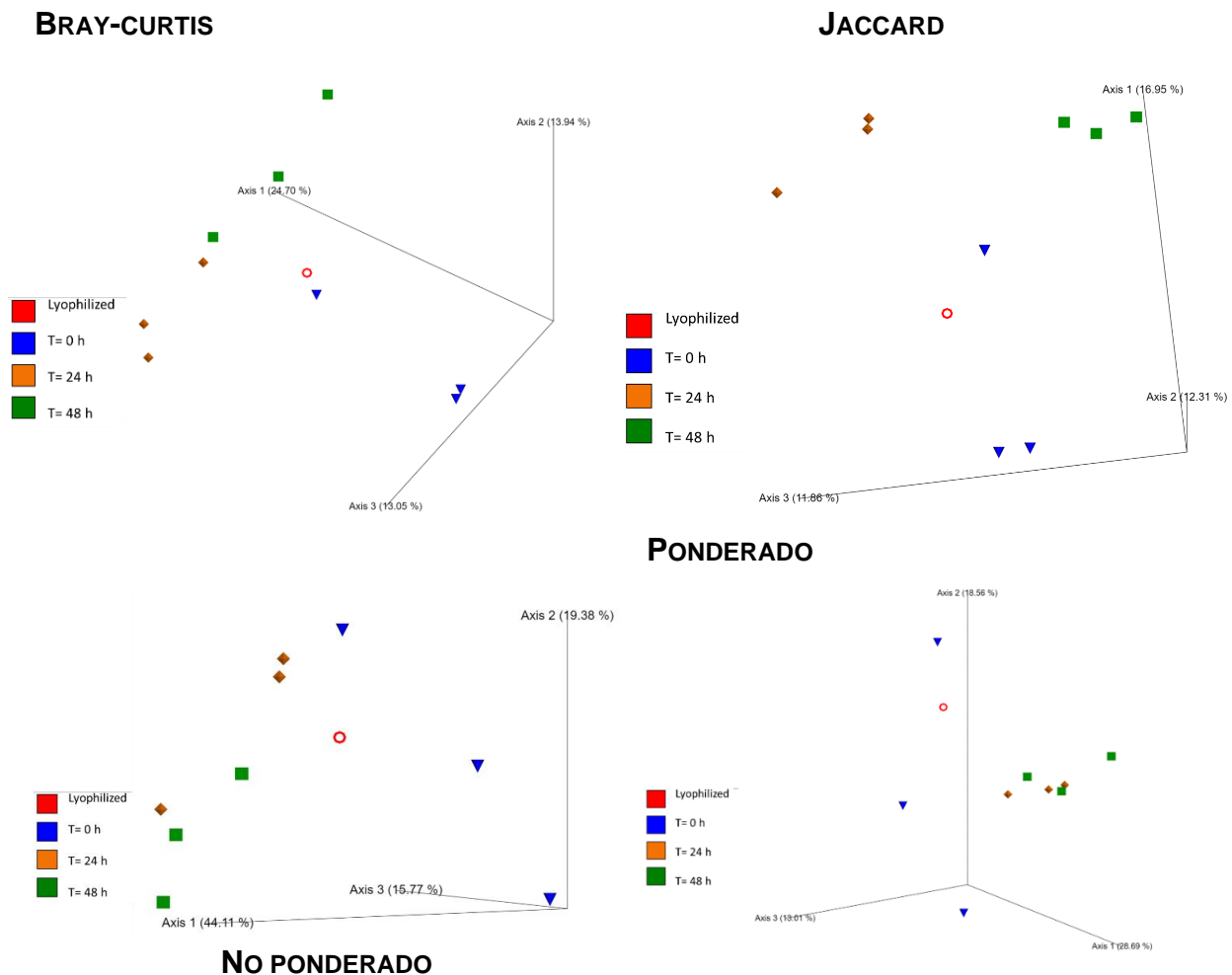
**Figura 19.** Análisis taxonómico a nivel de familia durante la fase de oxidación de amonio para el T 0h= Tiempo0 a b c, T 24h= Tiempo24 a b c, T 48h= Tiempo48 a b c. (bioensayo #2).

**Cuadro 9.** Composición taxonómica de los bioflóculos durante la oxidación de amonio: Familias con participación  $\geq 1\%$ .

<b>Taxones</b>	<b>0 h</b>	<b>24h</b>	<b>48 h</b>	<b>Promedio</b>
Actinobacteria;Acidimicrobiia;Actinomarinales;uncultured	0.00	0.43	3.08	1.17
Actinobacteria;Acidimicrobiia;Microtrichales;Ilumatobacteraceae	0.00	1.36	0.25	0.54
Actinobacteria;Acidimicrobiia;Microtrichales;Microtrichaceae	0.71	3.09	3.67	2.49
Actinobacteria;Actinobacteria;Corynebacteriales;Mycobacteriaceae	0.00	1.37	0.00	0.46
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Marinifilaceae	1.67	0.00	0.00	0.56
Bacteroidetes;Bacteroidia;Chitinophagales;Saprospiraceae	1.36	1.85	0.59	1.27
Bacteroidetes;Bacteroidia;Flavobacteriales;Flavobacteriaceae	1.04	3.04	0.83	1.64
Chlamydiae;Chlamydiae;Chlamydiales;_f	0.12	1.88	0.55	0.85
Chloroflexi;Anaerolineae;Caldilineales;Caldilineaceae	0.59	4.83	5.75	3.72
Cyanobacteria;Oxyphotobacteria;Chloroplast;_f	0.69	1.49	3.45	1.88
Dependentiae;Babeliae;Babeliales;_f	0.00	0.12	1.33	0.48
Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Planococcaceae	0.00	1.10	0.00	0.37
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Clostridiaceae 1	2.79	2.08	2.28	2.39
Planctomycetes;Phycisphaerae;Phycisphaerales;Phycisphaeraceae	1.65	1.05	1.09	1.26
Planctomycetes;Planctomycetacia;Pirellulales;Pirellulaceae	3.25	8.18	14.0	8.49
Planctomycetes;Planctomycetacia;Planctomycetales;Gimesiaceae	0.00	0.83	1.20	0.68
Planctomycetes;Planctomycetacia;Planctomycetales;Rubinisphaeraceae	1.67	2.38	1.56	1.87
Planctomycetes;Planctomycetacia;Planctomycetales;uncultured	4.19	9.49	8.23	7.30
Proteobacteria;Alphaproteobacteria;_o;_f	0.10	1.36	0.22	0.56
Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Caulobacterales;Hyphomonadaceae	1.01	0.00	0.47	0.49
Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;Methyloligellaceae	2.78	21.0	10.7	11.54
Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;Rhizobiaceae	0.00	3.23	5.26	2.83
Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodobacterales;Rhodobacteraceae	7.82	0.82	2.68	3.78
Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Sphingomonadales;Sphingomonadaceae	1.17	0.74	1.35	1.08
Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Tistrellales;Geminiococcaceae	0.00	0.00	1.23	0.41
Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Desulfovibrionales;Desulfovibrionaceae	1.63	1.27	0.94	1.28
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;_o;_f	0.00	0.00	3.16	1.05
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Aeromonadales;Aeromonadaceae	0.00	1.62	0.29	0.64
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Alteromonadales;Marinobacteraceae	3.62	1.04	0.41	1.69
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Betaproteobacteriales;Nitrosomonadaceae	0.00	0.15	1.43	0.53
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Cellvibrionales;Cellvibrionaceae	0.98	1.49	0.00	0.82

Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Enterobacteriales;Enterobacteriaceae	12.5	0.97	4.79	6.09
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Nitrosococcales;Methylophagaceae	3.08	1.92	0.67	1.89
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Oceanospirillales;Halomonadaceae	32.1	0.79	0.00	10.99
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pseudomonadales;Moraxellaceae	1.86	1.85	0.68	1.47
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pseudomonadales;Pseudomonadaceae	1.99	0.00	1.58	1.19
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;uncultured;uncultured bacterium	0.00	2.60	0.00	0.87
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Vibrionales;Vibrionaceae	3.48	4.05	1.73	3.09

En cuanto a la riqueza y abundancia bacteriana, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, según los índices de alfa diversidad: Shannon ( $p=0.21$ ), CHA<sub>01</sub> ( $p=0.11$ ), Faith ( $p=0.64$ ) y Simpson ( $p=0.21$ ), lo cual indicó similitud en riqueza, abundancia, dominancia y filogenia (Cuadro 4). Por otro lado, los gráficos de análisis de coordenadas principales (PCoA) de los índices de beta diversidad indican que hubo una agrupación de los tres tratamientos, lo que indica que no hubo diferencia significativa. En los análisis de distancia Bray-Curtis, Ponderado, No ponderado y Jaccard fueron explicados en un 51.69, 79.26, 60.26 y 41.12% por los ejes 1, 2 y 3, respectivamente (Figura 20).



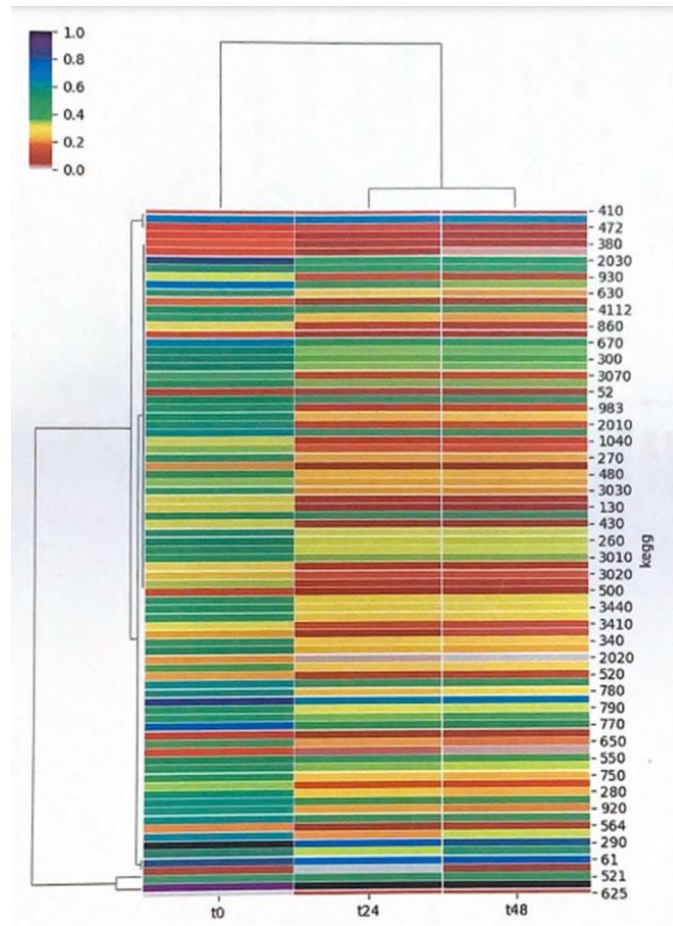
**Figura 20.** Análisis de componentes principales (PCoA) de beta diversidad durante la fase de oxidación de amonio (bioensayo #2).

6.2.2.2 Predicciones funcionales. Por último, las predicciones funcionales llevadas a cabo por PICRUS2 durante esta fase del bioensayo reportaron 142 funciones que, en su mayoría están asociadas al metabolismo (74%). Las otras funciones están asociadas a procesos de información genética (12%), procesos celulares (5%), procesos de información ambiental (3%), y otras de menor abundancia, como muestra el Cuadro 10. Las funciones asociadas al metabolismo están dirigidas hacia: biodegradación y metabolismo de xenobióticos (17%), el metabolismo de carbohidratos (17%), aminoácidos (10%), lípidos (10%), cofactores y vitaminas (10%), terpenoides y policétidos (10%), nucleótidos (2%) y el metabolismo energético (15%). Las funciones encontradas se enlistan en el Anexo D. También, la figura 21 muestra el comportamiento de las funciones predichas por PICRUS2 durante el bioensayo de la oxidación de amonio.

**Cuadro 10.** Vías KEGG nivel-1 durante la fase de oxidación de amonio.

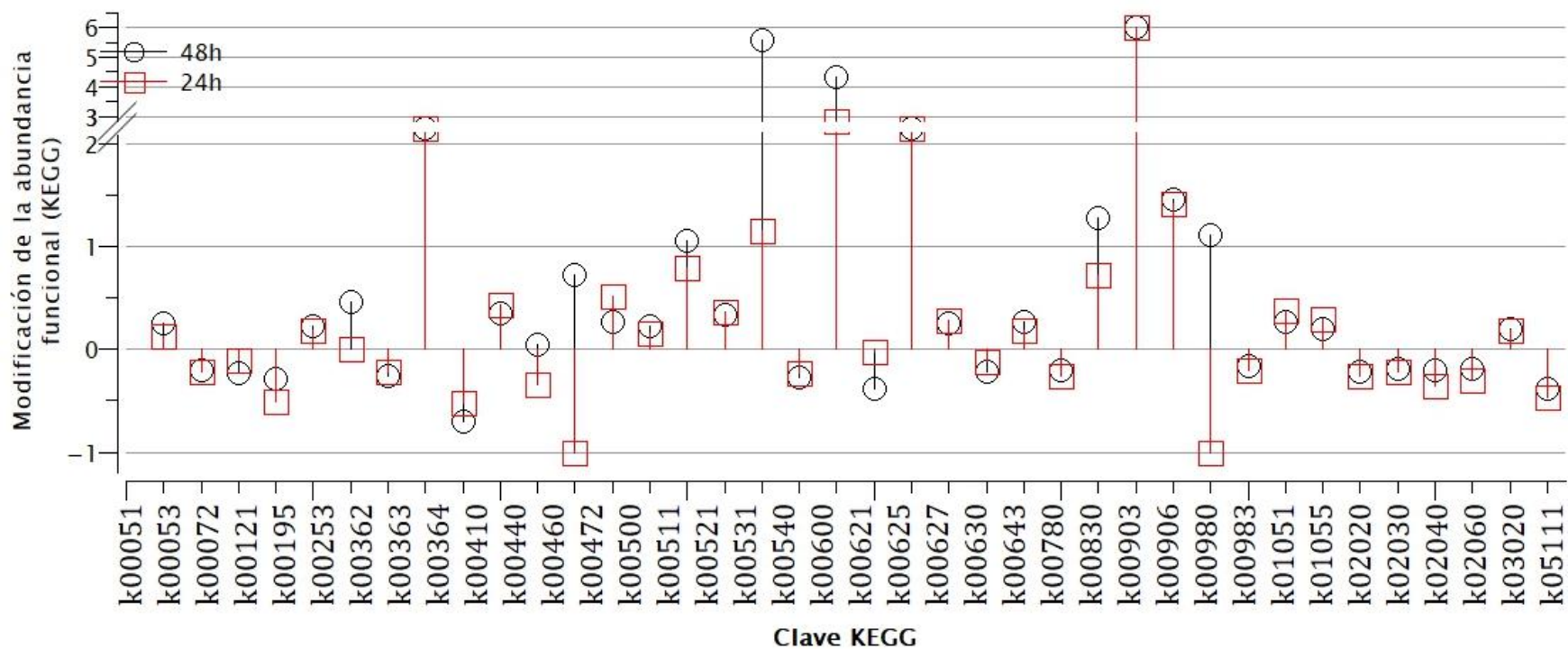
<b>Jerarquía-KEGG</b>	<b>Rutas</b>	<b>Repeticiones</b>	<b>Abundancia (%)</b>
<b>Metabolismo</b>	Biodegradación y metabolismo de xenobióticos	18	74.0
	Metabolismo de los carbohidratos	17	
	Metabolismo de los aminoácidos	11	
	Metabolismo de cofactores y vitaminas	11	
	Metabolismo de los lípidos	11	
	Metabolismo de terpenoides y policétidos	11	
	Metabolismo energético	8	
	Biosíntesis de otros metabolitos secundarios	7	
	Metabolismo de otros aminoácidos	6	
	Biosíntesis y metabolismo de los glicanos	3	
	Metabolismo de nucleótidos	2	
<b>Procesamiento de información genética</b>	Traducción	6	12.0
	Replicación y reparación	6	
	Plegamiento, clasificación y degradación	5	
<b>Procesamiento de información medioambiental</b>	Transporte de membrana	3	3.0
	Transducción de señales	3	
<b>Procesos celulares</b>	Transporte y catabolismo	3	5.0
	Crecimiento y muerte celular	3	
	Motilidad celular	2	
	Comunidad celular - procariontas	1	
<b>Sistemas orgánicos</b>	Sistema endocrino	2	0.3
	Sistema inmunitario	1	
	Adaptación al medio ambiente	1	
<b>No asignado</b>	No asignado	7	6.0





**Figura 21.** Mapa de calor de las funciones predichas por PICRUSt2 durante la fase de oxidación de amonio a las 0, 24 y 48h (bioensayo #2).

Al analizar la composición funcional de los bioflóculos durante la oxidación de amonio, se observó que 38 de ellas fueron modificadas en cuanto a su abundancia a las 24 y 48 h posterior a la adición de amonio (Figura 22). Estas funciones que se modificaron están relacionadas con 15 rutas del nivel 2, como se enlistan en el Cuadro 11. El 24 % de dichas funciones están asociadas a la biodegradación y metabolismo de xenobióticos, mientras que las asociadas al metabolismo de carbohidratos y metabolismo de terpenoides y policétidos, representan el 13 % cada uno. Otras funciones que fueron modificadas se encuentran asociadas al metabolismo de aminoácidos, lípidos, glicanos, cofactores, vitaminas y el metabolismo energético. También se encuentran funciones relacionadas con la transcripción, transducción, transporte membranal y comunicación celular, entre otras.



**Figura 22.** Modificación de la abundancia funcional enzimática durante la fase de oxidación de amonio (bioensayo #2).

**Cuadro 11.** Asociación entre rutas KEEG-L2 y funciones KEEG-L3.

Ruta	Función	%
Biodegradación y metabolismo de Xenobióticos	ko00362, ko00363, ko00364, ko00621, ko00625, ko00627, ko00643, ko00980, ko00983.	24
Metabolismo de carbohidratos	ko00051, ko00053, ko00500, ko00511, ko00630.	13
Metabolismo de terpenoides y policétidos	ko01051, ko01055, ko00903, ko00906, ko00253.	13
Metabolismo de otros aminoácidos	ko00410, ko00440, ko00460.	8
Biosíntesis y metabolismo de glicanos	ko00531, ko00540.	5
Metabolismo de lípidos	ko00121, ko00600.	5
Metabolismo de cofactores y vitaminas	ko00780, ko00830.	5
Motilidad celular	ko02030, ko02040.	5
Metabolismo energético	ko00195.	3
Biosíntesis de otros metabolitos secundarios	ko00521.	3
Transcripción	ko03020.	3
Transporte de membrana	ko02060.	3
Señales de transducción	ko02020.	3
Comunidad celular- procariontas	ko05111.	3
No asignados	ko00072, ko00472.	5

Finalmente, las 38 funciones que modificaron su abundancia son enlistadas en el Cuadro 12. Se puede apreciar que, en general, el 50% de la diversidad de funciones aumentó su abundancia de acuerdo a los genomas de las bacterias, mientras que el 36% de la diversidad funcional disminuyeron a las 24 y 48 h. Interesantemente, el número de funciones que disminuyeron su abundancia a las 24 h fue menor (5%), mientras que el 9% de las funciones aumentaron su abundancia a las 48 h.

**Cuadro 12.** Potencial de diversidad funcional KEEG-L3 que aumentaron o disminuyeron su abundancia a las 24 y 48 h posterior a la adición de amonio.

Incremento en la abundancia de funciones (L3) a las 24 y 48 h			
KEEG-L2	KEEG-L3		%
Biodegradación y metabolismo de Xenobióticos	ko00625, ko00627, ko00643, ko00363		11
Metabolismo de terpenoides y policétidos	ko00903, ko00906, ko01051, ko01055		11
Metabolismo de carbohidratos	ko00051, ko00500, ko00511		8
Metabolismo energético	ko00195		3

Biosíntesis y metabolismo de glicanos	ko00531	3	
Metabolismo de lípidos	ko00600	3	
Metabolismo de cofactores y vitaminas	ko00830	3	
Transcripción	ko03020	3	
Metabolismo de otros aminoácidos	ko00410	3	
Biosíntesis de otros metabolitos secundarios	ko00521	3	
No asignados	ko00472	3	
<b>Disminución en la abundancia de funciones (L3) tanto a las 24 como 48 h</b>			
	<b>KEGG-L2</b>	<b>KEGG-L3</b>	<b>%</b>
Biodegradación y metabolismo de Xenobióticos	ko00362,	ko00364, ko00983	8
Metabolismo de carbohidratos	ko00053,	ko00630	5
Motilidad celular	ko02030,	ko02040	5
Metabolismo de lípidos	ko00121		3
Biosíntesis y metabolismo de glicanos	ko00540		3
Metabolismo de cofactores y vitaminas	ko00780		3
Señales de transducción	ko02020		3
Transporte de membrana	ko02060		3
Comunidad celular- procariotas	ko05111		3
No asignados	ko00072		3
<b>Disminución en la abundancia de funciones (L3) a las 24 h, pero incrementadas (abundancia) a las 48 h</b>			
	<b>KEGG-L2</b>	<b>KEGG-L3</b>	<b>%</b>
Metabolismo de otros aminoácidos	ko00460		3
Biodegradación y metabolismo de Xenobióticos	ko00980		3
<b>Incremento en la abundancia de funciones (L3) a las 48 h</b>			
	<b>KEGG-L2</b>	<b>KEGG-L3</b>	<b>%</b>
Metabolismo de terpenoides y policétidos	ko00253		3
Metabolismo de otros aminoácidos	ko00460		-
Biodegradación y metabolismo de Xenobióticos	ko00980		-

## 7. DISCUSIÓN

El uso de la tecnología de bioflóculos ha permitido mejorar las condiciones en los cultivos acuícolas en cuanto a los parámetros de calidad del agua, esto principalmente por el proceso de nitrificación que es llevado a cabo por los microorganismos que lo componen, principalmente por bacterias (Samocho, 2019). Tal como ocurrió en el bioensayo #1, el uso de bioflóculos permitió mantener la calidad del agua bajo condiciones adecuadas para los organismos cultivados que favoreció su desempeño productivo, lo cual es deseable a nivel de granja comercial.

En este bioensayo se evidenció que una vez que las comunidades bacterianas que forman los bioflóculos lograron establecerse, especialmente las nitrificantes, la concentración de NAT comenzó a disminuir notablemente a partir de la semana 4 en el tratamiento con bioflóculos, hasta alcanzar un valor de 1.6 mg/L en la semana 10. Así también, la concentración de nitritos en la misma semana (semana 4) fue menor en el tratamiento con bioflóculos en comparación con los otros dos tratamientos, lo que evidenció que el proceso de nitrificación logró establecerse en el tratamiento con bioflóculos antes que en el resto de los tratamientos.

Otro aspecto importante que va de la mano con la acumulación de compuestos nitrogenados tóxicos es la capacidad de los organismos cultivados para tolerarlos (Abakari *et al.*, 2021). En nuestro bioensayo pudimos constatar esta capacidad a través de la supervivencia lograda, ya que en el tratamiento con bioflóculos y el control con recambio de agua se obtuvo una supervivencia del 67 y 65 %, respectivamente, mientras que para el tratamiento control sin recambio de agua la supervivencia fue del 37%. En este punto, es importante destacar que, el porcentaje de sobrevivencia del tratamiento control con recambio de agua pudiera ser atribuido a todos los cuidados adicionales que se tuvieron, como recambios de agua para reducir concentración de compuestos nitrogenados, retirar tanto sedimento como alimento no consumido para evitar su acumulación, así como retirar las mudas y organismos muertos con la finalidad de reducir la proliferación de patógenos. Cuidados que normalmente no se tienen durante el cultivo acuícola, principalmente por representar mayor trabajo y costo económico.

Por otra parte, la baja supervivencia en el tratamiento control sin recambio de agua provocó que este tuviera la menor producción de biomasa al final del bioensayo y, por lo tanto, al haber menos organismos en este tratamiento, menor cantidad de desechos fueron generados, como en el caso del NAT, lo que pudiera explicar por qué al finalizar las diez semanas, la concentración del

nitrógeno amoniacal total fue similar respecto a los otros dos tratamientos. Por otro lado, el tratamiento con bioflóculos presentó la mayor producción de biomasa, lo que es atribuido directamente a los bioflóculos, ya que en este tratamiento no se tuvieron cuidados especiales salvo la reposición del agua evaporada y la alimentación de los organismos. Es importante mencionar que, durante el cultivo de camarón con bioflóculos no fueron realizados recambios de agua, por lo que dicha sobrevivencia se atribuye principalmente a las bacterias nitrificantes que conforman los bioflóculos. Además, dado que los bioflóculos pueden ser consumidos por los organismos cultivados (Sgnaulin *et al.*, 2020) y contiene bacterias probióticas (Ferreira *et al.*, 2015), posiblemente ejercieron un efecto benéfico sobre los camarones cultivados.

Otro aspecto que es importante resaltar, es que el tratamiento con bioflóculos no generó residuos (aguas residuales), lo cual implica que no tendría un impacto ambiental a nivel de granja y abonaría a la bioseguridad (Ahmad *et al.*, 2017). De forma adicional, los nutrientes presentes en el agua nunca fueron descartados y pudieron ser aprovechados por los bioflóculos. Con este bioensayo se comprobó que es posible cultivar organismos como el camarón blanco (*L. vannamei*) con la tecnología BFT y, mantener la calidad del agua, especialmente los niveles de compuestos nitrogenados, lo que se traduce en un mejor desempeño productivo.

Todo lo anterior puede ser atribuido en gran medida a la acción de los microorganismos asociados al bioflóculos, sobre todo una vez que alcanzaron el proceso de maduración, proceso que permitió que las comunidades bacterianas lograran establecerse y, por lo tanto, ejercieran su función. Sin embargo, a pesar de los resultados satisfactorios obtenidos en el bioensayo #1, y con la información que fue generada durante el transcurso de las diez semanas, fue posible determinar que el proceso de maduración puede mejorar, para hacerlo más eficiente.

Entre estos aspectos de mejora está el uso de un inóculo inicial, pero con un enfoque microbiológico, es decir, realizar tanto curvas de crecimiento como conteos en placa para validar el momento exacto cuando el inóculo puede ser utilizado, y una vez que éste se encuentre listo, tenga la capacidad de generar nuevos bioflóculos. También, durante la fase de generación y maduración de los bioflóculos, además de la cantidad de sólidos sedimentables (8-10 ml/L) y la formación visual de los bioflóculos que sería un indicativo de madurez, la medición del nitrógeno amoniacal total y los nitritos sería un marcador bioquímico que corroboraría que el proceso nitrificación se ha establecido, y por consiguiente, sería posible comprobar que los bioflóculos han alcanzado la madurez, teniendo la capacidad de oxidar el NAT proveniente de cualquier fuente: alimento no consumido, excreción de organismos cultivados, desaminación de proteínas, etcétera.

Por ello, en el bioensayo #2 fueron tomados en cuenta todos estos aspectos con la finalidad de comprobar si el proceso de maduración podía lograrse de manera más eficaz, pero sin la influencia que los organismos cultivados tiene sobre los bioflóculos.

## 7.1. Consorcio Inicial

### 7.1.1. Reactivación y Preparación del Inóculo Inicial

La ventaja de utilizar un cultivo iniciador para generar bioflóculos radica en que se conocería la composición microbiana con que se estaría iniciando el proceso, la cual por supuesto luego sería modificada por la incorporación de microorganismos del medio. Un consorcio o inóculo inicial podría ser utilizado en diferentes presentaciones y podría estar constituido por diferentes cepas bacterianas (Jiménez-Ordaz *et al.*, 2021), incluidos los probióticos comerciales (Pacheco-Vega *et al.*, 2018; Miao *et al.*, 2017; Miranda-Baeza *et al.*, 2019), bioflóculos frescos madurado previamente o bioflóculos maduros conservados mediante liofilización (Panigrahi *et al.*, 2020). Un consorcio inicial liofilizado involucra un proceso de reactivación rápido y de bajo costo. Si bien los protocolos de reactivación de un inóculo liofilizado son diversos, en el caso de nuestro estudio, este proceso fue llevado a cabo añadiendo fuente de carbono y nitrógeno en incubación. Asimismo, fue demostrada la presencia de bacterias viables sembradas en agar marino 2216 después de 24 h de incubación. Sin embargo, dado que la mayoría de las bacterias ambientales no son cultivables (Rashid y Stingl, 2015), el recuento de UFC/ml no es cuantitativo, solo indicó crecimiento.

Parte de la investigación fue determinar la importancia de la composición bacteriana inicial en la formación de bioflóculo; por ello, el inóculo inicial fue también evaluado tanto en agua marina esterilizada como clorinada. Los valores reportados de concentración bacteriana fueron:  $5.94 \pm 5.64 \times 10^5$ ,  $1.01 \pm 1.29 \times 10^5$  y  $4.50 \pm 4.82 \times 10^4$  UFC/ml para los tratamientos y el control, respectivamente. Estos valores son similares a los reportados al utilizar probióticos comerciales (Hostins *et al.*, 2019; Ringø, 2020), mezclas de cepas caracterizadas y probióticos (Okomoda *et al.*, 2022), e incluso combinaciones de cepas (Miao *et al.*, 2017) para iniciar la generación de bioflóculos.

### 7.1.2. Composición Taxonómica del Consorcio Inicial

La identificación de los perfiles taxonómicos del consorcio inicial usando secuenciación masiva (Abakari *et al.*, 2022), ha demostrado su utilidad en el estudio de comunidades microbianas de ambientes acuáticos (Zhang *et al.*, 2019; Sundaray *et al.*, 2022). Además, el uso de herramientas bioinformáticas como QIIME2 hace posible realizar análisis taxonómicos de comunidades bacterianas de manera rápida y precisa (Zhao *et al.*, 2022; Pilotto *et al.*, 2018; Addo *et al.*, 2021). Adicionalmente, el uso de la herramienta PICRUST2 permite realizar predicciones funcionales de las comunidades bacterianas (Qiao *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2021).

Utilizando estas metodologías se pudo determinar la composición taxonómica del consorcio inicial. Cuatro filos, Proteobacterias, Firmicutes, Cyanobacteria y Bacteroidetes, fueron los más abundantes sumando el 91%. Es importante resaltar la presencia de bacterias del filo Firmicutes y Actinobacterias en el consorcio inicial (estas últimas también presente en el liofilizado, aunque con 1% de abundancia), ya que ha sido reportado que este binomio de bacterias son precursores de la floculación (Meng *et al.*, 2023; Chen *et al.*, 2019; Luo *et al.*, 2020; Ahmad *et al.*, 2022). En este sentido, la presencia de este grupo bacteriano en un cultivo iniciador podría significar en cierta medida que, dicho inóculo tendrá la capacidad de acelerar la generación de bioflóculos. Además, entre las Actinobacterias se han reportado productores de antibióticos utilizados en la acuicultura (Qianhui Wu *et al.*, 2022). Por otro lado, algunos miembros del filo Bacteroidetes también son relacionados con la formación de bioflóculos, ya que tienen la capacidad de colonizar partículas macroscópicas en ambientes acuáticos, incluyendo los sistemas acuícolas (Zhou *et al.*, 2018).

Al profundizar el análisis taxonómico a nivel de familia, en el consorcio inicial, encontramos que Bacillaceae sobresale con el 28.1% de abundancia, en concordancia con los reportes que la señalan como miembros abundantes de los bioflóculos (Zhang *et al.*, 2022; Shitu *et al.*, 2022; Meng *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2023; Goodfellow y Williams, 1983; Chen *et al.*, 2019; de Souza Valente *et al.*, 2020). Esta familia ha sido implicada en los procesos de generación de bioflóculos (Yu *et al.*, 2018), de transformación y asimilación de nitrógeno (Jia *et al.*, 2023; Xu *et al.*, 2022), de degradación de geosmina y 2-methylisoborneol (Ma *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2016), así como de estimulación de la expresión de proteínas relacionadas con la inmunidad (Liu *et al.*, 2020).

La segunda familia más abundante fue Rhodobacteraceae (5.92%) la cual representa un grupo



diverso de bacterias marinas (Dong *et al.*, 2023) con más de 190 géneros y más de 300 especies (Simon *et al.*, 2017). La presencia de esta familia ha sido reportada en bioflóculos (Gullian-Klanian *et al.*, 2023), donde suelen actuar como colonizadoras y precursoras de la floculación debido a su capacidad de adaptación a condiciones de poca disponibilidad de nutrientes (Xiaoli Zhang *et al.*, 2023). Es importante señalar que miembros de esta familia también han sido implicadas en el proceso de desnitrificación (Huang *et al.*, 2023; An *et al.*, 2023). La desnitrificación es un proceso completamente anaeróbico muy eficaz para eliminar el  $\text{NO}_3$  del agua, que comienza con la reducción de nitrato a nitritos y, posteriormente, a través de una cadena de reacciones, a óxido nítrico (NO), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) y, finalmente, a  $\text{N}_2$  (Tsukuda *et al.*, 2015; Conthe *et al.*, 2019; Di Capua *et al.*, 2019), proceso que requiere la adición de una fuente de carbono (Alzate Marin *et al.*, 2016). Para poder promover este proceso deben predominar condiciones de anaerobiosis, lo cual de manera natural ocurre en sedimentos marinos y otros ambientes reducidos (Meng *et al.*, 2020).

Si bien la composición taxonómica del consorcio inicial fue diversa, resulta importante destacar la presencia de grupos bacterianos asociados a promover el proceso de floculación, incluso sobre otras funciones metabólicas, por ser las primeras en desarrollarse una vez que son inoculadas para acelerar la generación de bioflóculos. Sin embargo, la composición bacteriana del consorcio inicial no necesariamente predominará en los bioflóculos maduros, ya que la floculación ocurrirá entre las bacterias del inóculo y de la microbiota del agua.

## 7.2. Maduración del Bioflóculo

### 7.2.1. Generación y Maduración del Bioflóculo

Una vez que los inóculos fueron aplicados a cada una de las unidades experimentales, el monitoreo constante permitió realizar correcciones oportunas cuando fue necesario, reduciendo la probabilidad de tener algún retraso en el proceso de maduración de los bioflóculos. La evolución de los bioflóculos fue similar en todos los tratamientos, (AME, AMC y AMCl), lo cual indicó que

cuando se restablece la comunidad microbiana original, de ser necesario se integran otros microorganismos presentes en el agua. Además, no se vuelve necesario otro tratamiento de purificación en el agua o la reducción de la carga microbiana para establecer bioflóculos en agua de mar, tal como ocurrió en nuestro bioensayo, ya que independientemente de los tratamientos la madurez fue alcanzada en momentos similares. Ciertamente, la maduración de bioflóculos plenamente funcionales debe lograrse en el estanque de cultivo, donde podría alcanzar el equilibrio entre poblaciones autótrofas y heterótrofas. Además, la comunidad microbiana heterótrofa puede ampliarse *ex-situ* en condiciones distintas a las del estanque (Samocho, 2019).

Por otra parte, el manejo de los parámetros de calidad del agua al trabajar con bioflóculos involucra cuidados similares a los realizados en la acuicultura tradicional, como ha sido observado en el cultivo tanto de peces como de crustáceos (Emerenciano *et al.*, 2017; Martínez-Córdova *et al.*, 2018b; Collazos-Lasso y Arias-Castellanos, 2015; Ferreira *et al.*, 2020). Es necesario mantener una aireación vigorosa para garantizar una concentración de oxígeno disuelto de al menos 6 mg/L para cubrir la demanda de oxígeno tanto de los organismos cultivados, como el de la microbiota que conforman los bioflóculos. Además, la aireación debe mantener las partículas de los bioflóculos en suspensión (Hargreaves, 2013), pero no debe ser muy intensa porque provocaría la ruptura de los flóculos (Souza *et al.*, 2019). Para promover el crecimiento de bacterias heterotróficas en los bioflóculos es necesario reducir la intensidad de la luz (Samocho, 2019). En el caso de nuestro estudio, los parámetros de calidad del agua durante todas las fases del bioensayo estuvieron dentro de los rangos adecuados para el cultivo del camarón.

El aumento de los SS en cada una de las UE a partir de la primera semana fue evidencia del crecimiento bacteriano (Figura 8), principalmente de bacterias heterotróficas, ya que estas bacterias tienen una tasa de crecimiento significativamente más rápida que las bacterias nitrificantes (Ebeling *et al.*, 2006), y de la agregación de partículas suspendidas. Esto se debe al proceso físico que ocurre cuando las partículas suspendidas en el agua aprovechan para aglutinarse junto con los microorganismos presentes en el medio, principalmente bacterias y microalgas. A esto se suma que la floculación se incrementa por las secreciones de microorganismos filamentosos, señalización a través de quorum sensing o atracciones electrostáticas (Samocho, 2019; Crab *et al.*, 2012; Menaga *et al.*, 2019; Garibay-Valdez *et al.*, 2022). Este proceso puede ser promovido por un sustrato orgánico que funciona como nucleador y se ha utilizado una matriz orgánica, tales como salvado de trigo, amaranto y avena, permitiendo la floculación y ayudando a mantenerlos suspendidos en

el agua (Martínez-Córdova *et al.*, 2018b; Aparicio-Simón *et al.*, 2020; Crab *et al.*, 2012).

Por último, un aspecto importante que debe de ser considerado al trabajar con bioflóculos es la coloración del agua, ya que esto es un indicativo general de cuales comunidades microbianas predominan en ese momento. En este sentido, cuando la coloración del agua cambia de verde a café, esto indica una transición de un sistema dominado principalmente por microalgas a un sistema donde las bacterias terminan dominando (Ahmad *et al.*, 2017). Esto se utilizó como uno de los criterios para determinar la madurez de los bioflóculos en la semana seis en todos los tratamientos: picos de concentración de los compuestos nitrogenados, SS >10 ml/L y coloración del agua con tonalidades café (Emerenciano *et al.*, 2017; Hargreaves, 2013).

### **7.2.2. Clasificación Taxonómica de los Bioflóculos Maduros**

Con los datos provenientes de la secuenciación se llevó a cabo la clasificación taxonómica de las bacterias presentes en los bioflóculos maduros producidos en los tres tratamientos: AME, AMCI y AMC. Una gran similitud entre la composición de las comunidades bacterias de todos los tratamientos fue observada (Figura 10), lo que demuestra que los bioflóculos alcanzan cierta estabilidad taxonómica aun cuando este haya sido obtenido siguiendo diferentes protocolos (Luo *et al.*, 2020) y que son las condiciones ambientales las que establecen el perfil taxonómico; no obstante, la fuente de carbono orgánico también podría tener cierta influencia en la composición y abundancia de las comunidades bacterianas, especialmente en las nitrificantes (Zhao *et al.*, 2016). Del análisis anterior fueron identificados ciertos filos predominantes en los bioflóculos, donde destacan; Proteobacteria, Planctomycetes, Bacteroidetes, Chloroflexi, Actinobacteria, Firmicutes y Cyanobacteria, lo cual coincide con lo reportado por diversos autores como filos predominantes en los bioflóculos (Huang *et al.*, 2020; Dong *et al.*, 2022; Shang *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2017; Khanjani *et al.*, 2022; Peiro-Alcantar *et al.*, 2022; Vargas-Albores *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2019; Martins *et al.*, 2020), mismos que también son comunes en ambientes acuáticos, especialmente en condiciones donde abunda la materia orgánica y se da la presencia de partículas en suspensión, como en el caso de los sistemas BFT (Zhang *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2021).

El grupo bacteriano con mayor abundancia en los bioflóculos fue el de Proteobacterias, lo que era

de esperarse ya que este filo de bacterias usualmente es el más abundante en ambientes acuáticos, incluidos bioflóculos, biopelículas y sistemas de recirculación de agua (Martins *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2016). Además, en este filo están incluidas las bacterias nitrificantes como; *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrobacter*, entre otras (Pekkoh *et al.*, 2022; Satanwat *et al.*, 2020; Arp y Stein, 2003), las cuales están implicadas en el proceso de nitrificación como se observó a la semana seis en esta investigación. No obstante, existe evidencia que demuestra la existencia de otros grupos microbianos como las arqueas, organismos no estudiados en la presente investigación, que también podrían estar implicados en el metabolismo del nitrógeno (Bothe *et al.*, 2006), tanto en los proceso de nitrificación como desnitrificación, como es el caso de; *Achromobacter xylosoxidans* CF-S36 (Padhi y Maiti, 2017), *Agrobacterium* sp. LAD9 (Chen y Ni, 2012), *Alcaligenes faecalis*, cepa n° 4 (Joo *et al.*, 2005), *Bacillus*, cepa N31 (Huang *et al.*, 2017), *Enterobacter cloacae* CF-S27 (Padhi y Maiti, 2017), *Marinobacter* sp. NNA5 (Liu *et al.*, 2016), y *Pseudomonas stutzeri* (Takaya *et al.*, 2003).

En contra parte, los filos bacterianos con menor abundancia encontrados en los bioflóculos fueron; Verrucomicrobia, Dependientiae y Chlamydiae, cuya presencia también ha sido reportada en diferentes trabajos que involucran bioflóculos (Peiro-Alcantar *et al.*, 2022; Kathia *et al.*, 2018). Sin embargo, estas variaciones de abundancia de los filos menos representativos no parecen tener repercusiones negativas que afecten la estabilidad de los bioflóculos una vez que han alcanzado la madurez, aun cuando sea obtenido con diferentes fuentes de agua.

En cuanto al análisis taxonómico a nivel de familia durante esta misma fase, de los 47 grupos que fueron encontradas en total, quince de ellos estuvieron presentes en todos los tratamientos (Cuadro 2), donde destacaron las familias; Halomonadaceae, Rhodobacteraceae, Pirellulaceae, Phycisphaeraceae y Enterobacteriaceae, esta última en menor abundancia. Estos grupos bacterianos son habitantes comunes de ambientes acuáticos (Wang *et al.*, 2020; Pinoargote *et al.*, 2018; Brailo *et al.*, 2019; Rud *et al.*, 2017), incluidos los bioflóculos (Khanjani *et al.*, 2022), aun cuando este sea producido bajo diferentes condiciones de salinidad (Bo Zhang *et al.*, 2023). Además, por la capacidad de adaptación a condiciones de poca disponibilidad de nutrientes, Rhodobacteraceae es uno de los grupos bacterianos involucrados en las primeras etapas de la floculación (Xiaoli Zhang *et al.*, 2023). También participa en la degradación de compuestos orgánicos, incluidos los compuestos nitrogenados en el agua (Roquigny *et al.*, 2021). De igual manera, Pirellulaceae ha sido relacionada a la oxidación de amonio, aunque bajo condiciones

anaeróbicas (Kim *et al.*, 2021). Adicionalmente, Martins *et al.* (2020), reportaron que en los bioflóculos heterotróficos, la familia más abundante fue Rhodobacteraceae, y que algunos de sus miembros tiene la capacidad de inhibir a ciertas cepas de Vibrionaceae, lo que podría conferirles actividades antimicrobianas.

Por último, los análisis de alfa (Cuadro 4) y beta diversidad (Figura 16), corroboraron que, una vez que los bioflóculos han alcanzado la madurez, su composición taxonómica se vuelve estable y no se modifica aun cuando se haya obtenido con diferentes tratamientos de agua. Lo anterior corrobora que los bioflóculos pueden ser reconstituido independientemente del agua utilizada y sin necesidad de algún tratamiento de purificación. Estos resultados sugieren la importancia de mantener condiciones constantes en este tipo de sistemas, de tal manera que los organismos se vean beneficiados y la composición de los bioflóculos se mantengan constante.

### **7.2.3. Predicciones Funcionales de las Comunidades de los Bioflóculos Maduros**

Respecto a las predicciones funcionales de las comunidades bacterianas que conforman los bioflóculos durante la fase de maduración, el 74% fueron asociadas al metabolismo (Nivel L1) según la base de datos KEGG. Similarmente, algunas investigaciones con bioflóculos han reportado esta ruta metabólica como predominante: (Peiro-Alcantar *et al.*, 2022) ~ 80%, (Xiaoli Zhang *et al.*, 2023) 54.3 – 58.7%, (Vargas-Albores *et al.*, 2019) 50-53%, y (Zhang *et al.*, 2019). En cuanto al nivel KEGG-L2, las rutas relacionadas al metabolismo energético estuvieron presentes, así como otras más, lo cual fue esperado, ya que como en cualquier comunidad bacteriana, las interacciones entre los miembros que conforman los bioflóculos son diversas. En este sentido, las rutas metabólicas relacionadas al metabolismo del nitrógeno (KEEG-L3) estuvieron presentes, mismas que son de interés para este estudio por ser parte de los criterios de maduración (nitrificación-M00528-KEGG). Además, la presencia de las enzimas relacionadas al metabolismo del nitrógeno reveló parte de las rutas relacionadas con el nitrógeno.

### 7.3. Fase de Oxidación de Amonio

En esta fase experimental fue probada la capacidad funcional de los bioflóculos para oxidar amonio bajo condiciones controladas en un entorno sin organismos. La ausencia de animales permitió eliminar cualquier fuente externa de nitrógeno en el agua, incluyendo la excreción de amonio por parte de los organismos cultivados (Bartoli *et al.*, 2008), amonio proveniente de la descomposición de materia orgánica, alimento no consumido, e incluso animales muertos (Khodami *et al.*, 2011; Yun *et al.*, 2019). Esta información exploratoria pudiera representar un primer acercamiento en cuanto a una demostración cuantitativa de la eficiencia del proceso de maduración de los bioflóculos respecto a la dinámica del amonio (especialmente oxidación).

Los resultados muestran con claridad cómo el tratamiento con bioflóculos fue capaz de reducir la concentración de NAT a las 24 h en dos períodos consecutivos de tiempo (24 y 48 h), hasta niveles por debajo de la concentración inicial. En el caso de este estudio, el tiempo de oxidación de amonio fue menor respecto a lo reportado por otras investigaciones (Luo *et al.*, 2022; Adineh *et al.*, 2019; Boopathy *et al.*, 2015; Addo *et al.*, 2023). Esto permite inferir que el proceso de maduración al que fueron sometidos los bioflóculos ayudó a las comunidades bacterianas implicadas en el metabolismo del nitrógeno, bacterias nitrificantes principalmente a cumplir dicha función. En el tratamiento control, el cual no tuvo un proceso previo de maduración también hubo reducción de amonio, aunque menos eficiente en comparación con el tratamiento con bioflóculos, ya que la concentración de NAT siempre fue mayor al valor inicial en este tratamiento.

Esto tiene su lógica, ya que el agua de mar utilizada como control cuenta con su propia carga bacteriana nativa, donde seguramente hay bacterias con la capacidad de oxidar amonio (nitrificantes). Y ya que las bacterias nitrificantes son habitantes comunes de muchos entornos incluidos el agua de mar, agua dulce, entornos marinos hipersalinos, suelo y subsuelo (Zorz *et al.*, 2018; Daims *et al.*, 2016), al presentarse condiciones favorables para el crecimiento de las bacterias nitrificantes, como presencia de amonio, estas lo utilizaron de sustrato y por consiguiente, se da una reducción de amonio. Sin embargo, la falta de un proceso de maduración dio como resultado una menor eficiencia en el tratamiento control respecto al tratamiento con bioflóculos.

### 7.3.1. Clasificación Taxonómica de los Bioflóculos Maduros Durante la Fase de Oxidación de Amonio

La clasificación taxonómica de las comunidades bacterianas a las 0, 24 y 48 h mostró que siete filos fueron los más abundantes, representando el 97 % del total. Similarmente a lo ocurrido en la etapa previa de maduración, durante la fase de oxidación de amonio el filo de Proteobacterias fue el más abundante, lo que fue un resultado esperado, ya que este grupo de bacteria está habitualmente está presente en bioflóculos (Huang *et al.*, 2022; Addo *et al.*, 2021) y, además, Proteobacterias cuentan con miembros capaces de reciclar nutrientes en los sistemas de acuicultura (Addo *et al.*, 2023). No obstante, a pesar de que las proteobacterias disminuyeron en abundancia a las 24 y 48 h respecto a las 0 h, esto no impactó negativamente a los bioflóculos durante el proceso de oxidación de amonio.

Para el caso de los filos Planctomycetes, Actinobacterias, Firmicutes y Chloroflexi, estos aumentaron a las 24 y 48 h respecto al tiempo inicial. En el caso de las primeras, estas son bacterias con propiedades poco comunes como la compartición celular entre diversas especies y fisiología única para algunos individuos de este grupo. Además, son productores de enzimas, lípidos como los esteroides, ácidos grasos de cadena larga, y también están implicados en procesos de biorremediación a escala industrial, especialmente en condiciones de anammox (Fuerst, 2017; Prosser, 2007; Jianhua Wu *et al.*, 2022; Pang *et al.*, 2023). También, biotecnológicamente las bacterias que pertenecen al filo Planctomycetes son importantes por estar implicadas en el ciclo del carbono y nitrógeno, (Wiegand *et al.*, 2018), además de ser habitantes comunes de ambientes acuáticos (Podosokorskaya *et al.*, 2022) y en los bioflóculos (Kumar *et al.*, 2018; Martínez-Córdova *et al.*, 2018a; Khanjani *et al.*, 2022). Por su relación en el ciclo del nitrógeno, la presencia y aumento de abundancia de los Planctomycetes resultó favorable durante la fase de oxidación de amonio.

En cuanto a la abundancia del filo Actinobacteria, este es un grupo, ampliamente distribuido tanto en ambientes acuáticos, (incluidos sistemas el BFT) (Ferreira *et al.*, 2021) como terrestres. Los miembros de este filo presentan una gran diversidad de propiedades morfológicas, fisiológicas y quimiotaxonómicas (Lawson, 2018). Además, están implicados tanto en el proceso de nitrificación como de desnitrificación (Zhang *et al.*, 2021). Algunos de sus miembros tienen implicaciones en

funciones biológicas importantes (Goodfellow y Williams, 1983). En este grupo pueden ser encontrados cepas probióticas potencialmente útiles para la acuicultura (Schleder *et al.*, 2020), además, son productores potenciales de sustancias antibacterianas antagonistas de *Vibrio* (Dong *et al.*, 2021). Por otro lado, son productores de una gran cantidad de enzimas hidrolíticas, amilolíticas, celulolíticas, hidrolizantes de nitrilos, lipolíticas, proteolíticas, quitinasa y quitinolíticas (Das *et al.*, 2008). Por todo lo anterior, la presencia de este grupo de bacterias resulta sumamente benéfico para los bioflóculos, principalmente por su posible implicación en el metabolismo del nitrógeno, aspecto de estudio en esta investigación.

Otro grupo presente durante esta fase del bioensayo fueron los Firmicutes, el cual, además de ser un filo con miembros relacionados con la floculación y por tanto, tener la capacidad de acelerar la formación del bioflóculos (Meng *et al.*, 2023), también han sido relacionado con la degradación de nitrógeno (Shitu *et al.*, 2022); adicionalmente, algunos de sus miembros pudieran tener implicaciones en otros procesos como el uso de aminos (Zhao *et al.*, 2022).

En cuanto a la clasificación taxonómica, pero a nivel de familia, se encontró que Methyloligellaceae, Enterobacteriaceae, Pirellulaceae y Rhodobacteraceae fueron de las familias predominantes, lo cual no resulta extraño ya que estas familias pertenecen al filo de las Proteobacterias (Schveitzer *et al.*, 2020; Rud *et al.*, 2017), filo más abundante en la fase de oxidación de amonio. Algunas bacterias de la familia Methyloligellaceae están relacionado al ciclo del metano (Begmatov *et al.*, 2021), el cual es el producto final de la descomposición microbiana de materia orgánica en condiciones anaeróbicas, y puede acumularse tanto en agua dulce como agua de mar (Conrad, 2009). También, están involucradas en la solubilización para la fijación del fosforo y nitrógeno (Zhang *et al.*, 2022) y la biodegradación de poliestireno (Liu *et al.*, 2023).

Enterobacteriaceae, es una familia ampliamente distribuida en ambientes acuáticos, suelos, alimentos e incluso, tracto intestinal de animales, donde algunos de estos miembros pueden reducir los nitratos a nitritos (Addo *et al.*, 2021). A pesar de que en la familia Enterobacteriaceae existen bacterias patógenas, estas podrían ser inhibidas por otras bacterias que conforman los bioflóculos y que tienen capacidad antibacteriana.

Las bacterias pertenecientes a la familia Rhodobacteraceae tienen gran capacidad de adaptación en ambientes con variación de salinidad (Bo Zhang *et al.*, 2023), así como un papel probiótico y antagonismo con *Vibrio* (Dong *et al.*, 2023). Por otro lado, es común encontrar la presencia de bacterias pertenecientes a la familia Pirellulaceae en los bioflóculos (Brailo *et al.*, 2019; Kim *et al.*,



2021; Peiro-Alcantar *et al.*, 2022) tal como ocurrió en el presente trabajo. Esta familia pertenece al filo Planctomycetes, segundo filo más abundante en la fase de oxidación de amonio. Se ha reportado previamente que esta familia está relacionada con la oxidación de amonio (anaerobia) (Roquigny *et al.*, 2021).

Otra familia presente, aunque en menor abundancia fue Sphingomonadaceae, la cual está asociada a la transformación de nitrógeno (N) y fósforo (P) (Kumwimba *et al.*, 2023).

En cuanto a los análisis de alfa y beta diversidad, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos respecto a la composición de las comunidades bacterianas durante la fase de oxidación de amonio (Figura 20). Esto podría sugerir que, a pesar de las variaciones en cuanto a la abundancia bacteriana que ocurrió en esta fase, a 0, 24 y 48 h, los procesos relacionados al metabolismo del nitrógeno sí se llevaron a cabo. Lo anterior fue corroborado a través de la medición de las concentraciones de amonio.

### **7.3.2. Predicciones Funcionales**

Las predicciones funcionales de los consorcios bacterianos de los bioflóculos, en el ensayo de oxidación del amonio fueron muy similares a las observadas durante la fase de maduración. A nivel KEEG-L1, las rutas asociadas al metabolismo predominaron, en el siguiente nivel (L2) fueron encontradas rutas relacionadas al metabolismo energético y, en menor abundancia, rutas metabólicas L3 pertenecientes al metabolismo del nitrógeno, que fueron las rutas de interés para este estudio. En lo referente a esta última ruta metabólica L3, durante esta fase experimental fue corroborado que los bioflóculos contenían microorganismos con la capacidad de oxidar el amonio (Figura 17). Además de dicha comprobación cuantitativa, la presencia e identificación de las enzimas involucradas en el metabolismo del nitrógeno (Cuadro 7), permitió corroborar que dichos procesos fueron llevados a cabo. Esto coincide con lo reportado por algunos autores respecto a las enzimas involucradas en diferentes procesos del metabolismo del nitrógeno (Wei *et al.*, 2020; Brailo *et al.*, 2019; Meng *et al.*, 2023; Meng *et al.*, 2020; Beeckman *et al.*, 2018).

Si bien la capacidad de los bioflóculos para oxidar amonio en 24 h fue comprobada, es importante señalar que en un sistema de bioflóculos donde se trabaje con organismos cultivados (*in-situ*), la

oxidación de amonio podría ser más tardada debido al aporte constante de amonio de los mismos organismos (alimento no consumido, etcétera). No obstante, eventualmente los bioflóculos deberían de ser capaces de reducir la concentración de amonio en el estanque, ya sea tanto por la oxidación del amonio como por la conversión directa de amonio en biomasa bacteriana.

Por otra parte, un aspecto que llamó la atención con el análisis de PICRUST2 fue el resto de las rutas metabólicas que estuvieron presentes durante esta fase del bioensayo, ya que el análisis no es exclusivo al metabolismo del nitrógeno. En este sentido, se visualizaron las funciones que estuvieron presentes a las 0, 24 y 48 h, donde curiosamente, el tiempo cero fue diferente a las 24 y 48 h. Esto podría indicar que en los bioflóculos se favorecen bacterias cuyos genomas cuentan con diferentes rutas metabólicas una vez que las condiciones del medio cambian, en este caso con la adición de amonio.

Interesantemente, de las 142 funciones encontradas, 38 de ellas mostraron un comportamiento particular por ser tanto favorecidas como reducidas en un 20%. De éstas, el 50 % de las funciones estuvieron centradas en tres rutas L2; biodegradación y metabolismo de xenobióticos, metabolismo de carbohidratos y metabolismo de terpenoides y policétidos. El hecho de encontrar funciones que fueron tanto favorecidas como reducidas tanto a las 24 como 48 h (Cuadro 12), pudiera indicar en cierta medida que los bioflóculos trabajan bajo diferentes condiciones a nivel funcional, pero, también, sugiere la complejidad de las redes metabólicas de los bioflóculos, ya que la reducción de ciertas rutas no necesariamente implica que estas no vuelvan a activarse. Por último, a pesar de que las rutas relacionadas al metabolismo de nitrógeno no figuraron entre las 38 funciones favorecidas como reducidas a las 24 y 48 h, esto no fue impedimento para que dichos procesos relacionados al nitrógeno fueran llevados a cabo, tal como fue corroborado en la fase de oxidación de amonio.

## 8. CONCLUSIONES

El uso de bioflóculos en el cultivo de camarón blanco (*L. vannamei*) en el bioensayo #1 mejoró los parámetros de producción, no generó aguas de desecho y aumentó la sobrevivencia respecto al control sin recambio de agua.

En el bioensayo #2, el uso de un consorcio iniciador en forma de liofilizado y la adición de una matriz orgánica (salvado de trigo) permitió iniciar el proceso de floculación desde la semana uno. Las comunidades bacterianas predominantes en los bioflóculos maduros a nivel de filo fueron; Proteobacteria, Planctomycetes, Bacteroidetes, Chloroflexi, Actinobacteria, Firmicutes y Cyanobacteria.

En los tres tratamientos de bioflóculos maduros predominaron las rutas KEGG-L1 relacionadas al metabolismo (74%), procesamiento de información genética (12%), procesos celulares (5%) y otros de menor abundancia.

La oxidación de NAT fue llevada a cabo en 24 h por los bioflóculos madurados con una tasa de reducción de hasta 0.24 mg/L de NAT/h.

La oxidación de NAT fue relacionada a los grupos bacterianos más abundantes durante la fase de oxidación de amonio: Proteobacteria (56.64%), Planctomycetes (20.11%), Actinobacteria (5.86%) y Firmicutes (4.93%).

En la fase de oxidación de amonio, a nivel L2 (metabolismo energético), un total de 142 funciones metabólicas (L3) fueron encontradas, 38 de ellas modificaron su abundancia a las 24 y 48 h posterior a la adición de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

## 9. REFERENCIAS

- Abakari G., Luo G, Kombat EO. 2021. Dynamics of nitrogenous compounds and their control in biofloc technology (BFT) systems: A review. *Aquaculture and Fisheries*. 6(5): 441-447.
- Abakari G., Wu X., He X., Fan L, Luo G. 2022. Bacteria in biofloc technology aquaculture systems: roles and mediating factors. *Reviews in Aquaculture*. 14(3): 1260-1284.
- Abdollahi-Arpanahi D., Soltani E., Jafaryan H., Soltani M., Naderi-Samani M, Campa-Córdova AI. 2018. Efficacy of two commercial and indigenous probiotics, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth performance, immuno-physiology and resistance response of juvenile white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*. 496(1): 43-49.
- Addo FG., Zhang S., Manirakiza B., Ma Y., Yuan S., Alklaf SA., Guo S, Abakari G. 2023. Brown sugar addition enhanced nutrient removal rates, growth performance, and bacterial community in a rice straw-based biofloc shrimp culture system. *Aquaculture*. 567739274.
- Addo FG., Zhang S., Manirakiza B., Ohore OE, Shudong Y. 2021. The impacts of straw substrate on biofloc formation, bacterial community and nutrient removal in shrimp ponds. *Bioresour Technol*. 326124727.
- Adineh H., Naderi M., Khademi Hamidi M, Harsij M. 2019. Biofloc technology improves growth, innate immune responses, oxidative status, and resistance to acute stress in common carp (*Cyprinus carpio*) under high stocking density. *Fish Shellfish Immunol*. 95440-448.
- AftabUddin S., Siddique MAM., Sein A., Dey PK., Rashed-Un-Nabi M, Haque MA. 2020. First use of biofloc technology for *Penaeus monodon* culture in Bangladesh: Effects of stocking density on growth performance of shrimp, water quality and bacterial growth. *Aquaculture Reports*. 18100518.
- Aguilera-Rivera D., Prieto-Davó A., Escalante K., Chávez C., Cuzon G, Gaxiola G. 2014. Probiotic effect of floc on *Vibrios* in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 424-425215-219.
- Ahmad I., Rani AMB., Verma AK, Maqsood M. 2017. Biofloc technology: an emerging avenue in aquatic animal healthcare and nutrition. *Aquaculture International*. 25(3): 1215-1226.
- Ahmad S, Z. N., Che Engku Chik CEN., Hossain S., Othman R., Endut A., Lananan F., Terkula IB., Kamaruzzan AS., Abdul Rahim AI., Draman AS, Kasan NA. 2022. A novel study on the effectiveness of bioflocculant-producing bacteria *Bacillus enclensis*, isolated from biofloc-based system as a biodegrader in microplastic pollution. *Chemosphere*. 308(Pt 2): 136410.
- Ali H., Rico A., Murshed-e-Jahan K, Belton B. 2016. An assessment of chemical and biological product use in aquaculture in Bangladesh. *Aquaculture*. 454199-209.
- Alzate Marin JC., Caravelli AH, Zaritzky NE. 2016. Nitrification and aerobic denitrification in anoxic-aerobic sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*. 200380-387.
- Amenyogbe E., Chen G., Wang Z., Huang J., Huang B, Li H. 2020. The exploitation of probiotics, prebiotics and synbiotics in aquaculture: present study, limitations and future directions: a

review. *Aquaculture International*. 28(3): 1017-1041.

- An G., Yan R., Fu Z., Chen Z., Guo Y., Yang J, Zhou Y. 2023. Adaptation of anammox consortia in microbial fuel cell to low temperature: Microbial community and predictive functional profiling. *Bioresour Technol*. 370128565.
- Aparicio-Simón B., Real-Moreno E., Espinosa-Chaurand D., García-Morales R., Garza-Torres R., Cortés-Sánchez AdJ., Lora-Sanchez D, Maeda-Martínez AN. 2020. Giant bladder kelp (*Macrocystis pyrifera*) and maize (*Zea mays*) meals as nucleation sites for biofloc formation. *Aquaculture Reports*. 16100289.
- Apprill A., McNally S., Parsons R, Weber L. 2015. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*. 75(2): 129-137.
- Arp DJ, Stein LY. 2003. Metabolism of inorganic N compounds by ammonia-oxidizing bacteria. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 38(6): 471-495.
- Avnimelech Y. 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bioflocs technology ponds. *Aquaculture*. 264(1-4): 140-147.
- Avnimelech Y. 2009. Biofloc technology: A practical guide book, World Aquaculture Society, Baton Rouge, 182.
- Badiola M., Mendiola D, Bostock J. 2012. Recirculating Aquaculture Systems (RAS) analysis: Main issues on management and future challenges. *Aquacultural Engineering*. 5126-35.
- Barbieri E, Bondioli ACV. 2015. Acute toxicity of ammonia in Pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) at different temperatures levels. *Aquaculture Research*. 46(3): 565-571.
- Bartoli M., Nizzoli D., Castaldelli G, Vialroli P. 2008. Community metabolism and buffering capacity of nitrogen in a *ruppia cirrhosa* meadow. *J Exp Mar Biol Ecol*. 360(1): 21-30.
- Beeckman F., Motte H, Beeckman T. 2018. Nitrification in agricultural soils: impact, actors and mitigation. *Current opinion in biotechnology*. 50166-173.
- Begmatov S., Savvichev AS., Kadnikov VV., Beletsky AV., Rusanov II., Klyuvitkin AA., Novichkova EA., Mardanov AV., Pimenov NV, Ravin NV. 2021. Microbial communities involved in methane, sulfur, and nitrogen cycling in the sediments of the Barents Sea. *Microorganisms*. 9(11): 2362.
- Bolyen E., Rideout JR., Dillon MR., Bokulich NA., Abnet C., Al-Ghalith GA., Alexander H., Alm EJ., Arumugam M, Asnicar F. 2018. QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science. PeerJ Preprints.
- Boopathy R., Kern C, Corbin A. 2015. Use of Bacillus consortium in waste digestion and pathogen control in shrimp aquaculture. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 102159-164.
- Bothe H., Ferguson S, E. NW. 2006. Biology of nitrogen cycle, Amsterdam,
- Bou G., Fernández-Olmos A., García C., Sáez-Nieto JA, Valdezate S. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 29(8): 601-608.

- Braga A., Lopes DLA., Magalhaes V., Poersch LH, Wasielesky W. 2015. Use of biofloc technology during the pre-maturation period of *Litopenaeus vannamei* males: effect of feeds with different protein levels on the spermatophore and sperm quality. *Aquaculture Research*. 46(8): 1965-1973.
- Brailo M., Schreier HJ., McDonald R., Marši-Lui J., Gavrilovi A., Pearevi M, Jug-Dujakovi J. 2019. Bacterial community analysis of marine recirculating aquaculture system bioreactors for complete nitrogen removal established from a commercial inoculum. *Aquaculture*. 503198-206.
- Cadena-Zamudio J., Martínez-Peña M., Guzmán-Rodríguez L., Arteaga-Garibay R, De Morelos T. 2016. Aplicación de secuenciación masiva para el estudio y exploración de diversidad microbiana y su aprovechamiento biotecnológico. *Agroproductividad*. 9(2): 70-83.
- Calvó-Perxas L. 2005 A study on the phylogeny and the ecology of ammonia-oxidizing bacteria using a new molecular marker based on the gene AMOB. (ed by Girona Ud).
- Callahan BJ., McMurdie PJ., Rosen MJ., Han AW., Johnson AJA, Holmes SP. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*. 13(7): 581-583.
- Camargo JA., Alonso A, Salamanca A. 2005. Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere*. 581255-1267.
- Cantoral A., Batis C, Basu N. 2017. National estimation of seafood consumption in Mexico: Implications for exposure to methylmercury and polyunsaturated fatty acids. *Chemosphere*. 174289-296.
- Ciji A., Sahu NP., Pal AK., Dasgupta S, Akhtar MS. 2012. Alterations in serum electrolytes, antioxidative enzymes and haematological parameters of *Labeo rohita* on short-term exposure to sublethal dose of nitrite. *Fish Physiology and Biochemistry*. 381355-1365.
- Collazos-Lasso LF, Arias-Castellanos JA. 2015. Fundamentos de la tecnología biofloc (BFT). Una alternativa para la piscicultura en Colombia. Una revisión. *Orinoquia*. 19(1).
- Conrad R. 2009. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environ Microbiol Rep*. 1(5): 285-292.
- Conthe M., Lycus P., Arntzen MO., Ramos da Silva A., Frostegard A., Bakken LR., Kleerebezem R, van Loosdrecht MCM. 2019. Denitrification as an N<sub>2</sub>O sink. *Water research*. 151381-387.
- Crab R., Chielens B., Wille M., Bossier P, Verstraete W. 2010. The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. *Aquaculture Research*. 41(4): 559-567.
- Crab R., Defoirdt T., Bossier P, Verstraete W. 2012. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*. 356-357351-356.
- Crispim M., Vieira A., Coelho S, Medeiros A. 2009. Nutrient uptake efficiency by macrophyte and biofilm: practical strategies for small-scale fish farming. *Acta limnologica brasiliensia*. 21(4): 387-391.
- Cuadra JMMH. 2017. Filogenia bacteriana mediante el análisis del rRNA 16S.

- Chen Q, Ni. 2012. Ammonium removal by *Agrobacterium* sp. LAD9 capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification. *J. Biosci. Bioeng.* 113619-623.
- Chen X., Luo G., Meng H, Tan H. 2019. Effect of the particle size on the ammonia removal rate and the bacterial community composition of bioflocs. *Aquacultural Engineering.* 86102001.
- Cheng S-Y, Chen J-C. 1999. Hemocyanin oxygen affinity, and the fractionation of oxyhemocyanin and deoxyhemocyanin for *Penaeus monodon* exposed to elevated nitrite. *Aquatic Toxicology.* 45(1): 35-46.
- Cheng S-Y, Chen J-C. 2002a. Joint action of elevated ambient nitrite and nitrate on hemolymph nitrogenous compounds and nitrogen excretion of tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.* 131(3): 303-314.
- Cheng S-Y, Chen J-C. 2002b. Study on the oxyhemocyanin, deoxyhemocyanin, oxygen affinity and acid–base balance of *Marsupenaeus japonicus* following exposure to combined elevated nitrite and nitrate. *Aquatic Toxicology.* 61(3-4): 181-193.
- Cheng S-Y., Shieh L-W, Chen J-C. 2013. Changes in hemolymph oxyhemocyanin, acid–base balance, and electrolytes in *Marsupenaeus japonicus* under combined ammonia and nitrite stress. *Aquatic Toxicology.* 130-131132-138.
- D'Onofrio A., Crawford JM., Stewart EJ., Witt K., Gavrish E., Epstein S., Clardy J, Lewis K. 2010. Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria. *Chem Biol.* 17(3): 254-264.
- da Paz Serra F., Wasielesky W, Abreu PC. 2021. Nitrogen salt fertilization vs. substrate availability: Two strategies to improve nitrification during the production of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture.* 543736997.
- Daims H., Lucker S, Wagner M. 2016. A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria. *Trends Microbiol.* 24(9): 699-712.
- Dalsgaard J., Lund I., Thorarinsdottir R., Drengstig A., Arvonen K, Pedersen PB. 2013. Farming different species in RAS in Nordic countries: Current status and future perspectives. *Aquacultural Engineering.* 532-13.
- Das S., Ward LR, Burke C. 2008. Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 81(3): 419-429.
- Dash P., Tandel RS., Bhat RAH., Mallik S., Pandey NN., Singh AK, Sarma D. 2018. The addition of probiotic bacteria to microbial floc: Water quality, growth, non-specific immune response and disease resistance of *Cyprinus carpio* in mid-Himalayan altitude. *Aquaculture.* 495961-969.
- Dauda AB. 2020. Biofloc technology: a review on the microbial interactions, operational parameters and implications to disease and health management of cultured aquatic animals. *Reviews in Aquaculture.* 12(2): 1193-1210.
- Dauda AB., Ajadi A., Tola-Fabunmi AS, Akinwale AO. 2019. Waste production in aquaculture: Sources, components and managements in different culture systems. *Aquaculture and Fisheries.* 4(3): 81-88.

- de Melo Filho MES., Owatari MS., Mouriño JLP., Lapa KR, Soares HM. 2020. Application of nitrification and denitrification processes in a direct water reuse system for pacific white shrimp farmed in biofloc system. *Aquacultural Engineering*. 88102043.
- De Schryver P., Crab R., Defoirdt T., Boon N, Verstraete W. 2008. The basics of bioflocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture Research*. 277 (3): 125-137.
- de Souza Valente C., Rodiles A., Freire Marques MR, Merrifield DL. 2020. White spot syndrome virus (WSSV) disturbs the intestinal microbiota of shrimp (*Penaeus vannamei*) reared in biofloc and clear seawater. *Appl Microbiol Biotechnol*. 104(18): 8007-8023.
- del Rosario Rodicio M, del Carmen Mendoza M. 2004. Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: principles, methods and applications in clinical microbiology. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 22(4): 238-245.
- Deng M., Chen JY., Gou JW., Hou J., Li DP, He XG. 2018. The effect of different carbon sources on water quality, microbial community and structure of biofloc systems. *Aquaculture*. 482103-110.
- Desa U. 2019. World population prospects 2019: Highlights. *New York (US): United Nations Department for Economic and Social Affairs*.
- Di Capua F., Pirozzi F., Lens PNL, Esposito G. 2019. Electron donors for autotrophic denitrification. *Chemical Engineering Journal*. 362922-937.
- Dong P., Guo H., Huang L., Zhang D, Wang K. 2023. Glucose addition improves the culture performance of Pacific white shrimp by regulating the assembly of Rhodobacteraceae taxa in gut bacterial community. *Aquaculture*. 567739254.
- Dong P., Guo H., Wang Y., Wang R., Chen H., Zhao Y., Wang K, Zhang D. 2021. Gastrointestinal microbiota imbalance is triggered by the enrichment of *Vibrio* in subadult *Litopenaeus vannamei* with acute hepatopancreatic necrosis disease. *Aquaculture*. 533736199.
- Dong S., Li Y., Huang F., Lin L., Li Z., Li J., Zhang Y, Zheng Y. 2022. Enhancing effect of *Platymonas* addition on water quality, microbial community diversity and shrimp performance in biofloc-based tanks for *Penaeus vannamei* nursery. *Aquaculture*. 554738057.
- Dos Santos Silva MJ., da Costa FFB., Leme FP., Takata R., Costa DC., Mattioli CC., Luz RK, Miranda-Filho KC. 2018. Biological responses of neotropical freshwater fish *Lophiosilurus alexandri* exposed to ammonia and nitrite. *The Science of the total environment*. 616-6171566-1575.
- Douglas GM., Maffei VJ., Zaneveld JR., Yurgel SN., Brown JR., Taylor CM., Huttenhower C, Langille MG. 2020. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature biotechnology*. 38(6): 685-688.
- Duan Y., Zhang Y., Dong H., Wang Y, Zhang J. 2017. Effect of the dietary probiotic *Clostridium butyricum* on growth, intestine antioxidant capacity and resistance to high temperature stress in kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Journal of thermal biology*. 6693-100.
- Ducret A., Chabaliere M, Dukan S. 2014. Characterization and resuscitation of 'non-culturable' cells of *Legionella pneumophila*. *BMC microbiology*. 141-10.
- Durigon EG., Lazzari R., Uczay J., Lopes DLdA., Jerônimo GT., Sgnaulin T, Emerenciano MGC.



2020. Biofloc technology (BFT): Adjusting the levels of digestible protein and digestible energy in diets of Nile tilapia juveniles raised in brackish water. *Aquaculture and Fisheries*. 5(1): 42-51.
- Eayrs S. 2007. Guía para reducir la captura de fauna incidental (*bycatch*) en las pesquerías por arrastre de camarón tropical, Fao,
- Ebeling JM., Timmons MB, Bisogni J. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*. 257(1-4): 346-358.
- Edwards P. 2015. Aquaculture environment interactions: past, present and likely future trends. *Aquaculture*. 4472-14.
- Ekasari J., Rivandi DR., Firdausi AP., Surawidjaja EH., Zairin M., Bossier P, De Schryver P. 2015. Biofloc technology positively affects Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae performance. *Aquaculture*. 44172-77.
- Emerenciano M., Ballester ELC., Cavalli RO, Wasielesky W. 2011. Effect of biofloc technology (BFT) on the early postlarval stage of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*: growth performance, floc composition and salinity stress tolerance. *Aquaculture International*. 19(5): 891-901.
- Emerenciano MGC., Martínez-Córdova LR., Martínez-Porchas M, Miranda-Baeza A. 2017 Biofloc technology (BFT): a tool for water quality management in aquaculture. In: *Water Quality*. InTech.
- Ferreira GS., Bolívar NC., Pereira SA., Guertler C., Vieira FdN., Mouriño JLP, Seiffert WQ. 2015. Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 448273-279.
- Ferreira GS., Santos D., Schmachtl F., Machado C., Fernandes V., Bögner M., Schleder DD., Seiffert WQ, Vieira FN. 2021. Heterotrophic, chemoautotrophic and mature approaches in biofloc system for Pacific white shrimp. *Aquaculture*. 533736099.
- Ferreira GS., Silva VF., Martins MA., da Silva ACCP., Machado C., Seiffert WQ, do Nascimento Vieira F. 2020. Strategies for ammonium and nitrite control in *Litopenaeus vannamei* nursery systems with bioflocs. *Aquacultural Engineering*. 88102040.
- Finlay JC., Small GE, Sterner R. 2013. Human influences on nitrogen removal in lakes. *Science*. 342247-250.
- Flores JL., González EM, Prado PD. 2007. Puntos críticos en la evaluación de impacto ambiental de la camaronicultura en el Pacífico de Nicaragua, durante su proceso productivo: Producción de larvas, operación y abandono de Granjas. *Universitas (León): Revista Científica de la UNAN León*. 1(1): 33-38.
- Foale S., Adhuri D., Aliño P., Allison EH., Andrew N., Cohen P., Evans L., Fabinyi M., Fidelman P, Gregory C. 2013. Food security and the Coral Triangle initiative. *Marine Policy*. 38174-183.
- Fuerst JA. 2017 Planctomycetes—new models for microbial cells and activities. In: *Microbial resources*. Elsevier, pp. 1-27.

- Furtado PS., Campos BR., Serra FP., Klosterhoff M., Romano LA, Wasielesky W. 2014. Effects of nitrate toxicity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared with biofloc technology (BFT). *Aquaculture International*. 23(1): 315-327.
- Gallardo-Collí A., Pérez-Rostro CI, Hernández-Vergara MP. 2019. Reuse of water from biofloc technology for intensive culture of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): effects on productive performance, organosomatic indices and body composition. *International Aquatic Research*. 11(1): 43-55.
- Gaona CAP., Serra FdP., Furtado PS., Poersch LH, Wasielesky W. 2016. Biofloc management with different flow rates for solids removal in the *Litopenaeus vannamei* BFT culture system. *Aquaculture International*. 24(5): 1263-1275.
- García-Ríos L., Miranda-Baeza A., Coelho-Emerenciano MG., Huerta-Rábago JA, Osuna-Amarillas P. 2019. Biofloc technology (BFT) applied to tilapia fingerlings production using different carbon sources: Emphasis on commercial applications. *Aquaculture*. 50226-31.
- García-Sánchez JE., García-Sánchez E., Martín-del-Rey Á, García-Merino E. 2015. Las bacterias anaerobias 150 años después de su descubrimiento por Pasteur. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 33(2): 119-128.
- Garibay-Valdez E., Martínez-Córdova LR., Vargas-Albores F., Emerenciano MG., Miranda-Baeza A., Cortés-Jacinto E., Ortiz-Estrada ÁM., Cicala F, Martínez-Porchas M. 2022. The biofouling process: The science behind a valuable phenomenon for aquaculture. *Reviews in Aquaculture*.
- Ge S., Wang S., Yang X., Qiu S., Li B, Peng Y. 2015. Detection of nitrifiers and evaluation of partial nitrification for wastewater treatment: A review. *Chemosphere*. 14085-98.
- Ghannam RB, Techtmann SM. 2021. Machine learning applications in microbial ecology, human microbiome studies, and environmental monitoring. *Comput Struct Biotechnol J*. 191092-1107.
- Ghazanfar S., Azim A., Ghazanfar MA., Anjum M, Begum I. 2010. Metagenomics and its application in soil microbial community studies: biotechnological prospects. *Journal of Animal & Plant Sciences*. 6(2): 611-622.
- Giatsis C., Sipkema D., Smidt H., Heilig H., Benvenuti G., Verreth J, Verdegem M. 2015. The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. *Scientific Reports*. 518206.
- Gibbs MT. 2007. Sustainability performance indicators for suspended bivalve aquaculture activities. *Ecological indicators*. 7(1): 94-107.
- Gonzalez-Ruiz R., Granillo-Luna ON., Peregrino-Uriarte AB., Gomez-Jimenez S, Yepiz-Plascencia G. 2020. Mitochondrial manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular characterization and effect of high temperature, hypoxia and reoxygenation on expression and enzyme activity. *J Therm Biol*. 88102519.
- Goodfellow M, Williams S. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annual review of microbiology*. 37(1): 189-216.
- Greaves Fernández N. 2015. La acuicultura: una alternativa para garantizar una seguridad

alimentaria sustentable. *Hospitalidad ESDAI*. (28): 61-78.

- Green GBH., DePaola A., Linville JG., Morrow CD, Bej AK. 2023a. High-throughput amplicon sequencing datasets of coastal sediments from three locations of the Gulf of Mexico, USA. *Data Brief*. 47108895.
- Green GBH., Williams MB., Chehade SB., Flowers JT., Morrow CD., Lawrence AL., Bej AK, Watts SA. 2023b. Body metrics and the gut microbiome in response to macronutrient limitation in the Zebrafish *Danio rerio*. *Current Developments in Nutrition*. 7(4): 100065.
- Gullian-Klanian M., Quintanilla-Mena M, Hau CP. 2023. Influence of the biofloc bacterial community on the digestive activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 562738774.
- Hai NV. 2015. The use of probiotics in aquaculture. *J Appl Microbiol*. 119(4): 917-935.
- Hamidoghli A., Yun H., Shahkar E., Won S., Hong J, Bai SC. 2018. Optimum dietary protein-to-energy ratio for juvenile whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in a biofloc system. *Aquaculture Research*. 49(5): 1875-1886.
- Hamlin HJ. 2006. Nitrate toxicity in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *Aquaculture*. 253688-693.
- Hargreaves JA. 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacultural Engineering*. 34(3): 344-363.
- Hargreaves JA. 2013. Biofloc production systems for aquaculture. In: *Southern Regional Aquaculture Center*, Stoneville, MS, USA., pp. 1-11.
- Hegazi MM., Attia ZI., Hegazi MAM, Hasanein SS. 2010. Metabolic consequences of chronic sublethal ammonia exposure at cellular and subcellular levels in Nile tilapia brain. *Aquaculture*. 299(1-4): 149-156.
- Henriksson PJG., Belton B., Murshed-e-Jahan K, Rico A. 2018. Measuring the potential for sustainable intensification of aquaculture in Bangladesh using life cycle assessment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 115(12): 2958-2963.
- Hernández-León R., Velázquez-Sepúlveda I., Orozco-Mosqueda M, Santoyo G. 2010. Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Phyton (Buenos Aires)*. 79(2): 133-139.
- Hernández-López J, Vargas-Albores F. 2003. A microplate technique to quantify nutrients ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{PO}_4^{3-}$ ) in seawater. *Aquaculture Research*. 34(13): 1201-1204.
- Hernández-Mancipe LE., Londoño-Velez JI., Hernández-García KA, Torres-Hernández L-C. 2019. The biofloc systems: an efficient strategy in the aquaculture production. *CES. Medicina veterinaria zootecnia*. 14(1): 70-99.
- Holt CC., Bass D., Stentiford GD, van der Giezen M. 2021. Understanding the role of the shrimp gut microbiome in health and disease. *J Invertebr Pathol*. 186107387.
- Hosain ME., Amin SMN., Kamarudin MS., Arshad A., Karim M, Romano N. 2021. Effect of salinity on growth, survival, and proximate composition of *Macrobrachium rosenbergii* post larvae as well as zooplankton composition reared in a maize starch based biofloc system. *Aquaculture*. 533736235.

- Hostins B., Wasielesky W., Decamp O., Bossier P, De Schryver P. 2019. Managing input C/N ratio to reduce the risk of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) outbreaks in biofloc systems – A laboratory study. *Aquaculture*. 50860-65.
- Hu Z., Lee JW., Chandran K., Kim S., Sharma K., Brotto AC, Khanal SK. 2013. Nitrogen transformations in intensive aquaculture system and its implication to climate change through nitrous oxide emission. *Bioresource Technology*. 130314-320.
- Huang F., Pan LQ., Lv N, Tang XM. 2017. Characterization of novel *Bacillus* strain N31 from mariculture water capable of halophilic heterotrophic nitrification-aerobic denitrification. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 124(5): 564-571.
- Huang H-H., Li C-Y., Lei Y-J., Kuang W-Q., Zou W-S, Yang P-H. 2022. Bacterial composition and inferring function profiles in the biofloc system rearing *Litopenaeus vannamei* postlarvae at a low salinity. *bioRxiv*.
- Huang H-H., Luo T., Lei Y-J., Kuang W-Q., Zou W-S, Yang P-H. 2021. Water quality, shrimp growth performance and bacterial community in a reusing-water biofloc system for nursery of *Penaeus vananmei* rearing under a low salinity condition. *Aquaculture Reports*. 21100894.
- Huang L., Guo H., Chen C., Huang X., Chen W., Bao F., Liu W., Wang S, Zhang D. 2020. The bacteria from large-sized bioflocs are more associated with the shrimp gut microbiota in culture system. *Aquaculture*. 523735159.
- Huang Y., Wen L., Zhang L., Xu J., Wang W., Hu H., Xu P., Li Z, Tang H. 2023. Community-integrated multi-omics facilitates screening and isolation of the organohalide dehalogenation microorganism. *Innovation (Camb)*. 4(1): 100355.
- Huerta-Rábago JA., Martínez-Porchas M., Miranda-Baeza A., Nieves-Soto M., Rivas-Vega ME, Martínez-Córdova LR. 2019. Addition of commercial probiotic in a biofloc shrimp farm of *Litopenaeus vannamei* during the nursery phase: Effect on bacterial diversity using massive sequencing 16S rRNA. *Aquaculture*. 502391-399.
- Huertas M., Gisbert E., Rodríguez A., Cardona L., Williot P, Castello-Orvay F. 2002. Acute exposure of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) yearlings to nitrite: median-lethal concentration (LC<sub>50</sub>) determination, haematological changes and nitrite accumulation in selected tissues. *Aquatic Toxicology*. 57(4): 257-266.
- Jackson C., Preston N., Thompson PJ, Burford M. 2003. Nitrogen budget and effluent nitrogen components at an intensive shrimp farm. *Aquaculture*. 218(1-4): 397-411.
- Jensen FB. 2003. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 135A9-24.
- Jia L., Cheng X., Fang L, Huang X. 2023. Nitrogen removal in improved subsurface wastewater infiltration system: Mechanism, microbial indicators and the limitation of phosphorus. *J Environ Manage*. 335117456.
- Jia X., Zhang S., Li J., Xia J., Yao R., Zhao X., Wu B., Bai F, Xiao Y. 2019. Engineered bacterial biofloc formation enhancing phenol removal and cell tolerance. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Jiménez-Ordaz FJ., Cadena-Roa MA., Pacheco-Vega JM., Rojas-Contreras M., Tovar-Ramírez D, Arce-Amezquita PM. 2021. Microalgae and probiotic bacteria as biofloc inducers in a hyper-

- intensive Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) culture. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 49(1): 155-168.
- Joo HS., Hirai M, Shoda. 2005. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 100184-191.
- Kathia CM., del Carmen MDM., Aida HP., Jorge CM., Félix AGJ, Amadeo BMJ. 2018. Effect of two probiotics on bacterial community composition from biofloc system and their impact on survival and growth of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Int. J. Fish. Aquat. Stud.* 6525-533.
- Khanjani MH., Mohammadi A, Emerenciano MGC. 2022. Microorganisms in biofloc aquaculture system. *Aquaculture Reports*. 26101300.
- Khanjani MH., Sajjadi MM., Alizadeh M, Sourinejad I. 2017. Nursery performance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) cultivated in a biofloc system: the effect of adding different carbon sources. *Aquaculture Research*. 48(4): 1491-1501.
- Khanjani MH, Sharifinia M. 2021. Production of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* reared in a limited water exchange system: The effect of different light levels. *Aquaculture*. 542736912.
- Khatoon H., Banerjee S., Yuan GTG., Haris N., Ikhwanuddin M., Ambak MA, Endut A. 2016. Biofloc as a potential natural feed for shrimp postlarvae. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 113304-309.
- Khodami S., Attaran-Fariman G., Ghasemzadeh J, Mortazavi MS. 2011. Comparison of different nitrogen compounds in three different environments of the Gwatar shrimp farms complex in the Gwatar Gulf region (Baluchestan-Iran). *Iran J Fish Sci*. 10(4): 663-677.
- Kim JH., Park HJ., Hwang IK., Han JM., Kim DH., Oh CW., Lee JS, Kang JC. 2017. Toxic effects of juvenile sablefish, *Anoplopoma fimbria* by ammonia exposure at different water temperature. *Environ Toxicol Pharmacol*. 54169-176.
- Kim Y-S., Kim S-E., Kim S-J., Jung H-K., Park J., Jeon YJ., Kim D-H., Kang J-H, Kim K-H. 2021. Effects of wheat flour and culture period on bacterial community composition in digestive tracts of *Litopenaeus vannamei* and rearing water in biofloc aquaculture system. *Aquaculture*. 531735908.
- Koops HP, Pommerening-Röser A. 2001. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *Fems Microbiology Ecology*. 37(1): 1–9.
- Kuhn DD., Smith SA., Boardman GD., Angier MW., Marsh LFJ, George J. 2010. Chronic toxicity of nitrate to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: impacts on survival, growth, antennae length, and pathology. *Aquaculture*. 309109-114.
- Kumar V., Roy S., Behera BK., Swain HS, Das BK. 2021. Biofloc microbiome with bioremediation and health benefits. *Front Microbiol*. 12741164.
- Kumar V., Wille M., Lourenço TM, Bossier P. 2020. Biofloc-based enhanced survival of *Litopenaeus vannamei* upon AHPND-causing *Vibrio parahaemolyticus* challenge is partially mediated by reduced expression of its virulence genes. *Frontiers in microbiology*. 111270.
- Kumar VS., Pandey PK., Anand T., Bhuvanewari GR., Dhinakaran A, Kumar S. 2018. Biofloc improves water, effluent quality and growth parameters of *Penaeus vannamei* in an intensive

- culture system. *J Environ Manage.* 215206-215.
- Kumwimba MN., Huang J., Dzakpasu M., Ajibade FO., Li X., Sanganyado E., Guadie A., Şenel E, Muyembe DK. 2023. Enhanced nutrient removal in agro-industrial wastes-amended hybrid floating treatment wetlands treating real sewage: Laboratory microcosm to field-scale studies. *Chemosphere.* 138703.
- Laice LM., Corrêa Filho RAC., Ventura AS., Farias KNN., Silva ALdN., Fernandes CE., Silva ACF., Barbosa PTL., de Souza AI., Emerenciano MGC, Povh JA. 2021. Use of symbiotics in biofloc (BFT)-based Nile tilapia culture: Production performance, intestinal morphometry and hematological parameters. *Aquaculture.* 530735715.
- Lara-Espinoza CL., Espinosa-Plascencia A., Rivera-Domínguez M., Astorga-Cienfuegos KR., Acedo-Félix E, del Carmen Bermúdez-Almada M. 2016. Desarrollo de camarón *Litopenaeus vannamei* en un sistema de cultivo intensivo con biofloc y nulo recambio de agua. *Revista AquaTIC.* (43): 1-13.
- Lawson PA. 2018 The phylum actinobacteria. In: *The Bifidobacteria and Related Organisms.* Elsevier, pp. 1-8.
- Lee DE., Lee J., Kim YM., Myeong JI, Kim KH. 2016. Uncultured bacterial diversity in a seawater recirculating aquaculture system revealed by 16S rRNA gene amplicon sequencing. *J Microbiol.* 54(4): 296-304.
- Legarda EC., da Silva D., Miranda CS., Pereira PKM., Martins MA., Machado C., de Lorenzo MA., Hayashi L, do Nascimento Vieira F. 2021. Sea lettuce integrated with Pacific white shrimp and mullet cultivation in biofloc impact system performance and the sea lettuce nutritional composition. *Aquaculture.* 534736265.
- Lewis JW, Morris DP. 1986. Toxicity of nitrite to fish: a review. *Transactions of the American Fisheries Society.* 115183-195.
- Li J., Qiang Z., Yu D., Wang D., Zhang P, Li Y. 2016. Performance and microbial community of simultaneous anammox and denitrification (SAD) process in a sequencing batch reactor. *Bioresource technology.* 2181064-1072.
- Li Y., Zhou F., Huang J., Yang L., Jiang S., Yang Q., He J, Jiang S. 2018. Transcriptome reveals involvement of immune defense, oxidative imbalance, and apoptosis in ammonia-stress response of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish & shellfish immunology.* 83162-170.
- Liaset B., Oyen J., Jacques H., Kristiansen K, Madsen L. 2019. Seafood intake and the development of obesity, insulin resistance and type 2 diabetes. *Nutrition research reviews.* 1-22.
- Lin YC, Chen JC. 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *J Exp Mar Biol Ecol.* 259109-119.
- Lin YC, Chen JC. 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture.* 224193-201.
- Liu B., Zhou W., Wang H., Li C., Wang L., Li Y, Wang J. 2020. *Bacillus baekryungensis* MS1 regulates the growth, non-specific immune parameters and gut microbiota of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 102133-139.

- Liu R., Zhao S., Zhang B., Li G., Fu X., Yan P, Shao Z. 2023. Biodegradation of polystyrene (PS) by marine bacteria in mangrove ecosystem. *J Hazard Mater.* 442130056.
- Liu Y., Ai GM., Miao LL, Liu ZP. 2016. Marinobacter strain NNA5, a newly isolated and highly efficient aerobic denitrifier with zero N<sub>2</sub>O emission. *Bioresource Technology.* 2069-15.
- Long L., Yang J., Li Y., Guan C, Wu F. 2015. Effect of biofloc technology on growth, digestive enzyme activity, hematology, and immune response of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture.* 448135-141.
- Lorenz TC. 2012. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *JoVE (Journal of Visualized Experiments).* (63): e3998.
- Lozupone C, Knight R. 2005. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology.* 71(12): 8228-8235.
- Luchini L. 2016. Actualidad de la acuicultura en Argentina. *Revista AquaTIC.* (5).
- Luo G., Liu Z., Shao L, Tan H. 2019. Using poly- $\beta$ -hydroxybutyric as an additional carbohydrate for biofloc in a shrimp *Litopenaeus vannamei* bioflocs nursery system with brackish water. *Aquaculture.* 506181-187.
- Luo G., Wang J., Ma N., Liu Z, Tan H. 2016. Effects of Inoculated *Bacillus subtilis* on Geosmin and 2-Methylisoborneol Removal in Suspended Growth Reactors Using Aquacultural Waste for Biofloc Production. *J Microbiol Biotechnol.* 26(8): 1420-1427.
- Luo G., Xu J., Li J., Zheng H., Tan H, Liu W. 2022. Rapid production bioflocs by inoculation and fertilized with different nitrogen and carbon sources. *Aquacultural Engineering.* 98102262.
- Luo G., Xu J, Meng H. 2020. Nitrate accumulation in biofloc aquaculture systems. *Aquaculture.* 520734675.
- Luo G., Zhang N., Cai S., Tan H, Liu Z. 2017. Nitrogen dynamics, bacterial community composition and biofloc quality in biofloc-based systems cultured *Oreochromis niloticus* with poly- $\beta$ -hydroxybutyric and polycaprolactone as external carbohydrates. *Aquaculture.* 479732-741.
- Llario., Falco., Sebastia F., Escriva., Rodilla, Poersch. 2019. The Role of *Bacillus amyloliquefaciens* on *Litopenaeus vannamei* During the Maturation of a Biofloc System. *Journal of Marine Science and Engineering.* 7(7): 228.
- Ma N., Luo G., Tan H., Li L, Wang X. 2015. Removal of geosmin and 2-methylisoborneol by bioflocs produced with aquaculture waste. *Aquaculture International.* 24(1): 345-356.
- Marella TK., Lopez-Pacheco IY., Parra-Saldivar R., Dixit S, Tiwari A. 2020. Wealth from waste: Diatoms as tools for phycoremediation of wastewater and for obtaining value from the biomass. *Sci Total Environ.* 724137960.
- Martínez-Córdova LR., Martínez-Porchas M., Vargas-Albores F., Miranda-Baeza A., Coelho-Emerenciano MG., Porchas-Cornejo MA., Cortes-Jacinto E, Mazorra-Manzano M. 2018a. Taxonomic profile of bacterial communities detected with 16S-rRNA in mature phototrophic and heterotrophic marine biofilms used for aquaculture. *Ciencias Marinas.* 44(4): 251-266.
- Martínez-Córdova LR., Martínez Porchas M, Cortés-Jacinto E. 2009. Camaronicultura mexicana y mundial: Actividad sustentable o industria contaminante? *Revista internacional de*

*contaminación ambiental*. 25(3): 181-196.

- Martínez-Córdova LR., Robles-Porchas GR., Vargas-Albores F., Porchas-Cornejo MA, Martínez-Porchas M. 2022 Microbial bioremediation of aquaculture effluents. In: *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. Elsevier, pp. 409-417.
- Martínez-Córdova LR., Vargas-Albores F., Garibay-Valdez E., Ortíz-Estrada ÁM., Porchas-Cornejo MA., Lago-Lestón A, Martínez-Porchas M. 2018b. Amaranth and wheat grains tested as nucleation sites of microbial communities to produce bioflocs used for shrimp culture. *Aquaculture*. 497503-509.
- Martínez-Porchas M, Vargas-Albores F. 2017. Microbial metagenomics in aquaculture: a potential tool for a deeper insight into the activity. *Reviews in Aquaculture*. 9(1): 42-56.
- Martinez CBR, Souza MM. 2002. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 133A151-160.
- Martins MA., Poli MA., Legarda EC., Pinheiro IC., Carneiro RFS., Pereira SA., Martins ML., Gonçalves P., Schleder DD, do Nascimento Vieira F. 2020. Heterotrophic and mature biofloc systems in the integrated culture of Pacific white shrimp and Nile tilapia. *Aquaculture*. 514734517.
- Medina ML., Medina MG, Merino LA. 2010. Identificación de bacterias periodontopatógenas mediante métodos diagnósticos moleculares. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 30(3): 83-90.
- Menaga M., Felix S., Charulatha M., Gopalakannan A, Panigrahi A. 2019. Effect of *in-situ* and *ex-situ* biofloc on immune response of genetically improved farmed tilapia. *Fish Shellfish Immunol*. 92698-705.
- Meng LJ., Hu X., Wen B., Liu YH., Luo GZ., Gao JZ, Chen ZZ. 2023. Microplastics inhibit biofloc formation and alter microbial community composition and nitrogen transformation function in aquaculture. *Sci Total Environ*. 866161362.
- Meng X., Li Y., Yao H., Wang J., Dai F., Wu Y, Chapman S. 2020. Nitrification and urease inhibitors improve rice nitrogen uptake and prevent denitrification in alkaline paddy soil. *Applied Soil Ecology*. 154103665.
- Miao S., Zhu J., Zhao C., Sun L., Zhang X, Chen G. 2017. Effects of C/N ratio control combined with probiotics on the immune response, disease resistance, intestinal microbiota and morphology of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Aquaculture*. 476125-133.
- Miranda-Baeza A., Nolasco-López M., Rivas-Vega ME., Huerta-Rábago JA., Martínez-Córdova LR, Martínez-Porchas M. 2019. Short-term effect of the inoculation of probiotics in mature bioflocs: Water quality parameters and abundance of heterotrophic and ammonia-oxidizing bacteria. *Aquaculture Research*.
- Monzó C., Juanes J., Marín-García P., Chaves F., Llombart VA, García-García AB. 2017. Secuenciación Masiva: Del ADN a los datos. *Genómica en Medicina: Una Guía Práctica*. 14-25.
- Morales-García Y-E., Duque E., Rodríguez-Andrade O., De la Torre J., Martínez-Contreras R.,



- Pérez-Terrón R, Muñoz-Rojas J. 2010. Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *BioTecnología*. 14(2): 11-29.
- Mougin J., Lobanov V., Danion M., Roquigny R., Goardon L., Grard T., Morin T., Labbe L, Joyce A. 2023. Effects of dietary co-exposure to fungal and herbal functional feed additives on immune parameters and microbial intestinal diversity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol*. 137108773.
- Moya AS. 2017. Microbioma y secuenciación masiva. *Rev Esp Quimioter*. 30(5): 305-311.
- Oddsson GV. 2020. A definition of aquaculture intensity based on production functions—The aquaculture production intensity scale (APIS). *Water*. 12(3): 765.
- Ogello EO., Outa NO., Obiero KO., Kyule DN, Munguti JM. 2021. The prospects of biofloc technology (BFT) for sustainable aquaculture development. *Scientific African*. 14e01053.
- Okomoda VT., Ikhwanuddin M., Oladimeji AS., Najiah M., Alabi KI., Salam AIA., Jauhari I, Kasan NA. 2022. Rearing water quality and zootechnical parameters of *Litopenaeus vannamei* in rapid Biofloc® and conventional intensive culture system. *Journal of King Saud University - Science*. 34(1): 101729.
- Oliveira LK., Wasielesky W, Tesser MB. 2022. Fish culture in biofloc technology (BFT): Insights on stocking density carbon sources, C/N ratio, fish nutrition and health. *Aquaculture and Fisheries*.
- Ortiz-Estrada ÁM., Gollas-Galván T., Martínez-Córdova LR, Martínez-Porchas M. 2019. Predictive functional profiles using metagenomic 16S rRNA data: a novel approach to understanding the microbial ecology of aquaculture systems. *Reviews in Aquaculture*. 11(1): 234-245.
- Pacheco-Vega JM., Cadena-Roa MA., Leyva-Flores JA., Zavala-Leal OI., Pérez-Bravo E, Ruiz-Velazco MJ. 2018. Effect of isolated bacteria and microalgae on the biofloc characteristics in the Pacific white shrimp culture. *Aquaculture Reports*. 1124-30.
- Padhi SK, Maiti N. 2017. Molecular insight into the dynamic central metabolic pathways of *Achromobacter xylosoxidans* CF-S36 during heterotrophic nitrogen removal processes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 12346-55.
- Pan KL., Gao JF., Li HY., Fan XY., Li DC, Jiang H. 2018. Ammonia-oxidizing bacteria dominate ammonia oxidation in a full-scale wastewater treatment plant revealed by DNA-based stable isotope probing. *Bioresource Technology*. 256152-159.
- Pang S., Zhang G., Hu Y., Luo X., Li N., Zhu J., Jiang J., Han B, Shen T. 2023. Enhancing the total nitrogen removal efficiency of anaerobic ammonium oxidation (anammox) with two types of biochars. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 11(1): 109108.
- Panigrahi A., Saranya C., Ambiganandam K., Sundaram M., Sivakumar MR, Kumaraguru vasagam KP. 2020. Evaluation of biofloc generation protocols to adopt high density nursery rearing of *Penaeus vannamei* for better growth performances, protective responses and immuno modulation in biofloc based technology. *Aquaculture*. 522735095.
- Panigrahi A., Saranya C., Sundaram M., Vinoth Kannan SR., Das RR., Satish Kumar R., Rajesh P, Otta SK. 2018. Carbon: Nitrogen (C:N) ratio level variation influences microbial

community of the system and growth as well as immunity of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in biofloc based culture system. *Fish Shellfish Immunol.* 81329-337.

Parada AE., Needham DM, Fuhrman JA. 2016. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ Microbiol.* 18(5): 1403-1414.

Park I-S., Lee J., Hur J-W., Song Y-C., Na HC, Noh CH. 2007. Acute toxicity and sublethal effects of nitrite on selected hematological. *J World Aquacult Soc.* 38(2): 188-199.

Park M., Kyung-Shin S., Hyun-Do Y., Yarish C, Kyun-Kim J. 2018. Application of open water integrated multi-trophic aquaculture to intensive monoculture: A review of the current status and challenges in Korea. *Aquaculture.* 497174-183.

Patel RK, Jain M. 2012. NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PloS one.* 7(2): e30619.

Peiro-Alcantar CI., Miranda-Baeza A., Garibay-Valdez E., Martínez-Córdova LR., Vargas-Albores F., Cicala F., Gómez-Reyes R, Martínez-Porchas M. 2022. Mature biofloc harbor similar bacterial communities regardless of the vegetal floating substrates (oat, amaranth, or wheat) used as promoters. *Aquaculture International.*

Pekkoh J., Chaichana C., Thurakit T., Phinyo K., Lomakool S., Ruangrit K., Duangjan K., Suwannarach N., Kumla J., Cheirsilp B, Srinuanpan S. 2022. Dual-bioaugmentation strategy to enhance the formation of algal-bacteria symbiosis biofloc in aquaculture wastewater supplemented with agricultural wastes as an alternative nutrient sources and biomass support materials. *Bioresour Technol.* 359127469.

Peña-Castro JM., Gregorio-Ramírez O, Barrera-Figueroa BE. 2013. Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas. *Educación química.* 24(2): 237-246.

Pierri V., Valter-Severino D., Goulart-de-Oliveira K., Manoel-do-Espirito-Santo C., Nascimento-Vieira F, Quadros-Seiffert W. 2015. Cultivation of marine shrimp in biofloc technology (BFT) system under different water alkalinities. *Braz J Biol.* 75(3): 558-564.

Pilotto MR., Argenta N., Forte JM., Hostins B., Menezes FGR., Maggioni R., de Sousa OV., Wasielesky WJ., Rosa RD, Perazzolo LM. 2020. Environmental rearing conditions are key determinants of changes in immune gene expression patterns in shrimp midgut. *Dev Comp Immunol.* 106103618.

Pilotto MR., Goncalves ANA., Vieira FN., Seifert WQ., Bachere E., Rosa RD, Perazzolo LM. 2018. Exploring the impact of the biofloc rearing system and an oral WSSV Challenge on the intestinal bacteriome of *Litopenaeus vannamei*. *Microorganisms.* 6(3).

Pinoargote G., Flores G., Cooper K, Ravishankar S. 2018. Effects on survival and bacterial community composition of the aquaculture water and gastrointestinal tract of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to probiotic treatments after an induced infection of acute hepatopancreatic necrosis disease. *Aquaculture Research.* 49(10): 3270-3288.

Plascencia AE, Almada MdCB. 2012. La acuicultura y su impacto al medio ambiente. *Estudios Sociales. Revista de alimentación contemporánea y desarrollo regional.* (2): 221-232.

- Podosokorskaya OA., Elcheninov AG., Novikov AA, Kublanov IV. 2022. *Fontivita pretiosa* gen. nov., sp. nov., a thermophilic planctomycete of the order *Tepidisphaerales* from a hot spring of Baikal lake region. *Syst Appl Microbiol.* 45(6): 126375.
- Ponce-Palafox JT., Pavia ÁA., Mendoza López DG., Arredondo-Figueroa JL., Lango-Reynoso F., Castañeda-Chávez MdR., Esparza-Leal H., Ruiz-Luna A., Páez-Ozuna F., Castillo-Vargasmachuca SG, Peraza-Gómez V. 2019. Response surface analysis of temperature-salinity interaction effects on water quality, growth and survival of shrimp *Penaeus vannamei* postlarvae raised in biofloc intensive nursery production. *Aquaculture.* 503312-321.
- Prosser JI. 2007 The ecology of nitrifying bacteria. In: *Biology of the nitrogen cycle*. Elsevier, pp. 223-243.
- Purkhold U., Pommerening-Röser A., Juretschko S., Schmid MC., Koops HP, Wagner M. 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl Environ Microbiol.* 665368–5382.
- Qiao G., Chen P., Sun Q., Zhang M., Zhang J., Li Z, Li Q. 2020. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) in bioflocs alters intestinal microbial community structure, immune-related gene expression and early Cyprinid herpesvirus 2 replication in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Fish Shellfish Immunol.* 9772-82.
- Rashid M, Stingl U. 2015. Contemporary molecular tools in microbial ecology and their application to advancing biotechnology. *Biotechnology advances.* 33(8): 1755-1773.
- Ray AJ., Drury TH, Cecil A. 2017. Comparing clear-water RAS and biofloc systems: Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production, water quality, and biofloc nutritional contributions estimated using stable isotopes. *Aquacultural Engineering.* 779-14.
- Ray AJ, Lotz JM. 2017. Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and stable isotope dynamics in clear-water recirculating aquaculture systems versus biofloc systems. *Aquaculture Research.* 48(4): 4390-4398.
- Reis WG., Wasielesky W., Abreu PC., Brandão H, Krummenauer D. 2019. Rearing of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in BFT system with different photoperiods: Effects on the microbial community, water quality and zootechnical performance. *Aquaculture.* 50819-29.
- Reza R, Teresa M. 2014. DNA sequencing: historical and technical considerations. *Revista Colombiana de Biotecnología.* 16(1): 5-8.
- Riesenfeld CS., Schloss PD, Handelsman J. 2004. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.* 38525-552.
- Ringø E. 2020. Probiotics in shellfish aquaculture. *Aquaculture and Fisheries.* 5(1): 1-27.
- Rodríguez-Santiago B, Armengol L. 2012. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre-y postnatal. *Diagnóstico prenatal.* 23(2): 56-66.
- Romano N, Zeng C. 2007. Acute toxicity of sodium nitrate potassium nitrate and potassium chloride and their effects on the hemolymph composition and gill structure of early juvenile blue swimmer crabs (*Portunus pelagicus* Linnaeus, 1758) (Decapoda, Brachyura,

Portunidae). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 26(9): 1955-1962.

- Romano N, Zeng C. 2009. Evaluating the newly proposed protocol of incorporated potassium in nitrate toxicity experiments at different salinities: a case study with the tiger prawn, *Penaeus monodon*, juveniles. *Aquaculture*. 289(3-4): 304-309.
- Romano N, Zeng C. 2013. Toxic effects of ammonia, nitrite, and nitrate to decapod crustaceans: a review on factors influencing their toxicity, physiological consequences, and coping mechanisms. *Reviews in Fisheries Science*. 21(1): 1-21.
- Roquigny R., Mougín J., Le Bris C., Bonnin-Jusserand M., Doyen P, Grard T. 2021. Characterization of the marine aquaculture microbiome: A seasonal survey in a seabass farm. *Aquaculture*. 531735987.
- Rosa J., Lemos MFL., Crespo D., Nunes M., Freitas A., Ramos F., Pardal MÂ, Leston S. 2020. Integrated multitrophic aquaculture systems – Potential risks for food safety. *Trends in Food Science & Technology*. 9679-90.
- Roumieh R., Barakat A., Abdelmeguid N., Ghanawi J, Saoud P. 2012. Acute and chronic effects of aqueous ammonia on marbled spinefoot rabbitfish, *Siganus rivulatus* (Forsskal 1775). *Aquaculture Research*. 441777-1790.
- Rud I., Kolarevic J., Holan AB., Berget I., Calabrese S, Terjesen BF. 2017. Deep-sequencing of the bacterial microbiota in commercial-scale recirculating and semi-closed aquaculture systems for Atlantic salmon post-smolt production. *Aquacultural Engineering*. 7850-62.
- Rurangwa E, Verdegem MCJ. 2015. Microorganisms in recirculating aquaculture systems and their management. *Reviews in Aquaculture*. 7(2): 117-130.
- Samocha TM. 2019. Sustainable biofloc systems for marine shrimp,
- Sánchez-Muros MJ., Rentería P., Vizcaino A, Barroso FG. 2020. Innovative protein sources in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) feeding. *Reviews in Aquaculture*. 12(1): 186-203.
- Satanwat P., Tran TP., Hirakata Y., Watari T., Hatamoto M., Yamaguchi T., Pungrasmi W, Powtongsook S. 2020. Use of an internal fibrous biofilter for intermittent nitrification and denitrification treatments in a zero-discharge shrimp culture tank. *Aquacultural Engineering*. 88102041.
- Schleder DD., Blank M., Peruch LGB., Poli MA., Gonçalves P., Rosa KV., Fracalossi DM., Vieira FdN., Andreatta ER, Hayashi L. 2020. Impact of combinations of brown seaweeds on shrimp gut microbiota and response to thermal shock and white spot disease. *Aquaculture*. 519734779.
- Schweitzer R., Fonseca G., Orteney N., Menezes FCT., Thompson FL., Thompson CC, Gregoracci GB. 2020. The role of sedimentation in the structuring of microbial communities in biofloc-dominated aquaculture tanks. *Aquaculture*. 514734493.
- Sedano JCS, Carrascal CEL. 2012. RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Fitosanidad*. 16(2): 101-113.
- Serra FP., Gaona CAP., Furtado PS., Poersch LH, 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.

- Sgnaulin T., Durigon EG., Pinho SM., Jerônimo GT., Lopes DLdA, Emerenciano MGC. 2020. Nutrition of genetically improved farmed tilapia (GIFT) in biofloc technology system: Optimization of digestible protein and digestible energy levels during nursery phase. *Aquaculture*. 521734998.
- Shang Q., Tang H., Wang Y., Yu K., Wang L., Zhang R., Wang S., Xue R, Wei C. 2018. Application of enzyme-hydrolyzed cassava dregs as a carbon source in aquaculture. *Sci Total Environ*. 615681-690.
- Shao JC., Liu M., Wang BJ., Jiang KY., Wang MQ, Wang L. 2017. Evaluation of biofloc meal as an ingredient in diets for white shrimp *Litopenaeus vannamei* under practical conditions: Effect on growth performance, digestive enzymes and TOR signaling pathway. *Aquaculture*. 479516-521.
- Shitu A., Zhang Y., Danhassan UA., Li H., Tadda MA., Ye Z, Zhu S. 2022. Synergistic effect of chitosan-based sludge aggregates CS@NGS inoculum accelerated the start-up of biofilm reactor treating aquaculture effluent: Insights into performance, microbial characteristics, and functional genes. *Chemosphere*. 303(Pt 3): 135097.
- Silva UL., Falcon DR., Pessoa MND, Correia ED. 2017. Carbon sources and C:N ratios on water quality for Nile tilapia farming in biofloc system. *Rev Caatinga*. 30(4): 1017-1027.
- Simon C, Daniel R. 2009. Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches. *Applied microbiology and biotechnology*. 85265-276.
- Simon M., Scheuner C., Meier-Kolthoff JP., Brinkhoff T., Wagner-Dobler I., Ulbrich M., Klenk HP., Schomburg D., Petersen J, Goker M. 2017. Phylogenomics of *Rhodobacteraceae* reveals evolutionary adaptation to marine and non-marine habitats. *ISME J*. 11(6): 1483-1499.
- Soria Freire V. 2005. Manejo costero integrado y desarrollo sostenible en zonas costeras. El caso del programa de manejo de recursos costeros del Ecuador en el Golfo de Guayaquil. Quito: FLACSO Sede Ecuador.
- Souza J., Cardozo A., Wasielesky W, Abreu PC. 2019. Does the biofloc size matter to the nitrification process in Biofloc Technology (BFT) systems? *Aquaculture*. 500443-450.
- Steinberg DK, Saba GK. 2008. Nitrogen Consumption and Metabolism in Marine Zooplankton. *Nitrogen in the Marine Environment, 2nd Edition*. 1135-1196.
- Steinberg K., Zimmermann J., Stiller KT., Nwana L., Meyer S, Schulz C. 2018. Elevated nitrate levels affect the energy metabolism of pikeperch (*Sander lucioperca*) in RAS. *Aquaculture*. 497405-413.
- Sundaray JK., Dixit S., Rather A., Rasal KD, Sahoo L. 2022. Aquaculture omics: An update on the current status of research and data analysis. *Mar Genomics*. 64100967.
- Takaya N., Catalansakairi MAB., Sakaguchi Y., Kato I., Zhou Z, Shoun. 2003. Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide. *Appl. Environ. Microbiol*. 693152-3157.
- Tamagnini LM, Paraje MG. 2015. ¿Qué son las bacterias viables no cultivables? (revisión bibliográfica). *Revista Facultad de Ciencias Exactas, Física y Naturales*. 2(2).

- Tamay de Dios L., Ibarra C, Velasquillo C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*. 2(2): 70-78.
- Tepaamorndech S., Chantarasakha K., Kingcha Y., Chaiyapechara S., Phromson M., Sriariyanun M., Kirschke CP., Huang L, Visessanguan W. 2018. Effects of *Bacillus aryabhatai* TBRC8450 on vibriosis resistance and immune enhancement in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*. 864-13.
- Thy HTT., Tri NN., Quy OM., Fotedar R., Kannika K., Unajak S, Areechon N. 2017. Effects of the dietary supplementation of mixed probiotic spores of *Bacillus amyloliquefaciens* 54A, and *Bacillus pumilus* 47B on growth, innate immunity and stress responses of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Fish & shellfish immunology*. 60391-399.
- Tran N., Rodriguez U-P., Chan CY., Phillips MJ., Mohan CV., Henriksson PJG., Koeshendrajana S., Suri S, Hall S. 2017. Indonesian aquaculture futures: An analysis of fish supply and demand in Indonesia to 2030 and role of aquaculture using the AsiaFish model. *Marine Policy*. 7925-32.
- Tsukuda S., Christianson L., Kolb A., Saito K, Summerfelt S. 2015. Heterotrophic denitrification of aquaculture effluent using fluidized sand biofilters. *Aquacultural Engineering*. 6449-59.
- Tubin JSB., Paiano D., Hashimoto GSdO., Furtado WE., Martins ML., Durigon EG, Emerenciano MGC. 2020. Tenebrio molitor meal in diets for Nile tilapia juveniles reared in biofloc system. *Aquaculture*. 519734763.
- Tucker CS., Francis FR, Bealeu MH. 1989. Nitrite-induced anemia in channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 34295-301.
- Vajrala N., Martenshabbena W., Sayavedrasoto LA., Schauer A., Bottomley PJ., Stahl DA, Arp D. 2013. Hydroxylamine as an intermediate in ammonia oxidation by globally abundant marine archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1101006-1011.
- Valenti WC., Kimpara JM., Preto BdL, Moraes-Valenti P. 2018. Indicators of sustainability to assess aquaculture systems. *Ecological Indicators*. 88402-413.
- van Bussel CG., Schroeder JP., Wuertz S, Schulz C. 2012. The chronic effect of nitrate on production performance and health status of juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*. 326163-167.
- Vargas-Albores F., Martínez-Córdova LR., Gollas-Galván T., Garibay-Valdez E., Emerenciano MGC., Lago-Leston A., Mazorra-Manzano M, Martínez-Porchas M. 2019. Inferring the functional properties of bacterial communities in shrimp-culture bioflocs produced with amaranth and wheat seeds as fouler promoters. *Aquaculture*. 500107-117.
- Verdegem M., Bosma R, Verreth J. 2006. Reducing water use for animal production through aquaculture. *Int. J. Water Resour. Dev*. 22101-113.
- Wang G., Yu E., Xie J., Li Z., Luo W., Qiu L, Zheng Z. 2015. Effect of C/Nratio on water quality in zero-water exchange tanks and the biofloc supplementation in feed on the growth performance of crucian carp, *Carassius auratus*. *Aquaculture*. 44398-104.
- Wang Q., Mao C., Lei L., Yan B., Yuan J., Guo Y., Li T., Xiong X., Cao X., Huang J., Han J., Yu

- K, Zhou B. 2022. Antibiotic resistance genes and their links with bacteria and environmental factors in three predominant freshwater aquaculture modes. *Ecotoxicol Environ Saf.* 241113832.
- Wang R., Guo Z., Tang Y., Kuang J., Duan Y., Lin H., Jiang S., Shu H, Huang J. 2020. Effects on development and microbial community of shrimp *Litopenaeus vannamei* larvae with probiotics treatment. *AMB Express.* 10(1): 109.
- Wang Y., Pasparakis C., Mager E., Stieglitz J., Benetti D, Grosell M. 2019. Ontogeny of urea and ammonia transporters in mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) early life stages. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology.* 22918-24.
- Wanna W., Aucharean C., Kaitimonchai P, Jaengkhaio W. 2023. Effect of dietary *Pediococcus pentosaceus* MR001 on intestinal bacterial diversity and white spot syndrome virus protection in Pacific white shrimp. *Aquaculture Reports.* 30101570.
- Wasielesky W., Atwood H., Stoke A, Browdy CL. 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research.* 258 396-403.
- Wei G., Shan D., Li G., Li X., Tian R., He J, Shao Z. 2020. Prokaryotic communities vary with floc size in a biofloc-technology based aquaculture system. *Aquaculture.* 529735632.
- Wei X., Peng H., Li Y., Meng B., Wang S., Bi S, Zhao X. 2023. Pyrethroids exposure alters the community and function of the internal microbiota in *Aedes albopictus*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 252114579.
- Wei YF., Liao SA, Wang AL. 2016. The effect of different carbon sources on the nutritional composition, microbial community and structure of bioflocs. *Aquaculture.* 46588-93.
- Wiegand S., Jogler M, Jogler C. 2018. On the maverick Planctomycetes. *FEMS Microbiol Rev.* 42(6): 739-760.
- Willett W., Rockström J., Loken B., Springmann M., Lang T., Vermeulen S., Garnett T., Tilman D., DeClerck F, Wood A. 2019. Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. *The Lancet.* 393(10170): 447-492.
- Wu J., Cui S., Zhang Q., Zhang L., Zhuang J, Qian F. 2022. Start-up of the combined anaerobic ammonium oxidation and solid phase denitrification process and microbial characterization analysis. *Journal of Water Process Engineering.* 50103353.
- Wu Q., Ma H., Su Z., Lu W, Ma B. 2022. Impact of marine aquaculture wastewater discharge on microbial diversity in coastal waters. *Regional Studies in Marine Science.* 56102702.
- Wunderlin P., Mohn J., Joss A., Emmenegger L, Siegrist H. 2012. Mechanisms of N<sub>2</sub>O production in biological wastewater treatment under nitrifying and denitrifying conditions. *Water research.* 46(4): 1027-1037.
- Xu W-J., Morris TC, Samocha TM. 2016. Effects of C/N ratio on biofloc development, water quality, and performance of *Litopenaeus vannamei* juveniles in a biofloc-based, high-density, zero-exchange, outdoor tank system. *Aquaculture.* 453169-175.
- Xu W-J, Pan L-Q. 2013. Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input.

*Aquaculture*. 412117-124.

- Xu Z., Li R., Liu T., Zhang G., Wu S., Xu K., Zhang Y., Wang Q., Kang J., Zhang Z., Quan F, Zhang Y. 2022. Effect of inoculation with newly isolated thermotolerant ammonia-oxidizing bacteria on nitrogen conversion and microbial community during cattle manure composting. *J Environ Manage*. 317115474.
- Yang W., Xiang F., Liang L, Yang Z. 2010. Toxicity of ammonia and Its effects on oxidative stress mechanisms of juvenile crucian carp (*Carassius auratus*). *Journal of Freshwater Ecology*. 25(2): 297-302.
- Yilmaz E. 2019. Effects of dietary anthocyanin on innate immune parameters, gene expression responses, and ammonia resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol*. 93694-701.
- Yin J., Xu H., Shen D., Wang K, Lin Y. 2015. Effect of Cu(II) shock loads on shortcut biological nitrogen removal in a hybrid biofilm nitrogen removal reactor. *Biodegradation*. 26(3): 211-222.
- Yu L., Tang Y., Wang Z., Gou Y, Wang J. 2018. Nitrogen-cycling genes and rhizosphere microbial community with reduced nitrogen application in maize/soybean strip intercropping. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. 113(1): 35-49.
- Yun L., Yu Z., Li Y., Luo P., Jiang X., Tian Y, Ding X. 2019. Ammonia nitrogen and nitrite removal by a heterotrophic *Sphingomonas sp.* strain LPN080 and its potential application in aquaculture. *Aquaculture*. 500477-484.
- Zaki MAA., Alabssawy AN., Nour AE-AM., El Basuini MF., Dawood MAO., Alkahtani S, Abdel-Daim MM. 2020. The impact of stocking density and dietary carbon sources on the growth, oxidative status and stress markers of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared under biofloc conditions. *Aquaculture Reports*. 16100282.
- Zemor JC., Wasielesky W., F6es GK, Poersch LH. 2019. The use of clarifiers to remove and control the total suspended solids in large-scale ponds for production of *Litopenaeus vannamei* in a biofloc system. *Aquacultural Engineering*. 8574-79.
- Zhang B., Yu Z., Zhang Q., Liu Y., Qiu D., Xiao E, Wu Z. 2023. Effects of salinity on the performance of bioflocs with activated sludge as inoculum. *Chemical Engineering Journal Advances*. 14100451.
- Zhang C., Mi W., Xu Y., Zhou W, Bi Y. 2023. Long-term integrated rice-crayfish culture disrupts the microbial communities in paddy soil. *Aquaculture Reports*. 29101515.
- Zhang M., Jin BJ., Bi QF., Li KJ., Sun CL., Lin XY, Zhu YG. 2022. Variations of earthworm gut bacterial community composition and metabolic functions in coastal upland soil along a 700-year reclamation chronosequence. *Sci Total Environ*. 804149994.
- Zhang M., Pan L., Huang F., Gao S., Su C., Zhang M, He Z. 2019. Metagenomic analysis of composition, function and cycling processes of microbial community in water, sediment and effluent of *Litopenaeus vannamei* farming environments under different culture modes. *Aquaculture*. 506280-293.
- Zhang W., Zhang Q., Li M., Wang H., Li Y., Peng H, Feng J. 2021. Microbial community and

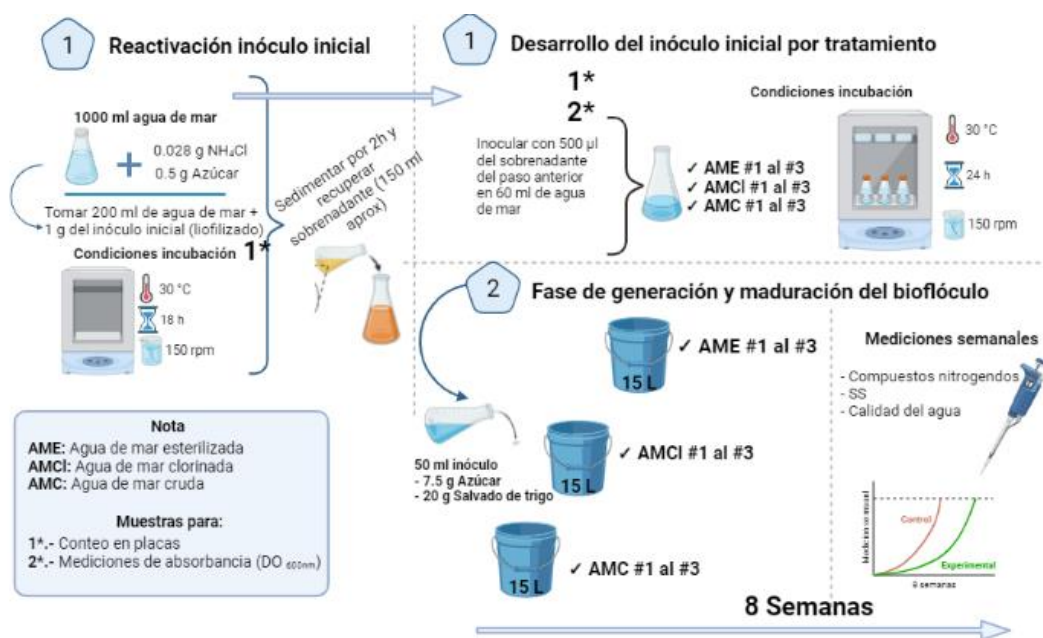


function evaluation in the start-up period of bioaugmented SBR fed with aniline wastewater. *Bioresour Technol.* 319124148.

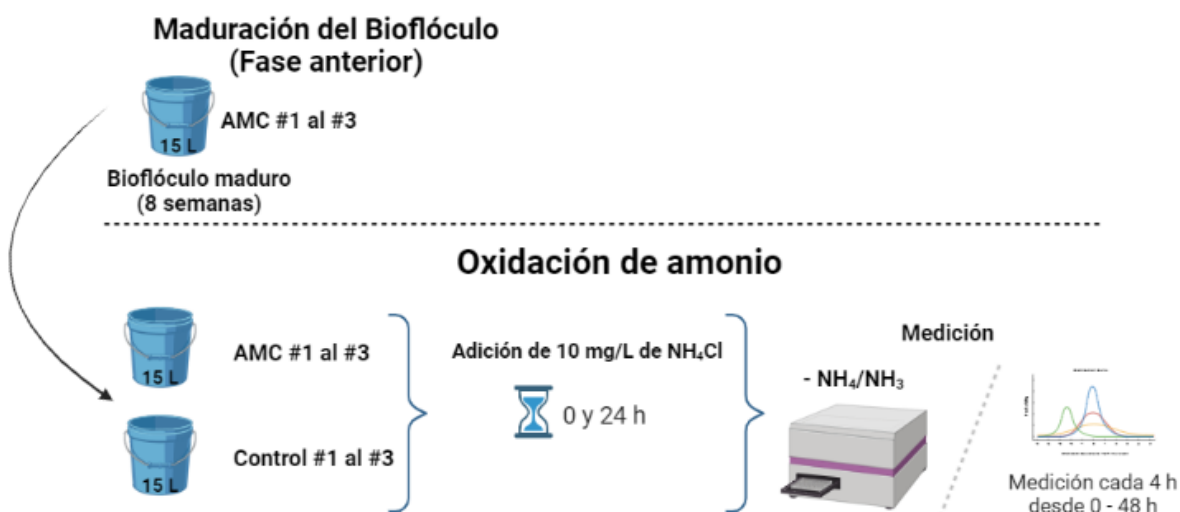
- Zhang X., Dong H., Zheng P., Li G., He C., Guo X., Zhang J, Gong J. 2023. The habitat differentiation, dynamics and functional potentials of bacterial and micro-eukaryotic communities in shrimp aquaculture systems with limited water exchange. *Aquaculture.* 566739156.
- Zhang Y., Zhang Y., Gao J., Shen Q., Bai Z., Zhuang X, Zhuang G. 2018. Optimization of the medium for the growth of *Nitrobacter winogradskyi* by statistical method. *Letters in Applied Microbiology.* 67(3): 306-313.
- Zhao DH., Pan LQ., Huang F., Wang C, Xu WJ. 2016. Effects of different carbon sources on bioactive compound production of biofloc, immune response, antioxidant level, and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange culture tanks. *J World Aquacult Soc.* 47(4): 566-576.
- Zhao J., Wang X., Li X., Jia S., Wang Q, Peng Y. 2019. Improvement of partial nitrification endogenous denitrification and phosphorus removal system: Balancing competition between phosphorus and glycogen accumulating organisms to enhance nitrogen removal without initiating phosphorus removal deterioration. *Bioresource Technology.* 281382-391.
- Zhao Q., Xie F., Zhang F., Zhou K., Sun H., Zhao Y, Yang Q. 2022. Analysis of bacterial community functional diversity in late-stage shrimp (*Litopenaeus vannamei*) ponds using Biolog EcoPlates and PICRUSt2. *Aquaculture.* 546737288.
- Zhao Z., Liu Y., Jiang H., Yu H., Qin G., Qu M., Xiao W, Lin Q. 2023. Microbial profiles and immune responses in seahorse gut and brood pouch under chronic exposure to environmental antibiotics. *Ecotoxicol Environ Saf.* 253114711.
- Zhou J., Richlen ML., Sehein TR., Kulis DM., Anderson DM, Cai Z. 2018. Microbial community structure and associations during a marine dinoflagellate bloom. *Front Microbiol.* 91201.
- Zhu G., Peng Y., Li B., Guo J, Wang S. 2008. Biological removal of nitrogen from wastewater. *Rev Environ Contam Toxicol.* 159-195.
- Zhu L., Ding W., Feng LJ., Kong Y., Xu J, Xu X. 2012. Isolation of aerobic denitrifiers and characterization for their potential application in the bioremediation of oligotrophic ecosystem. *Bioresource Technology.* 1081-7.
- Zorz JK., Kozlowski JA., Stein LY., Strous M, Kleiner M. 2018. Comparative proteomics of three species of ammonia-oxidizing bacteria. *Front Microbiol.* 9938.
- Zou S., Guan L., Taylor DP., Kuhn D, He Z. 2018. Nitrogen removal from water of recirculating aquaculture system by a microbial fuel cell. *Aquaculture.* 49774-81.

## 10. ANEXOS

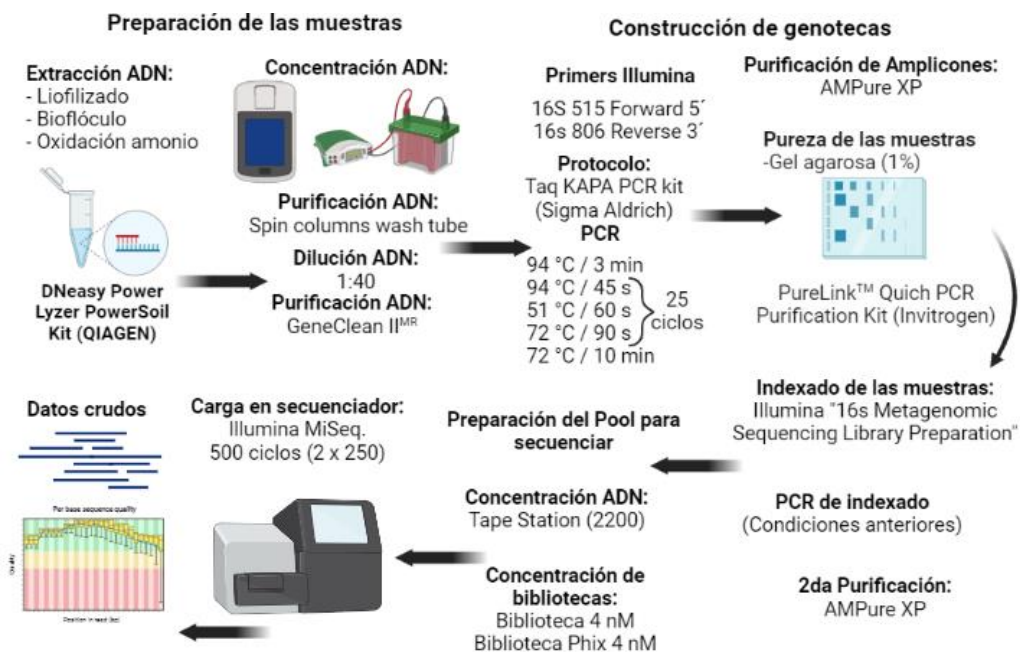
### 10.1. Diagrama general de trabajo durante las fases de generación y maduración del bioflóculo



## 10.2. Diagrama de trabajo durante la fase de oxidación de amonio



## 10.3. Flujo de trabajo durante la preparación de las muestras secuenciadas



#### 10.4. Lista de ID (KEGG) de las funciones L3 encontradas durante la fase de oxidación de amonio

ko00010Glycolysis / Gluconeogenesis	ko00230Purine metabolism
ko00020Citrate cycle (TCA cycle)	ko00240Pyrimidine metabolism
ko00030Pentose phosphate pathway	ko00250Alanine, aspartate and glutamate metabolism
ko00040Pentose and glucuronate interconversions	ko00260Glycine, serine and threonine metabolism
ko00051Fructose and mannose metabolism	ko00270Cysteine and methionine metabolism
ko00052Galactose metabolism	ko00280Valine, leucine and isoleucine degradation
ko00053Ascorbate and aldarate metabolism	ko00290Valine, leucine and isoleucine biosynthesis
ko00500Starch and sucrose metabolism	ko00300Lysine biosynthesis
ko00510N-Glycan biosynthesis	ko00310Lysine degradation
ko00511Other glycan degradation	ko00330Arginine and proline metabolism
ko00520Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	ko00340Histidine metabolism
ko00562Inositol phosphate metabolism	ko00350Tyrosine metabolism
ko00620Pyruvate metabolism	ko00360Phenylalanine metabolism
ko00650Butanoate metabolism	ko00410Beta-Alanine metabolism
ko00660C5-Branched dibasic acid metabolism	ko00430Taurine and hypotaurine metabolism
ko00630Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	ko00440Phosphonate and phosphinate metabolism
ko00640Propanoate metabolism	ko00450Selenocompound metabolism
ko00910Nitrogen metabolism	ko00460Cyanoamino acid metabolism
ko00920Sulfur metabolism	ko00480Glutathione metabolism
ko00190Oxidative phosphorylation	ko00531Glycosaminoglycan degradation
ko00195Photosynthesis	ko00540Lipopolysaccharide biosynthesis
ko00196Photosynthesis - antenna proteins	ko00550Peptidoglycan biosynthesis
ko00680Methane metabolism	ko00670One carbon pool by folate
ko00710Carbon fixation in photosynthetic organisms	ko00730Thiamine metabolism
ko00720Carbon fixation pathways in prokaryotes	ko00740Riboflavin metabolism
ko01040Biosynthesis of unsaturated fatty acids	ko00750Vitamin B6 metabolism
ko00061Fatty acid biosynthesis	ko00760Nicotinate and nicotinamide metabolism
ko00071Fatty acid degradation	ko00770Pantothenate and CoA biosynthesis
ko00100Steroid biosynthesis	ko00780Biotin metabolism
ko00120Primary bile acid biosynthesis	ko00785Lipoic acid metabolism
ko00121Secondary bile acid biosynthesis	ko00790Folate biosynthesis
ko00140Steroid hormone biosynthesis	ko00830Retinol metabolism
ko00561Glycerolipid metabolism	ko00860Porphyrin metabolism
ko00564Glycerophospholipid metabolism	ko01051Biosynthesis of ansamycins
ko00591Linoleic acid metabolism	ko01053Biosynthesis of siderophore group nonribosomal peptides
ko00600Sphingolipid metabolism	

ko01055Biosynthesis of vancomycin group antibiotics	ko03015mRNA surveillance pathway
ko01056Biosynthesis of type II polyketide backbone	ko03018RNA degradation
ko00900Terpenoid backbone biosynthesis	ko03050Proteasome
ko00903Limonene degradation Title changed!	ko03060Protein export
ko00906Carotenoid biosynthesis	ko04122Sulfur relay system
ko00908Zeatin biosynthesis	ko04141Protein processing in endoplasmic reticulum
ko00253Tetracycline biosynthesis	ko03030DNA replication
ko00902Monoterpenoid biosynthesis	ko03410Base excision repair
ko00521Streptomycin biosynthesis	ko03420Nucleotide excision repair
ko00524Neomycin, kanamycin and gentamicin biosynthesis	ko03430Mismatch repair
ko00941Flavonoid biosynthesis	ko03440Homologous recombination
ko00943Isoflavonoid biosynthesis	ko03450Non-homologous end-joining
ko00960Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	ko02060Phosphotransferase system (PTS)
ko00965Betain biosynthesis	ko02010ABC transporters
ko00311Penicillin and cephalosporin biosynthesis	ko03070Bacterial secretion system
ko00361Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation	ko04310Wnt signaling pathway
ko00362Benzoate degradation	ko02020Two-component system
ko00363Bisphenol degradation	ko04020Calcium signaling pathway
ko00364Fluorobenzoate degradation	ko04142Lysosome
ko00380Tryptophan metabolism	ko04144Endocytosis
ko00400Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	ko04146Peroxisome
ko00621Dioxin degradation	ko04112Cell cycle - Caulobacter
ko00622Xylene degradation	ko04113Meiosis - yeast
ko00623Toluene degradation	ko04210Apoptosis
ko00624Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation	ko05111Biofilm formation - Vibrio cholerae
ko00625Chloroalkane and chloroalkene degradation	ko02030Bacterial chemotaxis
ko00627Aminobenzoate degradation	ko02040Flagellar assembly
ko00633Nitrotoluene degradation	ko04621NOD-like receptor signaling pathway
ko00643Styrene degradation	ko04614Renin-angiotensin system
ko00791Atrazine degradation	ko04910Insulin signaling pathway
ko00930Caprolactam degradation	ko04626Plant-pathogen interaction
ko00980Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	ko00130Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis
ko00983Drug metabolism - other enzymes	ko04974 Protein digestion and absorption
ko03020RNA polymerase	
ko00970Aminoacyl-tRNA biosynthesis	
ko03008Ribosome biogenesis in eukaryotes	
ko03010Ribosome	
ko03013Nucleocytoplasmic transport	