



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

---

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**EFFECTO DE DOS PROBIÓTICOS SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA DE UN SISTEMA BIOFLOC Y SU IMPACTO EN LA SUPERVIVENCIA Y CRECIMIENTO DE LA TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)**

**T E S I S**

**(Idónea Comunicación de Resultados)**

**Que para obtener el grado de**

**Maestra en Ciencias Agropecuarias**

**P R E S E N T A**

**Biól. Kathia Cienfuegos Martínez**

**COMITÉ TUTORAL:**

Directora:

**Dra. María del Carmen Monroy Dosta**

Codirectora:

**Dra. Aida Hamdan Partida**

Asesor:

**Dr. Jorge Castro Mejía**

Ciudad de México, a 11 de abril de 2018.

**La Biól. Kathia Cienfuegos Martínez, del programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias, agradece el apoyo económico otorgado como beca por el CONACYT con el No. de CVU: 763372 durante el periodo comprendido entre Mayo de 2016 a Abril de 2018.**

## Resumen

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de dos probióticos sobre la composición de la comunidad bacteriana en un sistema Biofloc utilizando melaza como fuente de carbono. Se utilizaron 135 tilapias con un peso promedio inicial de  $7.08 \pm 0.17$ g y una longitud total de  $7.47 \pm 0.16$ cm. Los peces se cultivaron en contenedores de plástico de 100L utilizando tres dietas experimentales: Biofloc como control; Biofloc enriquecido con *Bacillus subtilis*; Biofloc enriquecido con *Rhodococcus* sp. Cada 15 días se obtuvo el peso y talla, así como los parámetros de calidad de agua. Para la extracción del DNA se tomó 1L de agua de cada tratamiento (fase inicial, media y final). Las muestras se enviaron al IMR para secuenciación masiva de la región V4-V5 del 16S rRNA. El análisis bioinformático se realizó con los programas MOTHUR y STAMP. Se obtuvieron 20 Filos de los cuales los más abundantes fueron: Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia y Fusobacteria para todos los tratamientos. La comunidad bacteriana presentó variaciones en los diferentes periodos de experimentación, al inicio fue similar en todos los casos mientras que en la fase final *Rhodococcus* sp. se separó del grupo al variar en su composición. Los probióticos no tuvieron efecto significativo en el crecimiento, pero mejoraron la supervivencia de las tilapias.

**Palabras clave:** Biofloc, probióticos, secuenciación masiva, *Oreochromis niloticus*

## Abstract

The main goal of this study was to evaluate the effect of two probiotics on bacterial community composition of Biofloc system using molasses as carbon source. 135 tilapia organisms with an initial mean weight of  $7.08 \pm 0.17$ g and a total length of  $7.47 \pm 0.16$ cm were used for the present study. The fish were cultivated in plastic containers of 100L testing three experimental diets: Biofloc as control, Biofloc enriched with *Bacillus subtilis* and Biofloc enriched with *Rhodococcus* sp. Every 15 days, weight and length, as well as water quality parameters were analyzed. For DNA extraction, 1L of water was extracted from each treatment (initial, middle and final phase). The samples were sent to IMR to make the massive sequencing of the region V4-V5 from 16S rRNA. The bioinformatic analysis was made with MOTHUR and STAMP programs. 20 phyla were obtained, from which the most abundant were: Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia and Fusobacteria from each treatment. Bacterial community showed variations in different periods, at the beginning were similar in all the cases, while at the end *Rhodococcus* sp. was different because it showed variations in the composition. The probiotics did not show significant effects in growth but improved the tilapia organism's survival.

**Key words:** Biofloc, probiotics, massive sequencing, *Oreochromis niloticus*

# Índice

| Contenido   | Página |
|---|--------|
| <b>1. Introducción</b> .....  | 1      |
| <b>2. Planteamiento del problema</b> .....  | 2      |
| <b>3. Hipótesis</b> .....   | 2      |
| <b>4. Objetivos</b> .....   | 2      |
| 4.1 Objetivo general.....   | 2      |
| 4.2 Objetivos particulares .....  | 2      |
| <b>5. Marco de referencia</b> .....   | 1      |
| 5.1 Producción acuícola en el mundo.....  | 1      |
| 5.2 Producción acuícola en México .....   | 1      |
| 5.3 Producción de la tilapia en el mundo .....                                    | 2      |
| 5.4 Producción de tilapia en México .....   | 3      |
| 5.5 Problemáticas en la acuicultura .....   | 4      |
| 5.5.1 Agua .....  | 5      |
| 5.5.2 Alimento.....   | 5      |
| 5.6 Sistema convencional y Sistema Biofloc.....                                   | 5      |
| 5.7 Beneficios de la tecnología Biofloc .....                                     | 6      |
| 5.7.1 Reducción del uso de agua .....   | 6      |
| 5.7.2 Biofloc en la alimentación .....  | 6      |
| 5.7.3 Control de patógenos.....   | 7      |
| <b>6. Marco Teórico</b> .....   | 8      |
| 6.1 Acuicultura .....   | 8      |
| 6.2 Tilapia del Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).....                        | 8      |
| 6.2.1 Clasificación taxonómica .....  | 8      |
| 6.2.2 Requerimientos ambientales .....  | 9      |
| 6.3 Biofloc .....   | 9      |
| 6.3.1 Composición de los Flóculos .....   | 10     |
| 6.3.2 Importancia de las comunidades microbianas en los sistemas de cultivo ..... | 10     |
| 6.3.3 Bacterias heterótrofas.....   | 11     |
| 6.4 Probióticos .....   | 12     |

|  |            |
|--|------------|
| 6.4.1 Definición .....   | 12         |
| 6.4.2 Características .....  | 12         |
| 6.4.2 Mecanismos de acción .....   | 13         |
| 6.4.3.1 <i>Bacillus subtilis</i> .....   | 14         |
| 6.4.3.2 <i>Rhodococcus</i> sp. ....  | 15         |
| 7. Materiales y Métodos .....  | 17         |
| 7.1 Obtención de los peces .....   | 17         |
| 7.2 Obtención de las cepas probióticas .....   | 17         |
| 7.3 Diseño experimental .....  | 17         |
| 7.4 Extracción de DNA de la comunidad bacteriana en Biofloc.....                         | 19         |
| 7.4.1 Extracción del DNA.....  | 19         |
| 7.4.2 Purificación de DNA con Silica Extraction Kit (Gene Reach Biotechnology Corp)..... | 19         |
| 7.4.3 Secuenciación masiva por Illumina .....  | 20         |
| 7.4.4 Análisis Bioinformático.....   | 20         |
| 7.5 Crecimiento y supervivencia de <i>Oreochromis niloticus</i> .....                    | 21         |
| 7.6 Valoración de la calidad de agua y de sólidos sedimentables .....                    | 21         |
| 7.7 Análisis estadístico .....   | 21         |
| <b>8. Resultados</b> .....   | <b>22</b>  |
| 8.1 Comunidades bacterianas .....  | 22         |
| 8.2 Parámetros de calidad de agua y sólidos sedimentables .....                          | 26         |
| 8.3 Crecimiento de Tilapias .....  | 27         |
| <b>9. Discusión</b> .....  | <b>28</b>  |
| <b>10. Conclusiones</b> .....  | <b>32</b>  |
| <b>11. Agradecimientos</b> .....   | <b>33</b>  |
| <b>12. Referencias bibliográficas</b> .....  | <b>34</b>  |
| <b>13. Artículo</b> .....  | <b>525</b> |

## 1. Introducción

La tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) se ha convertido en México en una especie de gran importancia económica ya que para el 2016, se reportó una producción de 117 mil 806 toneladas con un incremento del 15% con relación al año anterior (SAGARPA, 2016). Es una especie con un amplio rango de tolerancia a las variaciones ambientales, de fácil de reproducción y con la posibilidad de cultivarse en diversos sistemas acuícolas (El-Sayed, 2006). Sin embargo, no está exenta de presentar problemas asociados con enfermedades o deficiencias nutricionales, lo que representa un factor limitante para el incremento de su producción (Del-Pozo *et al.*, 2016; Tsofack *et al.*, 2016). Al mismo tiempo la intensificación productiva ha generado una preocupación sobre el impacto ambiental que genera la actividad, por la descarga de los efluentes, ricos en materia orgánica, químicos, antibióticos y hormonas que son utilizados en el cultivo y que impactan sobre el ecosistema (Espinoza y Bermudez, 2011). Lo anterior ha conducido al desarrollo de nuevos sistemas de producción con menor impacto ambiental (Ahmad *et al.*, 2017; Bossier y Ekasari, 2017), Tal es el caso de la tecnología Biofloc, la cual está basada en la generación de flóculos microbianos a partir de una fuente externa de carbono, donde las bacterias heterótrofas que se desarrollan tienen funciones relevantes en el reciclaje del carbono y el nitrógeno (presentes en la materia orgánica), en la biodisponibilidad de nutrientes, el mejoramiento de la calidad del agua, el control de enfermedades y la nutrición de los organismos cultivados (Avnimelech, 2009; Beardsley *et al.*, 2011).

Por otra parte, el uso de aditivos probióticos en acuicultura se ha incrementado como una alternativa al uso de químicos y antibióticos para el control de enfermedades; diversos estudios han demostrado que contribuyen al balance microbiano intestinal, incrementan la respuesta inmunológica y mejoran la asimilación de nutrientes lo que conlleva a mejorar la supervivencia y crecimiento de las especies cultivadas (Gutiérrez *et al.*, 2016). Con base en lo anterior, la comunidad científica asegura que la manipulación controlada de las comunidades microbianas puede en muchos casos ser beneficiosa en los sistemas productivos (Emerenciano *et al.*, 2014) y en años recientes diversas investigaciones se han enfocado en el uso de sistemas de cultivo Biofloc y la inclusión de aditivos probióticos tratando de incrementar los beneficios obtenidos al utilizar estas biotecnologías por separado, sin embargo; se desconoce la dinámica de las comunidades microbianas asociados a los flóculos, los grupos taxonómicos implicados, las variaciones que se puedan dar al integrar bacterias probióticas al sistema y su efecto en los organismos cultivados. Por lo que el objetivo de esta investigación es comparar el

efecto de dos aditivos probióticos sobre la composición de la comunidad bacteriana en un sistema Biofloc y su efecto crecimiento de *Oreochromis niloticus*.

## **2. Planteamiento del problema**

¿Cómo influyen los probióticos en la diversidad y abundancia de la comunidad bacteriana producida en un sistema de cultivo de tilapia con la Tecnología Biofloc y mejorará la supervivencia y crecimiento de los organismos cultivados, al alimentarse de zooplancton enriquecido con bacterias heterótrofas?

## **3. Hipótesis**

La adición de probióticos aumentará la diversidad y abundancia bacteriana en Biofloc con cultivo de Tilapia, permitiendo que los organismos incrementen su talla al doble y que mantengan su supervivencia en un 90%.

## **4. Objetivos**

### **4.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de dos probióticos (*Rhodococcus* sp. y *Bacillus subtilis*) en la composición bacteriana de un sistema Biofloc sobre la supervivencia y crecimiento de Tilapia.

### **4.2 Objetivos particulares**

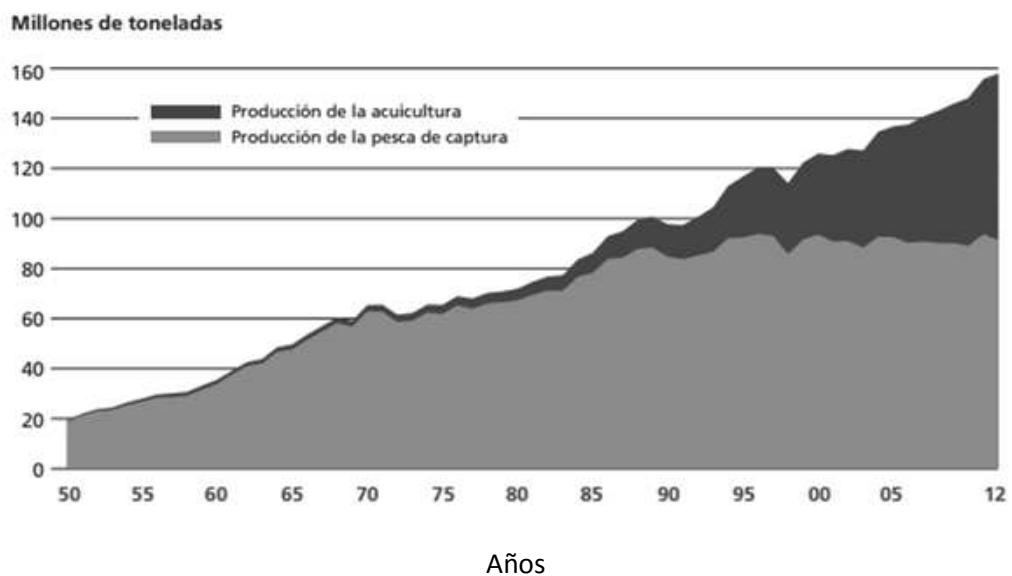
- Determinar las comunidades bacterianas asociadas al Biofloc.
- Determinar el efecto de la adición de dos probióticos sobre la comunidad bacteriana asociada al Biofloc.
- Estimar la supervivencia y tasa de crecimiento (talla y peso) de *Oreochromis niloticus*.

## 5. Marco de referencia

### 5.1 Producción acuícola en el mundo

A nivel mundial, la acuicultura se ha convertido en una importante industria proveedora de alimentos de alto valor nutricional y generadora de empleos e ingresos en los países tanto desarrollados y en vías de desarrollo. La pesca de captura y la acuicultura suministraron al mundo unos 148 millones de toneladas de pescado en 2012, con un valor total de 217 500 millones de USD (Fig. 1). De ellos, aproximadamente 128 millones de toneladas métricas (TM) se destinaron al consumo humano y de estas, 59.9 millones de TM provinieron de la acuicultura (FAO, 2012).

Fig. 1 Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura



(FAO, 2014)

### 5.2 Producción acuícola en México

En México, la acuicultura nace como una actividad complementaria de apoyo social a las comunidades rurales, con lo cual se pretendía incrementar el consumo de proteína animal y mejorar así los niveles nutricionales de la población, aunque esta actividad se ha diversificado más hacia peces dulce acuícolas también se lleva a cabo en especies marinas (FAO, 2005). Desde sus inicios, la acuicultura ha trascendido por diferentes etapas de desarrollo, siguiendo tres vertientes principales, la acuicultura de autoconsumo destinadas al cultivo de diferentes especies de tilapia y carpa; la acuicultura realizada en embalses de mediana y gran escala para el cultivo de carpa, tilapia, bagre y lobina entre otros y los

sistemas controlados principalmente de camarón, tilapia, trucha, atún, ostión y bagre practicada con fines de comercialización y el requerimiento de grandes inversiones (FAO, 2005).

De acuerdo con el Anuario Estadístico de Pesca 2013, se indica una producción de 242,771 toneladas con un valor económico estimado de 7, 568, 180,000 de pesos. Las especies con mayor producción fueron la mojarra, camarón, ostión, carpa, entre otros (Cuadro 1). Los principales estados productores en la acuicultura son: Baja California, Sonora, Sinaloa y Tamaulipas (FAO, 2005).

**Cuadro 1.** Volumen y valor de la producción pesquera de acuicultura, según principales especies.

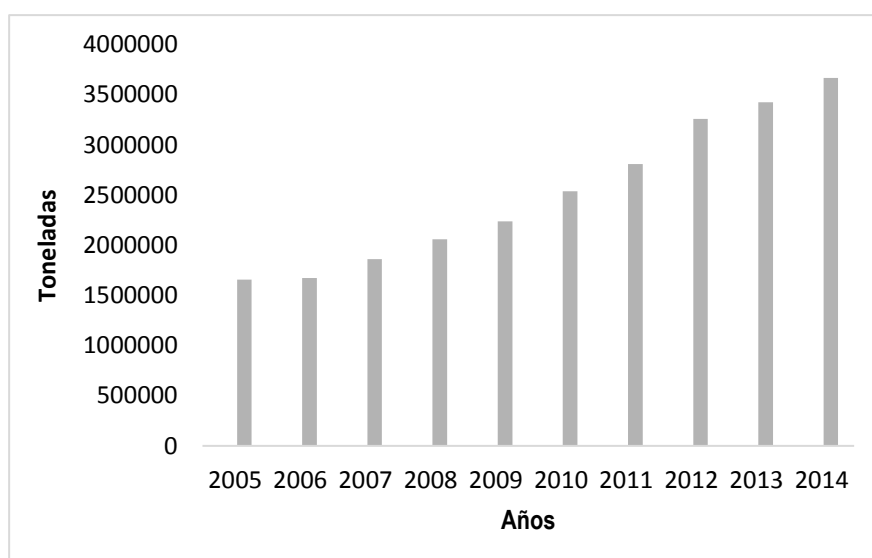
| <b>Especies</b> | <b>Volumen (toneladas)</b> | <b>Valor (millones de pesos)</b> |
|-----------------|----------------------------|----------------------------------|
| <b>Total</b>    | <b>242,771</b>             | <b>7,568,180</b>                 |
| Camarón         | 60,191                     | 3,925,479                        |
| Tilapia         | 94,575                     | 1,766,060                        |
| Ostión          | 38,669                     | 150,394                          |
| Carpa           | 26,545                     | 381,960                          |
| Trucha          | 6,693                      | 398,443                          |
| Atún            | 6,238                      | 547,425                          |
| Bagre           | 5,304                      | 186,201                          |
| Charal          | 1,634                      | 18,792                           |
| Lobina          | 430                        | 13,215                           |
| Langostino      | 53                         | 5,265                            |
| Otros           | 2,440                      | 174,945                          |

(CONAPESCA, 2013).

### **5.3 Producción de la tilapia en el mundo**

La producción de tilapia a nivel mundial se ha ido incrementando desde el 2005 como se muestra en la Fig. 2. Los principales países productores de Tilapia en el mundo son China, México, Tailandia, Filipinas, Taiwán, Brasil e Indonesia, de los cuales el principal productor y exportador es China al obtener en el 2009 una producción de 1 150 000 toneladas (CONAPESCA, 2012).

**Fig. 2** Producción mundial de Tilapia



(FAO, 2014)

#### **5.4 Producción de tilapia en México**

En México, la tilapia procedente de EUA fue introducida en 1964, el primer registro de producción se da en 1970 con un volumen de 200 toneladas. De acuerdo con CONAPESCA (2012), la producción de esta especie se ha mantenido a la par que los sistemas controlados de esta especie (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Volumen (ton) de producción total y de sistemas controlados.

| <b>Año</b> | <b>Volumen total</b> | <b>Sistemas controlados</b> |
|------------|----------------------|-----------------------------|
| 2000       | 71 702               | 1598                        |
| 2001       | 68 476               | 2743                        |
| 2002       | 61 751               | 793                         |
| 2003       | 61 516               | 964                         |
| 2004       | 67 839               | 1901                        |
| 2005       | 67 993               | 2286                        |
| 2006       | 69 214               | 2929                        |
| 2007       | 73 580               | 4947                        |
| 2008       | 71 018               | 3789                        |
| 2009       | 73 373               | 4251                        |
| 2010       | 76 986               | 8264                        |
| 2011       | 75 927               | 10082                       |

(CONAPESCA, 2012)

### **5.5 Problemáticas en la acuicultura**

Si bien, la acuicultura se ha mantenido en los últimos años en un crecimiento constante anual de casi el 10%, esta actividad no está exenta de dificultades. Para poder aumentar su producción requiere resolver diversos problemas que son inherentes a su actividad, como es incrementar áreas para su instalación, conducción del agua, construcción de estanques y drenajes para el desalojo de aguas residuales. Asociado a esto, las prácticas referentes a la acuicultura impactan en el medio ambiente a través tres procesos como: el consumo de recursos, el proceso de transformación y la generación del producto final (Buschmann, 2007).

### **5.5.1 Agua**

La intervención intensiva que generan las prácticas acuícolas va degradando el medio ambiente, primero por la utilización del agua ya que recibe grandes cantidades de desechos, como el alimento no consumido por los peces, productos de excreción, materias fecales, químicos, hasta microorganismos y parásitos; segundo porque se introducen antibióticos y sustancias químicas al ecosistema, necesarias para realizar la actividad. Este impacto tiene un costo ambiental, económico y social (Buschmann, 2007). Una parte importante de estos desechos va al fondo y otro porcentaje queda en la columna de agua, causando que compuestos como fósforo, carbono y nitrógeno, entre otros, permanezcan como materia suspendida, o como químicos disueltos. Durante mucho tiempo, el método más común para resolver esta problemática ha sido la sustitución continua de agua del estanque con agua fresca externa. Sin embargo, el volumen de agua necesario, incluso para pequeños a medianos sistemas de acuicultura puede alcanzar hasta varios cientos de metros cúbicos por día, por lo que el agua se convierte en un factor limitante de la actividad (Borja, 2002).

### **5.5.2 Alimento**

En cualquier empresa de acuicultura intensiva el alimento es uno de los principales insumos requeridos y de mayor costo, con la desventaja que un 60% del alimento que se suministra no es aprovechado por los organismos, lo que ha significado que pequeños granjeros no puedan mantener su negocio y que la producción de los organismos en cultivo se sustente cada vez más de una fuente exógena de alimento. Como consecuencia, la producción se ha desarrollado basada en la industria de harina de pescado (Hargreaves, 2013).

## **5.6 Sistema convencional y Sistema Biofloc**

Los sistemas convencionales de producción acuícola han comenzado a descender en los últimos años, principalmente por el uso de grandes cantidades de agua que día a día es más escasa, aumento en la contaminación ocasionada por los afluentes de descarga, incremento del costo de alimento y desperdicio del mismo y diversos factores ambientales. Por lo que hoy en día se está desarrollando un fuerte interés por el uso de sistemas más amigables con el ambiente y que sean rentables. En ese sentido, uno de los sistemas de producción que ha llamado la atención es el uso de la Tecnología Biofloc (BFT), la cual aprovecha la acumulación de residuos de alimentos, materia orgánica y compuestos inorgánicos tóxicos a través de microorganismos que se encuentran en el medio acuático (Collazos, 2015).

## **5.7 Beneficios de la tecnología Biofloc**

### **5.7.1 Reducción del uso de agua**

Comparando con los sistemas de producción convencionales usados en la acuicultura, la BFT proporciona una alternativa más económica, disminuyendo los costos de tratamiento de agua hasta en un 30%. El funcionamiento normal de los estanques está basado en el intercambio de agua (por lo general un 10 % por día) como método para controlar la calidad del agua. En contraste el Sistema Biofloc puede operar con un bajo intercambio de agua con tasas de 0,5 a 1% por día, mientras se mantenga suficiente aireación para mantener en suspensión los flóculos (Crab *et al.*, 2009).

En cuanto al mantenimiento de la calidad del agua se encuentra regulado por la comunidad bacteriana lo cual se logra utilizando una alta relación de carbono-nitrógeno (C: N) para garantizar mejor crecimiento de las bacterias heterótrofas, esto se logra añadiendo una fuente de carbono que son a menudo subproductos derivados de la industria de la alimentación humana y/o animal (Asaduzzaman *et al.*, 2010, Samocha *et al.*, 2007).

### **5.7.2 Biofloc en la alimentación**

La expansión masiva de la acuicultura en las últimas décadas ha comenzado a hacer frente a algunas limitaciones importantes, como el aumento de los precios de la harina de pescado, la principal materia prima de la dieta de la acuicultura. Sin embargo, la presión causada en las poblaciones naturales (sobrepesca) ha agotado la producción de harina de pescado y una consecuencia es el aumento continuo de los precios. Se ha reportado que la cantidad de harina de pescado usado para la alimentación tuvo un crecimiento en 2006 de 23 000 a 78 mil toneladas. En este contexto, la industria de la acuicultura necesita obtener fuentes alternativas de proteínas para sustituir el uso de las harinas de pescado (Crab *et al.*, 2012; Avnimelech, 2012).

Como una alternativa para hacer frente a esta problemática la Tecnología Biofloc se muestra promisorio ya que en este tipo de sistemas se desarrollan una amplia gama de microorganismos como bacterias, fitoplancton, agregados de materia orgánica, además de rotíferos, ciliados, protozoos y copépodos que forman macroagregados (Biofloc), los cuales son una rica fuente natural de proteína-lípido "*in situ*" disponible las 24 horas del día. Con lo anterior se sabe que la ganancia de alimentación

potencial con esta tecnología es de 10 a 20%, con la consecuente reducción de costos de alimentación de entre el 40 a 50 % (Azim *et al.*, 2008; Hargreaves, 2013; Poleo *et al.*, 2011).

En cuanto a la calidad nutricional de Biofloc, se considera que es buena para el cultivo de organismos acuáticos ya que el contenido de proteína es de 25 a 50% y el contenido de grasa oscila de 0.5 a 15 por ciento (Emerenciano *et al.*, 2013).

### **5.7.3 Control de patógenos**

Las enfermedades infecciosas son la causa mayoritaria de las numerosas pérdidas económicas en acuicultura. Muchas enfermedades causan mortalidades superiores al 90% en granjas. Mientras que en determinadas circunstancias los antibióticos pueden proporcionar un medio útil para ayudar a controlar algunas enfermedades bacterianas, hay muchos problemas asociados con su uso. La aplicación inadecuada de antibióticos ha dado lugar al desarrollo de resistencia a los mismos. Como consecuencia, existe una necesidad urgente de técnicas de control alternativo más sostenible (Defoirdt *et al.*, 2007). La Tecnología Biofloc puede ser una nueva estrategia para el control de patógenos en contraste con los enfoques convencionales ya que se ha confirmado que existe un efecto de exclusión competitiva por parte de las bacterias probióticas frente a otros grupos microbianos porque secretan una gran variedad de exoenzimas y polímeros que generan un ambiente hostil a bacterias, sobre todo patógenas (Monroy *et al.*, 2015).

Este potencial probiótico, puede deberse a que en las heces se libera parte de la microbiota intestinal que al estar en un medio nutritivo, permite su proliferación y con ello que las especies cultivadas aprovechen los beneficios que éstos microorganismos proveen (Crab *et al.*, 2010), dentro de los beneficios que se obtienen, se pueden señalar el incremento en la asimilación de nutrientes lo que se refleja en mayor sobrevivencia y crecimiento de las especies cultivadas, así mismo se incrementa la respuesta inmune para hacer frente a los procesos infecciosos. También se ha mencionado que existe un efecto de exclusión competitiva por parte de las bacterias probióticas frente a otros grupos microbianos ya que secretan una gran variedad de exoenzimas y polímeros que generan un ambiente hostil a bacterias, sobre todo patógenas (Monroy *et al.*, 2015).

## 6. Marco Teórico

### 6.1 Acuicultura

La acuicultura se refiere a la producción o cultivo de organismos acuáticos, pertenecientes a distintos grupos de peces, crustáceos, moluscos y plantas. Ésta actividad implica la intervención del hombre en el proceso tanto de cría o cultivo y le ofrece alternativas alimenticias y amplias oportunidades de negocio (Rodríguez *et al.*, 2001).

En los últimos años ha ido en aumento el consumo de productos acuícolas. Algunas de las principales especies que se consumen son: camarón, tilapia, ostión, carpa, trucha, atún, bagre, charal, lobina y langostino (FAO, 2005).

### 6.2 Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*)

La tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Figura 3), es un pez nativo de África, una de las especies más importantes dentro del grupo de peces de aguas cálidas, considerada como predominante en el comercio a nivel mundial. Esta especie tiene varias cualidades a diferencia de otras especies de peces ya que su crecimiento es rápido, también es tolerante a altas densidades, se adapta al cautiverio, acepta una amplia gama de alimentos, es resistente a enfermedades, además cuenta con atributos para su venta como: carne blanca de buena calidad, buen sabor, poca espina, buena talla y precio accesible, además de que es una especie muy nutritiva por ser una fuente vital de proteínas y nutrientes esenciales lo que le confiere una preferencia y demanda comercial en la acuicultura mundial (Gómez *et al.*, 2003).

#### 6.2.1 Clasificación taxonómica

**Orden:** Perciformes Bleeker, 1859

**Familia:** Cichlidae Heckel, 1840

**Género:** *Oreochromis*

**Especie:** *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

Figura 3. Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*)



<https://www.bigfish.mx>

## 6.2.2 Requerimientos ambientales

Para el óptimo desarrollo de la tilapia se requiere que en el sitio de cultivo se mantengan los requerimientos medio ambientales en los siguientes valores:

- **Temperatura:** Los rangos óptimos de temperatura oscilan entre 20-30 °C, pero pueden soportar menor temperatura y a menos de 15 °C la Tilapia no crece. La reproducción se da con éxito a temperaturas entre 26-29 °C. Los límites superiores de tolerancia oscilan entre 37-42 °C (Soto, 2010).
- **Oxígeno Disuelto:** Soporta bajas concentraciones, aproximadamente 1 mg/l, e incluso en períodos cortos valores menores. A menor concentración de oxígeno el consumo de alimento se reduce, por consiguiente el crecimiento de los peces también se reduce. Lo más conveniente son valores mayores de 2 o 3 mg/l (Gómez *et al.*, 2003).
- **pH:** Los valores óptimos de pH son entre 7 y 8. No pueden tolerar valores menores de 5, ya que los niveles de pH de 4 a 0 son casi letales o subletales, provocando disminución de la presión osmótica, y aumenta los hematocritos, la concentración de proteína plasmática y la viscosidad de la sangre (Portz *et al.*, 2006) aunque sí pueden resistir valores alcalinos de 11 (Soto, 2010).

## 6.3 Biofloc

La tecnología “biofloc” (BFT en inglés) está basada en un mínimo o cero recambios de agua, menos efectos negativos al ambiente y además producir, como beneficio adicional, proteína microbiana que puede ser utilizada como alimento. De acuerdo con Emerenciano *et al.* (2011), esta tecnología fue desarrollada en los años 70 por Ifremer-COP (French Research Institute for Exploitation of the Sea, Oceanic center of Pacific) con diferentes especies incluidas *Penaeus monodon*, *Fenneropenaeus merguensis*, *Litopenaeus vannamei* y *L. stylirostris*.

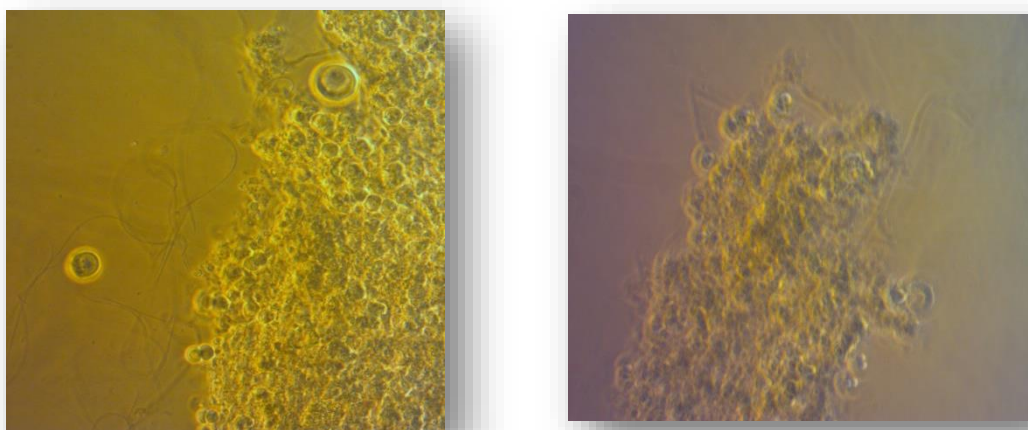
En el sistema Biofloc se forman flóculos microbianos por medio de una adición de carbono al cuerpo de agua, se requiere una relación 20:1 es decir 20 unidades de carbono para asimilar una unidad de nitrógeno. Se puede utilizar melaza, harina de arroz, café, moringa, tapioca, etc. Los microorganismos desarrollados en el Biofloc tienen dos principales funciones, que son: 1) mantener la calidad del agua por la transformación de nitrógeno tóxico en proteína microbiana y 2) como alimento, ya que estos

microorganismos servirán como fuente de alimento natural para los animales en cultivo (Emerenciano *et al.*, 2013).

### 6.3.1 Composición de los Flóculos

Se ha observado que la composición de los flóculos está constituida por un 60 a 70% de materia orgánica, que incluye bacterias heterótrofas, microalgas, protozoarios, rotíferos, y de 30 a 40% de materia inorgánica como coloides, polímeros orgánicos, cationes y células muertas los cuales son consumidos por los organismos en cultivo como fuente de proteína (Schryver *et al.*, 2008).

Cada bioflóculo se mantiene unido ya sea por la producción de polisacáridos extracelulares, por los microorganismos filamentosos, o la atracción electrostática. Los grandes bioflóculos pueden ser observados a simple vista, aunque la mayoría son microscópicos de alrededor de 50 a 200 micras como se muestra en la Figura 4 (Azim y Little, 2008).



**Figura 4.** Flóculos observados con microscopio óptico (40x) (Fuente propia)

### 6.3.2 Importancia de las comunidades microbianas en los sistemas de cultivo

Las comunidades microbianas están formadas por poblaciones de células de varias especies; que interactúan entre sí desarrollando múltiples actividades funcionales al interior de la comunidad y con su hospedero (Díaz y Wachter, 2003). En los últimos años en la acuicultura de camarones y peces se han aprovechado los consorcios microbianos como fuente de alimento, así como en el mejoramiento del ambiente de cultivo (Becerra *et al.*, 2014).

Los microorganismos que forman las comunidades microbianas en Biofloc tales como bacterias heterótrofas, microalgas y zooplancton pueden ser consumidos por los animales en cultivo, es decir, que sirven como fuente de proteína y por ende los costos de alimentación se reducirán en más del 25% (Monroy *et al.*, 2013).

### 6.3.3 Bacterias heterótrofas

Se ha reportado que cianobacterias como *Microcoleus chthonoplastes*, *Spirulina sp.*, *Oscillatoria sp.*, *Schizothrix sp.*, *Calothrix sp.*, *Phormidium sp.*, entre otras pueden transformar el nitrógeno amoniacal en compuestos con toxicidad baja; incluso algunas de ellas transforman el nitrógeno amoniacal en biomasa microbiana. Además, algunas de estas bacterias tienen la capacidad de descomponer y asimilar desechos orgánicos como heces, alimento no consumido y organismos muertos (Ebeling *et al.*, 2006). Tanto en sistemas convencionales como en sistema Biofloc podemos encontrar tanto bacterias heterótrofas, aunque en sistemas convencionales tardaran mucho más en establecerse ya que no hay una fuente de carbono externa y además se estará cambiando el agua constantemente y por ende no habrá una comunidad bacteriana estable. En la figura 5 se muestra cómo se generan las comunidades bacterianas por una adición de una fuente de carbono externo y cómo las bacterias heterótrofas transforman el nitrógeno tóxico a uno menos tóxico (Avnimelech, 2009).

Figura 5. Esquema del sistema convencional y sistema Biofloc



(Tomado de Monroy *et al.*, 2015)

La presencia constante de bacterias heterótrofas está asociada al fitoplancton ya que se ha determinado que el aumento bacteriano se produce por la utilización de fitoplancton muerto y detritus (Ebeling *et al.*, 2006).

## **6.4 Probióticos**

### **6.4.1 Definición**

La palabra probiótico se acuñó en el año 1965, por Lilly y Stillwell quienes la definieron como un factor de origen microbiológico que estimula el crecimiento de otros organismos. Actualmente existen varias definiciones para el término probiótico; de acuerdo con FAO (2002) son “microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrados en cantidades adecuadas”. Sin embargo, el concepto para acuicultura va más apegado a lo propuesto por Villamil y Martínez en 2009, donde hacen referencia a los probióticos como “microorganismos vivos que al ser administrados como suplemento en la dieta pueden llegar a causar modificaciones en la microbiota gastrointestinal del hospedador y generar efectos benéficos como un aumento en la conversión alimentaria, en calidad del agua y a resistencia a enfermedades, todo esto con el objetivo de mejorar la salud en los animales”.

### **6.4.2 Características**

De acuerdo con Gutiérrez (2013), para que un microorganismo sea designado como probiótico debe cumplir lo siguiente:

1. Ser seguro para el animal, es decir, que no cause enfermedad.
2. Tener resistencia al pH gástrico y a las sales biliares.
3. Capacidad de colonización del intestino. Esto es necesario para lograr una exclusión competitiva eficaz.
4. Capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos tanto Gram positivos como Gram negativos, al producir ácidos u otras sustancias que inhiban su crecimiento.
5. Tener un corto tiempo de reproducción.
6. Ser estables al contacto con bilis, ácido, enzimas y oxígeno.

7. Estables y viables durante el almacenaje. Hay que tener en cuenta si el microorganismo usado es aerobio o anaerobio para conservarlo adecuadamente.

## 6.4.2 Mecanismos de acción

Los probióticos ejercen diversas acciones sobre la salud del huésped, mediante distintos mecanismos de acción como, la prevención y el tratamiento de trastornos gastrointestinales de diversa etiología, la estimulación de la respuesta inmunitaria, la segregación de sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, la producción de enzimas que inducen la absorción y mejoran la nutrición, el mejoramiento de la digestión, , así como la unión a los receptores intestinales, de esta forma se mantiene la microbiota intestinal y evitan la acción de gérmenes patógenos. Los beneficios antes mencionados se producen por diferentes mecanismos de acción de las bacterias probióticas (Cuadro 3) (Sanz *et al.*, 2003).

**Cuadro 3.** Principales mecanismos de acción de bacterias probióticas.

| <b>Mecanismos de acción</b>                 | <b>Descripción</b>   |
|---|--|
| <b>Colonización de tracto digestivo</b>     | Los microorganismos probióticos presentan la capacidad de adherirse rápidamente al epitelio intestinal a través de moléculas conocidas como adhesinas e impiden que microbios indeseables se adhieran.   |
| <b>Competencia por nutrientes y energía</b> | Los microorganismos están compitiendo constantemente por nutrientes que se encuentran en el medio y por ende compiten por energía. Los colonizadores dominantes son aquellos que presentan sistemas de sideróforos-hierro, esto permite inhibir el crecimiento de otros microorganismos y los priva de dicho elemento. |
| <b>Antagonismo con gérmenes patógenos</b>   | Una de las acciones de los probióticos es proteger la colonización de patógenos. Este mecanismo se lleva a cabo con la producción de ácido láctico o acético producido por los glúcidos  |

provenientes de los alimentos. Se crea un ambiente con pH ácido lo cual limitará el crecimiento de patógenos. También producen bacteriocinas y biocinas que son péptidos con actividad antimicrobiana y con estas inhiben el crecimiento de otros microorganismos competidores.

#### **Estimulación de la inmunidad**

Los probióticos estimulan el sistema inmunitario del huésped, ya que actúan sobre las células implicadas en la inmunidad natural y la específica. Estos microorganismos activan a los macrófagos y favorecen la producción de anticuerpos.

#### **Calidad del agua**

La calidad del agua ha sido asociada especialmente con *Bacillus* sp. Esto ocurre porque las bacterias gram positivas son mejores transformadoras de materia orgánica de nuevo a CO<sub>2</sub> que las bacterias gram negativas.

#### **Promotores de crecimiento**

Las bacterias probióticas permiten la generación de nutrientes que son asimilados a partir de compuestos no digeribles en el tracto gastrointestinal, así como la biodisponibilidad de vitaminas del grupo B, aminoácidos esenciales como la lisina y minerales. Además también algunas bacterias producen enzimas extracelulares que contribuyen con una mejor nutrición del animal en cultivo.

---

(Balcazar *et al.*, 2006)

### **6.4.3.1 *Bacillus subtilis***

Muchas especies y cepas del género *Bacillus* producen un gran número de sustancias con acción antimicrobiana incluyendo antibióticos. La producción de *Bacillus* es de más de 70 antibióticos diferentes, *Bacillus subtilis* (Figura 6) es uno de los productores más importantes de este género, ya que algunos de sus metabolitos muestran actividad antifúngica y/o antibacteriana contra varios microorganismos patógenos (Todorova y Kozhuharova, 2010).

## Clasificación taxonómica

**Clase:** Bacilli

**Orden:** Bacillales

**Familia:** Bacillaceae

**Género:** *Bacillus*

**Especie:** *Bacillus subtilis* (Ehrenberg, 1835)

**Figura 6.** *Bacillus subtilis*



<https://nootriment.com/es/bacillus-subtilis/>

## Generalidades

*Bacillus subtilis* es una bacteria Gram positiva que produce endosporas las cuales son termorresistentes y también resiste factores físicos perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos, produce enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuente de carbono y electrones, produce antibióticos como la bacitracina, polimixina, gramicidina y circulina, fermentan la caseína y el almidón. Este microorganismo es un gran controlador biológico de otras especies. También *B. subtilis* es considerado un probiótico utilizado y recomendado para el uso en animales acuáticos (Günther y Jiménez, 2004).

### 6.4.3.2 *Rhodococcus* sp.

Clasificación taxonómica

**Orden:** Actinomycetales

**Familia:** Nocardiaceae

**Género:** *Rhodococcus* (Zopf, 1891)

**Figura 7.** *Rhodococcus* sp.



<https://www.researchgate.net>

## Generalidades

*Rhodococcus* sp. es un género conformado por un grupo de bacterias aeróbicas pertenecientes a los actinomicetos, Gram-positivos e inmóviles. Se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente, de manera particular en suelos, reservorios de agua, lagos, ríos y otros ambientes acuáticos (Sánchez *et al.*, 2004). Crecen bien a temperaturas de 30 a 37°C, no son motiles y crecen en la mayoría de los medios comunes de uso en el laboratorio. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, tanto en el suelo como en todos los ambientes acuáticos. Algunas cepas pueden ser patógenos del hombre y los animales, pero son raras ya que solo actúan de forma oportunista, el más importante de ellos es *R. equi* (Rabagliati *et al.*, 2005).

El género *Rhodococcus* sp. tiene un alto potencial en biorremediación, presenta una amplia diversidad metabólica, sobre todo a los compuestos hidrófobos, como los hidrocarburos clorados, compuestos fenólicos, esteroides, lignina, carbón y petróleo (López *et al.*, 2006). Por otro lado este género produce pigmentos carotenoides que representan una fuente de provitamina A, y presentan una actividad antioxidante en la célula al actuar en la neutralización de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno producidas como parte del metabolismo celular (Carranco *et al.*, 2011).

Considerando que los compuestos nitrogenados son un factor de riesgo en el cultivo de organismos acuáticos debido a que los peces y crustáceos son sensibles al incremento de dichos compuestos, el uso de bacterias que transforman los compuestos nitrogenados son fundamentales para la optimización de la acuicultura (Sánchez *et al.*, 2004).

## 7. Materiales y Métodos

### 7.1 Obtención de los peces

Se obtuvieron en el Centro Acuícola de Zacatepec, en el Estado de Morelos, un lote de 135 peces juveniles de la especie *Oreochromis niloticus* con una longitud total aproximada de 7cm. Los peces se trasladaron al Laboratorio de producción de Alimento Vivo del Departamento del Hombre y su Ambiente y se mantuvieron en un periodo de aclimatación de 15 días para verificar que no mostraran ningún signo o lesión que indicara algún proceso infeccioso. Los peces se alimentaron diariamente de acuerdo con su biomasa, con alimento balanceado para crianza minipelets (Silver cup El Pedregal) con un contenido de proteína de 45% y 16% de grasa, hasta dar inicio a la parte experimental.

### 7.2 Obtención de las cepas probióticas

Las cepas probióticas fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Análisis Químico de Alimento Vivo del Departamento del Hombre y su Ambiente de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, las cuales se inocularon en 100 mL de caldo BHI y se incubaron a 35 °C hasta que alcanzaron una concentración bacteriana de  $1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> que fue determinada con el conteo en cámara de Neubauer Improved BRAND (Wang, 2007).

### 7.3 Diseño experimental

Los peces fueron distribuidos al azar en 9 cilindros de 100 L de capacidad (15 org. / tanque.) El experimento contó con un tratamiento control (sin probiótico), un tratamiento de cultivo Biofloc adicionado con *Bacillus subtilis* y otro con *Rhodococcus* sp. Cada tratamiento contó con tres replicas y el experimento se realizó a lo largo de un periodo de 60 días (Figura 8).

Cada cilindro contó con un sistema de aireación constante las 24 hrs para mantener una adecuada floculación, mediante mangueras y difusores de piedra (Emerenciano *et al.*, 2012).

Para garantizar la formación de flóculos y el desarrollo de las comunidades microbianas en el sistema de cultivo, se mantuvo una relación C:N=20:1 (Avnimelech, 2012), mediante el aporte controlado de una fuente externa de carbono (melaza) y nitrógeno proveniente del alimento comercial; para lo cual se realizaron los cálculos de exigencia en el sistema de la siguiente forma (Emerenciano *et al.*, 2011).

Primer paso: Calcular la relación C:N presente en el alimento

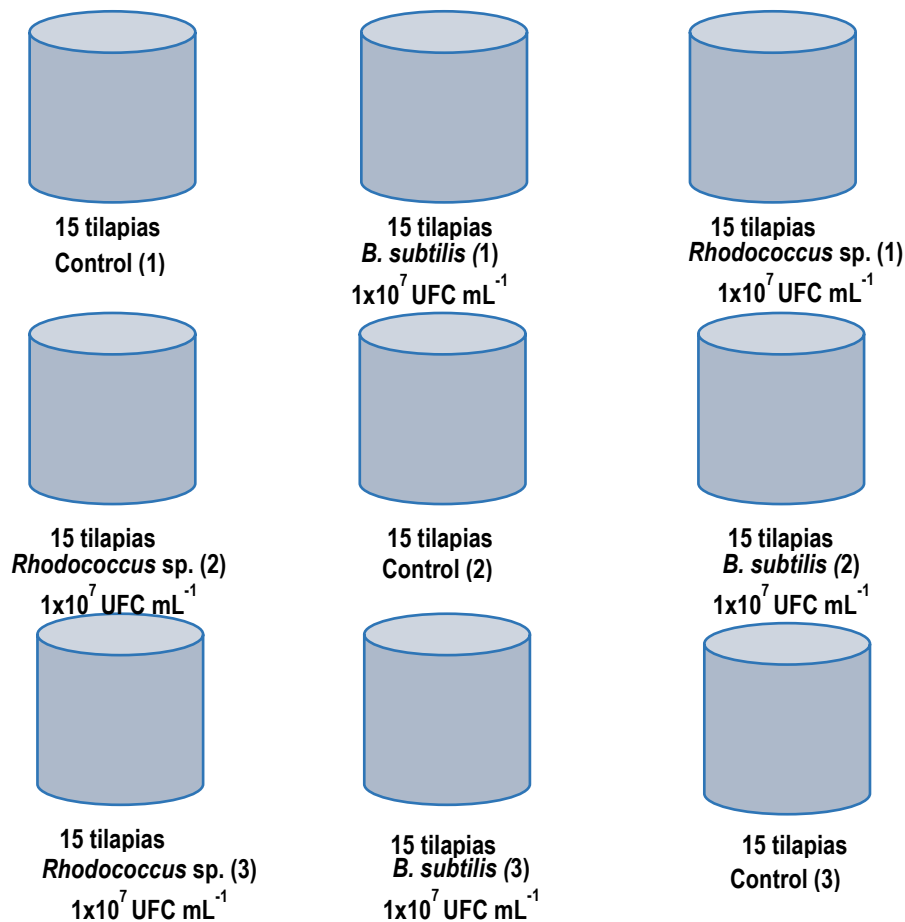
$$C (g) = \text{Kg alimento} \times \% \text{ MS alimento} \times \% \text{ excreción} \div \% \text{ C MS}$$

$$N (g) = \text{Kg alimento} \times \% \text{ MS alimento} \times \% \text{ excreción} \times \% \text{ PB} \div \text{FC} \quad (6.25)$$

Calcular la cantidad de carbono externo a adicionar al sistema para obtener la concentración de carbono requerida  $C (g) = \% \text{ MS} \times \% \text{ C}$ .

Para poder mantener la presencia de flóculos fue necesario ajustar cada semana la cantidad de fuente de carbono externa así como el alimento de acuerdo a la biomasa de las Tilapias. En los estanques no hubo recambios de agua, solo se recuperó el agua que se evaporó (Avnimelech, 2012).

### Diseño experimental



**Figura 8.** Esquema del diseño experimental con las nueve tinajas, donde se encuentran las 15 tilapias en cada una de estas y el tratamiento correspondiente.

## 7.4 Extracción de DNA de la comunidad bacteriana en Biofloc

### 7.4.1 Extracción del DNA

En la fase inicial, media y final del experimento (día 1, 30 y 60) se tomaron muestras de agua de los tratamientos en frascos esterilizados de 1L de capacidad los cuales fueron codificados como IC, IB, IR que indican la fase inicial del experimento del tratamiento Control, *Bacillus subtilis* y *Rhodococcus* sp. MC, MB y MR que pertenecen a la fase media de los tratamientos antes mencionados y por ultimo FC, FB y FR corresponden a la fase final de dichos tratamientos. Después se centrifugó el litro de agua de cada muestra con el objetivo de obtener un pellet, se le agregó 1 ml de amortiguador de fosfatos pH 8.0 para posteriormente realizar la extracción de DNA utilizando el Silica Extraction Kit (Gene Reach Biotechnology Corp) (Huang *et al.*, 2017). Se midió la concentración del DNA con un Biofotómetro marca Eppendorf. La calidad de la extracción del DNA genómico fue detectada en un gel de agarosa al 1% (Thakuria *et al.*, 2008).

### 7.4.2 Purificación de DNA con Silica Extraction Kit (Gene Reach Biotechnology Corp)

1. En un tubo eppendorf nuevo y estéril se adicionaron 900  $\mu$ l de buffer GT y se homogenizo con la muestra.
2. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 3 minutos.
3. Después de la centrifugación se transfirieron 600  $\mu$ l del sobrenadante y se colocó en un tubo eppendorf nuevo y estéril. Se agregó 40  $\mu$ l de silica y se mezcló con vortex.
4. Se centrifugó a 12000 rpm 1 minuto y se decantó la solución.
5. Se lavó el pellet de silica y una vez más se adicionaron 500  $\mu$ l de buffer GT, se mezcló con vortex y se centrifugó a 12000 rpm 15 segundos.
6. Se decantó la solución y se adicionó 1 ml de etanol al 70%, se mezcló por vortex.
7. Se centrifugo a 12000 rpm 15 segundos y se decantó la solución.
8. Posteriormente se adicionaron 500  $\mu$ l de agua DEPC para resuspender la silica y mezclar por vortex.
9. Después se incubó a 55°C por 10 minutos, se mezcló por vortex.
10. Se centrifugó a 12000 rpm tres minutos y se transfirió 50  $\mu$ l de la solución a un tubo eppendorf nuevo y estéril.
11. Se congeló a -70°C hasta medir su concentración.

### 7.4.3 Secuenciación masiva por Illumina

Posteriormente se enviaron las muestras al Integrated Microbiome Resource (IMC) en Ontario Canadá para realizar la secuenciación masiva del gen 16S RNA de la región V4 y V5 con Illumina MiSeq con la química del kit 300 + 300 v3. Los productos de amplificación por PCR de las regiones V4-V5 variables del gen 16S rRNA se obtuvieron usando los primers universales 515 F (adaptadores Illumina + 5'GTGYCAGCMGCCGCGGTAA3') y 926 R (adaptadores Illumina + 5'CCGYCAATTYMTTTRAGTTT3').

La multiplexación y secuenciación de amplicones se llevó a cabo con un diseño de doble etiqueta de indexación usando códigos de barras de 8 pb con el kit Nextera XT Index v2 (Illumina, San Diego, CA, USA).

### 7.4.4 Análisis Bioinformático

Los análisis bioinformáticos se realizaron utilizando MOTHUR, versión 1.39.5, siguiendo el SOP de MiSeq (Schloss *et al*, 2009). Las lecturas seleccionadas debieron cumplir con los siguientes criterios: sin bases ambiguas, una longitud mínima de 400 pb, sin homopolímeros de 8 pb y superiores. El demultiplexado se realizó con una tolerancia de desajuste de código de barras de una base para las etiquetas de identificador molecular de 8 bases. Las unidades taxonómicas operativas (OTU) se asignaron a lecturas calificadas con un 3% de disimilitud usando un algoritmo promedio-vecino, las lecturas quiméricas se identificaron y excluyeron usando UCHIME (Edgar *et al*, 2011) y se excluyeron los "singleton" para evitar números de OTU inflados usando los comandos recomendados de MOTHUR. La diversidad y riqueza de especies, así como las curvas de rarefacción se calcularon al 97% de similitud, como parte de la cartera de diversidad alfa de MOTHUR, con la base de datos de alineación de referencia bacteriana Silva (Yilmaz *et al*, 2014). Se calcularon cinco métricas para evaluar las comunidades bacterianas, incluyendo el número de OTU observadas, el índice de diversidad de Shannon y los estimadores Inv-Simpson y Chao1 para la riqueza de especies. El cálculo de estos parámetros se realizó mediante la normalización de todas las bibliotecas. El análisis de coordenadas principales (PCoA) se realizó con UniFrac (Lozupone *et al*, 2005) utilizando agrupamiento en 97% de identidad de secuencia. La función del clasificador de taxonomía RDP se utilizó para alinear y asignar identidades a los datos de secuencia de Illumina (Wang *et al*, 2007). El análisis estadístico se realizó con STAMP (Parks *et al*, 2014).

### **7.5 Crecimiento y supervivencia de *Oreochromis niloticus***

Para la obtención de los datos biométricos, se pesaron a los peces con una balanza Adventurer™ Pro OHAUS y se midió la longitud total, el ancho y el alto de todos los peces con un vernier marca Scala, una vez cada 15 días para poder realizar curvas de crecimiento, así como la tasa de crecimiento absoluta y específica. Por otro lado también se hizo el conteo de los organismos para saber si hubo mortalidad y así poder obtener el porcentaje de supervivencia (Wang *et al*, 2007).

### **7.6 Valoración de la calidad de agua y de sólidos sedimentables**

La evaluación de los parámetros de calidad de agua se realizó una vez cada 8 días. Se tomaron muestras de agua de los 9 estanques, para poder evaluar la temperatura del agua (°C), el pH y el oxígeno disuelto (OD, ppm) se utilizó un medidor multiparamétrico marca HANNA (HI 9829). También se midieron los niveles de nitrógeno, como nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, mg/L), nitrato (NO<sub>3</sub>-mg/L) y amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, mg/L) con un autoanalizador HANNA Aquaculture Photometer (HI83203) de acuerdo con los métodos estándar de HANNA (HANNA Company, 2003) (Luis-Villaseñor *et al.*, 2016).

Para medir la cantidad de sólidos sedimentables producidos en el sistema “Biofloc” se utilizó un cono Imhoff, donde se llenó de agua hasta la marca de 1L para su posterior sedimentación por un tiempo de 15 a 20 minutos. Finalmente se anotó el volumen de sólidos sedimentables en mL/L. Este procedimiento se llevó cabo una vez por semana (Avnimelech, 2009; Severiche, 2013).

### **7.7 Análisis estadístico**

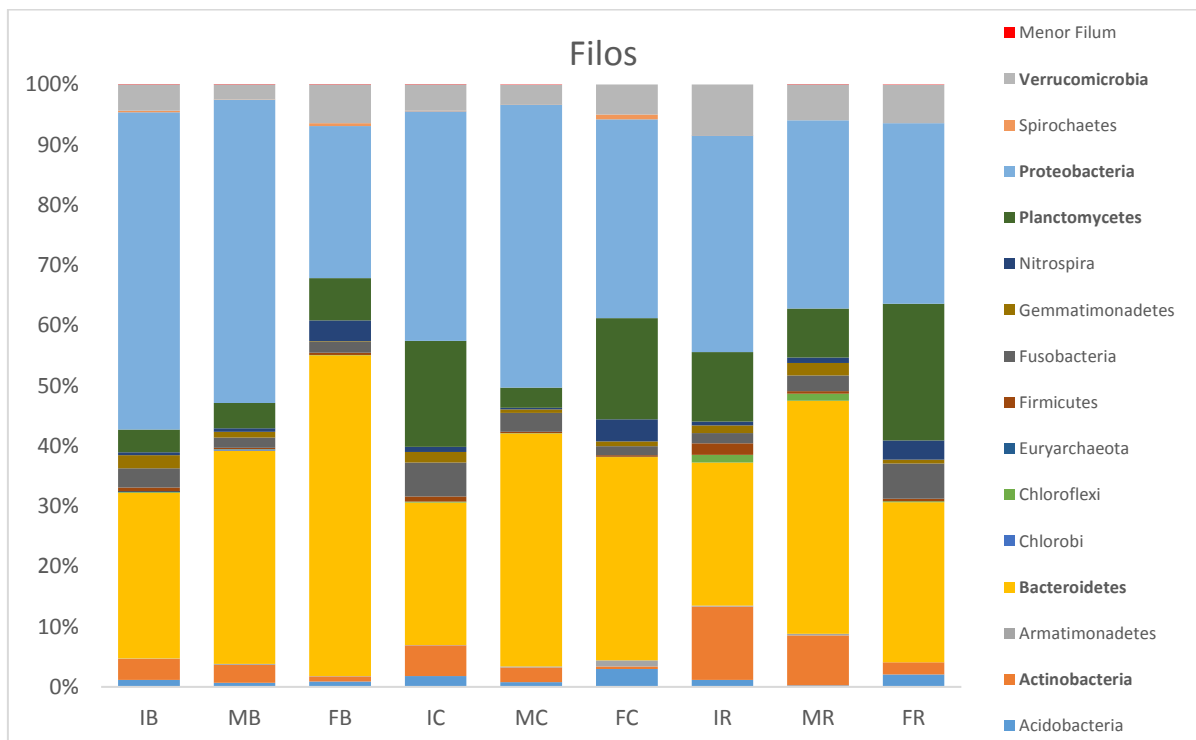
Se realizó la estadística descriptiva correspondiente, se observó la normalidad de los datos para posteriormente hacer un ANOVA de una vía de un modelo completamente al azar para determinar diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) del crecimiento de la Tilapia respecto a los tres tratamientos (control, *Bacillus subtilis* y *Rhodococcus* sp.).

## 8. Resultados

### 8.1 Comunidades bacterianas

Los resultados del análisis metagenómico indican que la comunidad microbiana asociada al Biofloc está representada por 20 Filos, de los cuales los de mayor abundancia relativa fueron: Proteobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes, Verrucromicrobia y Actinobacteria, como se observa en la Figura 9. Estos filos estuvieron presentes en todas las muestras de las tres fases del experimento. Sin embargo, en los tratamientos con el probiótico *B. subtilis* el filo dominante fue Proteobacteria, aunque su abundancia relativa presentó variaciones con respecto al tiempo ya que al inicio y en la fase intermedia del experimento fue de 55 y 50% respectivamente, mientras que en el tiempo final fue solo del 20%. En cuanto a los tratamientos con *Rhodococcus* sp. la abundancia relativa de Proteobacterias fue la misma (30%) en los diferentes periodos analizados. Por otro lado, el tratamiento control (Biofloc sin probiótico) obtuvo una abundancia relativa de este filo con un 35% al inicio del experimento, 45% en la fase intermedia y en la final de 30%. Los filos Firmicutes al cual pertenece el género *Bacillus* y el Actinobacteria que incluye al género *Rhodococcus* sp están presentes, sin embargo, se encontraron con una abundancia relativa inferior al 10%

Figura 9. Abundancia relativa de los filos de las bacterias presentes en Biofloc y Biofloc con probióticos



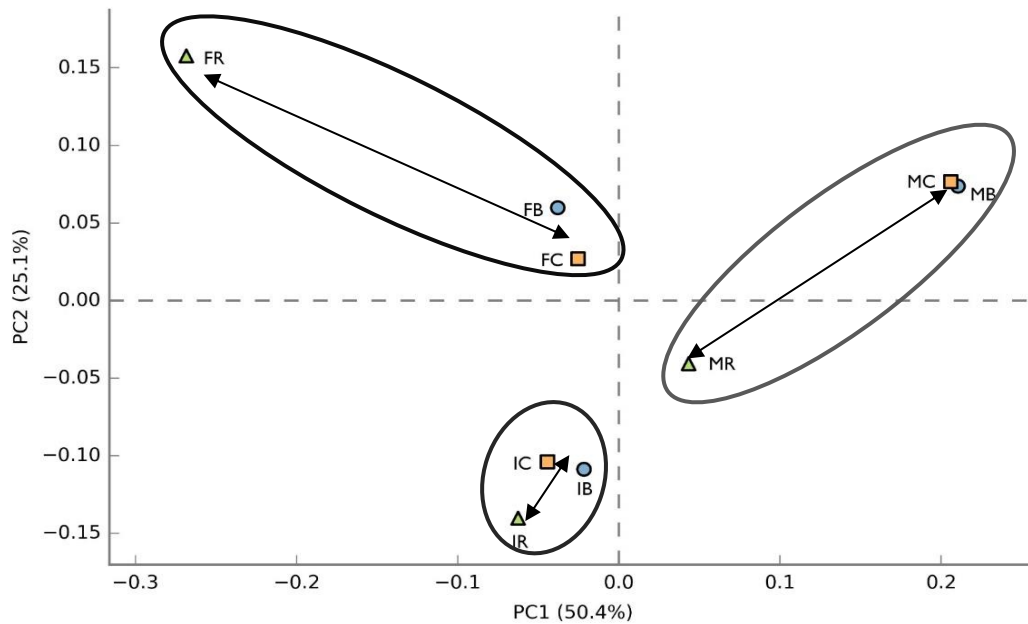
En la Tabla 1 se muestran Filos, Clases, Órdenes y Familias con mayor abundancia relativa de cada uno de los tratamientos.

**Tabla. 4** Frecuencias relativas de las Familias de bacterias identificadas con más frecuencia de cada tratamiento

| Clasificación taxonómica |                     |                     |                                | Tratamientos |       |       |       |       |       |       |       |       |
|--------------------------|---------------------|---------------------|--------------------------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Filo                     | Clase               | Orden               | Familia                        | IB           | MB    | FB    | IC    | MC    | FC    | IR    | MR    | FR    |
| Proteobacteria           | Gammaproteobacteria | Gammaproteobacteria | Pseudomonadaceae               | 1.36         | 0.63  | 3.22  | 0.45  | 0.50  | 2.35  | 0.79  | 0.33  | 2.54  |
|                          | Betaproteobacteria  | Burkholderiales     | Burkholderiales_incertae_sedis | 4.81         | 2.23  | 0.22  | 10.71 | 5.88  | 1.46  | 4.71  | 5.86  | 0.65  |
|                          | Alphaproteobacteria | Caulobacterales     | Caulobacteraceae               | 4.82         | 31.20 | 6.28  | 6.38  | 31.10 | 17.31 | 6.98  | 14.42 | 4.62  |
| Bacteroidetes            | Sphingobacteria     | Sphingobacteriales  | Chitinophagaceae               | 3.96         | 4.58  | 18.49 | 2.58  | 4.17  | 5.95  | 6.86  | 5.78  | 2.61  |
|                          |                     |                     | Sphingobacteriaceae            | 1.75         | 1.79  | 6.51  | 1.23  | 3.94  | 3.78  | 2.86  | 6.10  | 7.62  |
|                          | Flavobacteria       | Flavobacteriales    | Flavobacteriaceae              | 11.78        | 22.34 | 19.12 | 10.52 | 22.28 | 8.62  | 2.80  | 16.94 | 3.95  |
| Actinobacteria           | Actinobacteria      | Actinomycetales     | Mycobacteriaceae               | 3.75         | 3.03  | 0.57  | 5.05  | 2.32  | 0.21  | 12.28 | 6.99  | 1.12  |
| Planctomycetes           | Planctomycetacia    | Planctomycetales    | Planctomycetaceae              | 4.72         | 4.45  | 6.14  | 18.51 | 3.51  | 14.92 | 12.61 | 8.11  | 15.36 |
| Verrucomicrobia          | Opitutae            | Opitutales          | Opitutaceae                    | 2.13         | 1.13  | 1.08  | 1.14  | 1.38  | 1.44  | 3.28  | 1.81  | 1.41  |
| Fusobacteria             | Fusobacteria        | Fusobacteriales     | Fusobacteriaceae               | 3.92         | 1.79  | 1.54  | 5.91  | 3.32  | 1.30  | 1.89  | 2.61  | 3.96  |

El análisis de componentes principales para los diferentes tratamientos en las distintas etapas de experimentación muestra que en la fase inicial de todos los tratamientos se encuentran cercanos, es decir, que comenzaron con una composición microbiana similar como se muestra en la Figura 10. En la fase media el tratamiento control y *B. subtilis* fueron diferentes respecto a *Rhodococcus* sp. lo que indica que la composición de la comunidad bacteriana se modificó respecto a los otros tratamientos. En la fase final el tratamiento con *Rhodococcus* sp. es el que se separa del grupo al variar su composición.

**Figura 10.** Composición microbiana de las muestras de Biofloc, Biofloc + *B. subtilis* y Biofloc + *Rhodococcus* sp. por secuenciación del gen 16s rRNA de la región V4 y V5



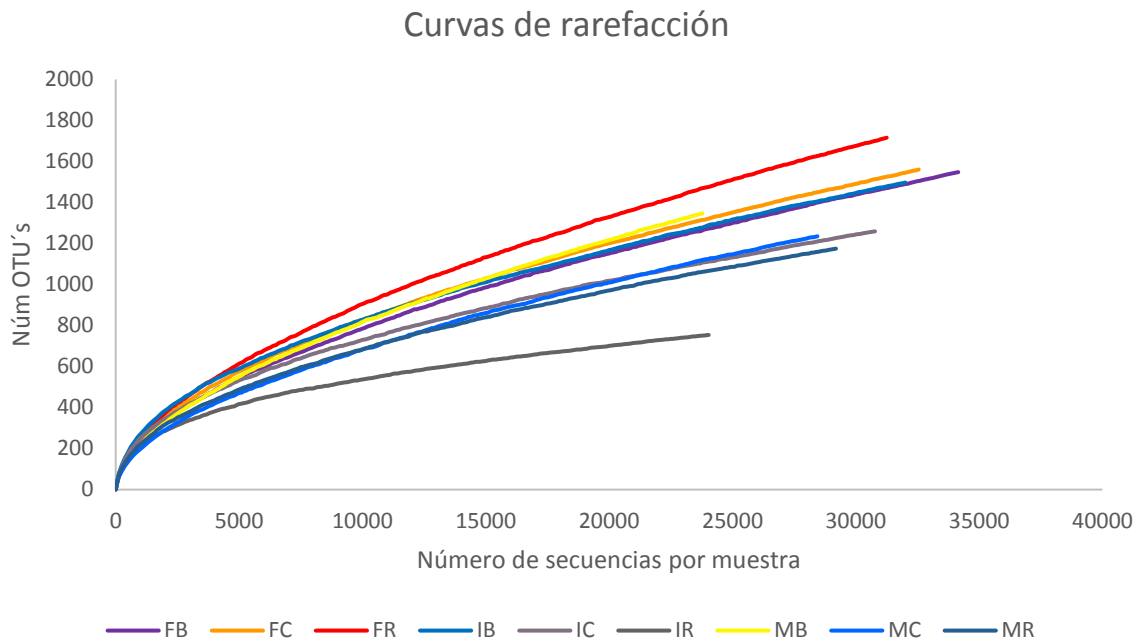
En general, los índices de diversidad y riqueza mostraron valores similares entre las muestras de la fase inicial e intermedia, pero la riqueza de especies fue mayor para el tratamiento con *B. subtilis*. En la fase inicial la riqueza de Sobs fue de 1497, Chao=3494.5 y en la fase media Sobs=1347, Chao=3052.02, mientras que en la fase final la mayor riqueza fue para el tratamiento con *Rhodococcus* sp. con el valor de Sobs de 1716 y Chao=4066.62. Además, la diversidad de comunidades bacterianas fue mayor en la fase final del tratamiento control. No obstante, el número de cobertura fue elevado, ya que todas las muestras obtuvieron un valor entre 0.97 a 0.99, de acuerdo con (Luo *et al.*, 2017) se tiene una cobertura alta cuando el valor es cercano a 1. Con relación al número de secuencias la fase con menor número fue la de la fase media en el tratamiento con *Rhodococcus* sp. (29250) y la mayor fue la de la fase final en el tratamiento con *Bacillus subtilis* (34157) (Tabla 5).

**Tabla 5.** Número de secuencias obtenidas, cobertura de las muestras, riqueza y diversidad de la comunidad bacteriana de los diferentes tratamientos medidos por el análisis de Illumina MiSeq de fragmentos del gen 16S rRNA amplificados por PCR

| Muestras | Número de Secuencias | Cobertura | Riqueza de la Comunidad     |                            | Diversidad de la Comunidad |                         |
|----------|----------------------|-----------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|
|          |                      |           | Sobs<br>(Riqueza observada) | Chao<br>(Riqueza estimada) | InvSimpson<br>(Riqueza)    | Shannon<br>(Diversidad) |
| FB       | 34157                | 0.97      | 1548                        | 3374.02                    | 39.17                      | 4.74                    |
| FC       | 32556                | 0.97      | 1561                        | 3518.82                    | 47.46                      | 4.89                    |
| FR       | 31256                | 0.97      | 1716                        | 4066.62                    | 27.96                      | 4.79                    |
| IB       | 32018                | 0.97      | 1497                        | 3494.5                     | 53.64                      | 5.09                    |
| IC       | 30782                | 0.98      | 1259                        | 2686.62                    | 52.93                      | 4.98                    |
| IR       | 24040                | 0.99      | 754                         | 1281.65                    | 41.37                      | 4.68                    |
| MB       | 23782                | 0.97      | 1347                        | 3052.02                    | 33.21                      | 4.69                    |
| MC       | 28447                | 0.97      | 1235                        | 2965.94                    | 35.87                      | 4.55                    |
| MR       | 29250                | 0.98      | 1176                        | 2265.66                    | 64.19                      | 4.90                    |

Por otro lado, las curvas de rarefacción de los tratamientos en las diferentes etapas del experimento se muestran en la Figura 10, donde se observa que el número de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU's por sus siglas en inglés) fue elevado de acuerdo a lo que reporta Cardona *et al.* (2016) y Deng *et al.* (2018), lo que indica que la riqueza de especies de los tratamientos en las distintas etapas de experimentación fue alta, con excepción de la muestra de la fase inicial de Biofloc + *Rhodococcus* sp. (IR). En general, el esfuerzo de secuenciación fue adecuado con valores de cobertura mayores al 95% como se muestra en la Tabla 5 y en la Figura 11.

**Figura 11.** Curvas de rarefacción de las muestras de Biofloc con los probióticos correspondientes en las diferentes etapas del experimento



## 8.2 Parámetros de calidad de agua y sólidos sedimentables

Con relación a los parámetros de calidad de agua como temperatura, oxígeno disuelto, pH y compuestos nitrogenados no mostraron variaciones significativas durante todo el experimento para los tres tratamientos (Tabla 3).

**Tabla 6.** Valores promedio y desviación estándar de los parámetros de calidad el agua de los tratamientos.

| Parámetro                           | Biofloc + <i>Rhodococcus sp.</i>  |       |       | Biofloc + <i>Bacillus subtilis</i> |       |       | Biofloc                           |       |       |
|-------------------------------------|-----------------------------------|-------|-------|------------------------------------|-------|-------|-----------------------------------|-------|-------|
|                                     | Media DS                          | Min   | Max   | Media DS                           | Min   | Max   | Media DS                          | Min   | Max   |
| pH                                  | 7.67 ( $\pm 0.21$ ) <sup>a</sup>  | 7.20  | 7.85  | 7.57 ( $\pm 0.18$ ) <sup>a</sup>   | 7.36  | 8.01  | 7.67 ( $\pm 0.16$ ) <sup>a</sup>  | 7.45  | 7.95  |
| Temperatura (°C)                    | 21.58 ( $\pm 0.72$ ) <sup>a</sup> | 20.69 | 22.77 | 21.86 ( $\pm 0.78$ ) <sup>a</sup>  | 20.29 | 22.44 | 21.69 ( $\pm 0.66$ ) <sup>a</sup> | 20.63 | 22.40 |
| Oxígeno disuelto mg L <sup>-1</sup> | 89.89 ( $\pm 6.67$ ) <sup>a</sup> | 74.83 | 94    | 87.39 ( $\pm 7.25$ ) <sup>a</sup>  | 77.67 | 96.37 | 89.85 ( $\pm 5.73$ ) <sup>a</sup> | 80.10 | 95.1  |
| NO <sup>2-</sup> mg/L               | 0.59 ( $\pm 0.28$ ) <sup>a</sup>  | 0.28  | 1.15  | 0.52 ( $\pm 0.26$ ) <sup>a</sup>   | 0.22  | 1.15  | 0.58 ( $\pm 0.31$ ) <sup>a</sup>  | 0.19  | 1.15  |
| NO <sup>3-</sup> mg/L               | 24.17 ( $\pm 5.40$ ) <sup>a</sup> | 18.73 | 30.0  | 24.70 ( $\pm 4.13$ ) <sup>a</sup>  | 13.6  | 30.0  | 22.96 ( $\pm 4.26$ ) <sup>a</sup> | 13.43 | 30.0  |
| NH <sup>4+</sup> mg/L               | 0.80 ( $\pm 0.16$ ) <sup>a</sup>  | 0.39  | 0.80  | 0.63 ( $\pm 0.12$ ) <sup>b</sup>   | 0.51  | 1.55  | 0.61 ( $\pm 0.15$ ) <sup>b</sup>  | 0.41  | 0.87  |
| Sólidos sedimentables               | 5                                 | 0     | 5     | 5                                  | 5     | 5     | 5                                 | 5     | 10    |

### 8.3 Crecimiento de Tilapias

La tasa intrínseca de crecimiento (TCI) y la tasa absoluta de crecimiento (TCA) en talla y peso de los peces, se muestra en la Tabla 7. El peso, así como la longitud total final no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos con un valor de P de 0.755 y 0.472 respectivamente.

La supervivencia fue diferente para los tratamientos con *Rhodococcus sp.* (91%) y el tratamiento con *B. subtilis* (89%) respecto al tratamiento control (71%).

**Tabla 7.** Parámetros de crecimiento de *O. niloticus* en los distintos tratamientos.

| Parámetro                  | Control                | BFT + <i>Bacillus subtilis</i> | BFT + <i>Rhodococcus</i> sp. |
|----------------------------|------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Peso inicial (g)           | 7.15±1.03 <sup>a</sup> | 6.88±0.98 <sup>a</sup>         | 7.21±1.01 <sup>a</sup>       |
| Peso final (g)             | 8.97±2.61 <sup>a</sup> | 9.21±2.38 <sup>a</sup>         | 9.54±1.97 <sup>a</sup>       |
| TCA (g día <sup>-1</sup> ) | 0.030                  | 0.039                          | 0.039                        |
| TCE (%/día)                | 0.37                   | 0.48                           | 0.46                         |
| Longitud inicial           | 7.61±0.59 <sup>a</sup> | 7.28±0.46 <sup>a</sup>         | 7.52±0.49 <sup>b</sup>       |
| Longitud total final       | 8.26±1.25 <sup>a</sup> | 8.11±1.08 <sup>a</sup>         | 8.24±0.25 <sup>a</sup>       |
| TCA (g día <sup>-1</sup> ) | 0.011                  | 0.014                          | 0.012                        |
| TCE (%/día)                | 0.14                   | 0.18                           | 0.15                         |
| Sobrevivencia (%)          | 71                     | 89                             | 91                           |

Los datos son promedios ( $\pm$  desviación estándar). Letras distintas indican que los promedios son diferentes significativamente ( $P < 0.05$ )

## 9. Discusión

Los microorganismos son parte fundamental de las redes tróficas en los ambientes acuáticos, al contribuir en la recirculación de nutrientes e interactuando con una amplia gama de organismos (Cruz-Leyva *et al.*, 2015). Para comprender su función en los nichos específicos, es esencial identificar y cuantificar cada uno de los miembros que conforman estas comunidades, por ello los estudios de metagenómica, son muy importantes como una herramienta emergente para estudiar comunidades de microorganismos no cultivados (Vieites *et al.*, 2008). Los resultados del análisis metagenómico en este estudio indican que la comunidad microbiana asociada al Biofloc está representada por 20 filos, de los cuales los de mayor abundancia relativa fueron: Proteobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes, Verrucromicrobia y Actinobacteria, pero fueron el filo Protobacteria y Bacteroidetes los de mayor abundancia relativa en todos los tratamientos. Estos resultados concuerdan con los reportado por Deng y colaboradores (2018), quienes llevaron a cabo un experimento para evaluar el efecto de la

adición de almidón de tapioca, celulosa y la combinación de almidón de tapioca y celulosa sobre la diversidad microbiana del Biofloc, en el cultivo de la carpa herbívora mediante secuenciación masiva, en donde reportan que, sin importar la fuente de carbono adicionada al sistema de cultivo, el filo Proteobacteria y Bacteroidetes son los de mayor abundancia relativa. Cabe destacar que las bacterias pertenecientes a este filo han sido reportadas en diversos estudios como ubicuas en ambientes acuáticos y sistemas de producción acuícola (Guo *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017). Por otra parte, se ha demostrado que las Proteobacterias son un grupo microbiano encargado en el proceso de reciclaje de nutrientes y en la mineralización de componentes orgánicos en sistemas acuáticos como lo señala Cardona y colaboradores (2016). Por su parte Martins y colaboradores (2013) indica que este grupo comprende varios géneros fotótrofos y heterótrofos con alta capacidad degradativa de compuestos como el metano y metanol en ambientes acuáticos. Penn y colaboradores (2015), mencionan que las Betaproteobacterias también identificadas en este estudio, son un grupo de bacterias aeróbicas o facultativas encargadas de transformar los compuestos nitrogenados en los ecosistemas acuáticos y unos de los géneros más importantes de este grupo son las *Nitrosomonas* que oxidan el amoníaco.

Las Familias con mayor abundancia relativa en este estudio, también han sido reportadas en sistemas acuícolas y en sistemas con Biofloc como Pseudomonadaceae (Ndi y Barton, 2012), Caulobacteraceae (Gou *et al.*, 2011), Chitinophagaceae (Bartelme *et al.*, 2017), Sphingobacteriaceae (Bartie *et al.*, 2005), que son bacterias eficientes en la transformación de diversos compuestos dentro de la columna de agua como es la celulosa, la quitina, el colágeno y los compuestos nitrogenados generados durante el cultivo.

Uno de los objetivos más importantes de este estudio era evaluar el impacto de la adición de probióticos sobre la comunidad microbiana en un cultivo de tilapia en Biofloc. Los resultados de este análisis mostraron que la adición del probiótico no modifica la comunidad microbiana presente y tampoco domina dentro del sistema ya que la abundancia relativa de *B. subtilis* fue muy baja sobre todo en la fase final del experimento (menor al 10%), contrariamente a lo que se esperaba, ya que es uno de los géneros que más se han utilizado como probióticos en acuicultura con resultados positivos en el crecimiento, la supervivencia, respuesta inmune y el control de enfermedades de peces y crustáceos, lo que habla de su capacidad de exclusión competitiva (Zokaeifar *et al.*, 2012; Olmos y Paniagua, 2014; Zuenko *et al.*, 2017). Sin embargo, cuando hablamos de cultivos en Biofloc hay que

tomar en cuenta que las condiciones de producción de organismos acuáticos difieren significativamente a los sistemas convencionales ya que este tipo de sistemas promueve el crecimiento de una diversidad muy compleja de bacterias heterótrofas a partir de una fuente de carbono externa y alta oxigenación la cual influye junto con las especies cultivadas, sobre los grupos bacterianos que puedan resistir dichas condiciones (Wilén *et al.*, 2008; Ray y Lotz, 2014). En un estudio realizado por De Paiva *et al.* (2016), tampoco observaron efectos positivos al adicionar un probiótico comercial, compuesto por *Bacillus* spp. y *Lactobacillus* sp. en el sistema Biofloc para el cultivo de camarón. Los autores señalan que esto puede suceder debido a los procesos de anaerobiosis que se pueden dar en el fondo del estanque o a la concentración a la que el probiótico es adicionado.

Con respecto a los tratamientos donde se adicionó *Rhodococcus* sp., tampoco se observó un efecto sobre la comunidad bacteriana del Biofloc, de igual forma su abundancia relativa en los tres periodos de análisis fueron inferiores al 10% pese a que se sabe que este microorganismo se adapta fácilmente a los sistemas acuícolas incluso en condiciones adversas para otros géneros, gracias a su gran diversidad metabólica con la que puede biodegradar y utilizar diversa fuentes de carbono, metales pesados, hidrocarburos entre otros (Sánchez *et al.*, 2004).

Es importante señalar que en los sistemas Biofloc se ha documentado la presencia de bacterias probióticas que se desarrollan *in situ* de forma natural, esto debido a que son sistemas con poco o nulo recambio de agua, en las heces que los peces liberan hay bacterias que forman parte de la microbiota intestinal y que al entrar en contacto con el agua rica en carbohidratos por el aporte de la fuente de carbono externa, proliferan significativamente sin las necesidad de adición probióticos de fuentes externas (Monroy *et al.*, 2015; Cienfuegos *et al.*, 2017)

Los índices de diversidad analizados en este trabajo indican que la riqueza (Chao) y diversidad (Shannon) bacteriana en el Biofloc es alta (4066.62 y 5.08 respectivamente) considerando lo reportado por Deng *et al.* (2018) quienes obtuvieron valores de riqueza y diversidad bacteriana de 677 y 4.82 respectivamente en cultivos con Biofloc, indicando que son valores altos para ambientes acuáticos. Del mismo modo Luo *et al.* (2017) reporta para el cultivo de tilapia en Biofloc un índice de Shannon > 5.0, lo que sugiere una diversidad alta. A su vez el índice de Chao fue elevado con un valor de 7,656.

Las curvas de rarefacción de los tratamientos en las diferentes etapas experimentales mostraron un número de OTU's alto (1716), por encima de los reportado por otros estudios donde se han obtenido valores entre 623 y 277.59 (Cardona *et al.*, 2016; Deng *et al.*, 2018).

Con relación a los parámetros fisicoquímicos no se observaron variaciones significativas entre los tratamientos a lo largo del periodo experimental, sobre todo para el caso de los compuestos nitrogenados que son uno de los factores más estresantes para los peces, ya que presentaron valores para nitritos entre 0.52 y 0.59 mg/L, los nitratos entre 22.96 a 24.17 mg/L y el amonio de 0.61 a 0.80 mg/L considerando dentro de los rangos óptimos para el cultivo de tilapia (El-Sayed, 2006; Soto *et al.*, 2010), estos resultados refuerzan lo señalado por Ebeling *et al.* (2006); Emerenciano *et al.* (2017); quienes aseguran que uno de los beneficios del uso de Biofloc para el cultivo de organismos acuáticos es la reducción y estabilización de los compuestos nitrogenados debido a que los residuos orgánicos acumulados en los estanques se degradan y el amonio generado por los peces es nitrificado o asimilado por la comunidad microbiana, sin la necesidad de los recambios de agua de los sistemas de cultivo convencionales. También se ha reportado que las cianobacterias transforman el nitrógeno amoniacal en compuestos que no son nocivos para los peces en cultivo y en producción de biomasa microbiana disponible para los siguientes niveles tróficos (Miranda *et al.*, 2017).

En relación con el incremento en peso y talla de los organismos, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Lo mismo ocurrió con las tasas de crecimiento al no obtener diferencias significativas con valores entre 0.030 y 0.039 para TCA y 0.37 y 0.48 para TCE con relación al peso y para la longitud valores entre 0.011 y 0.014 para TCA y 0.14 y 0.18 para TCE, contrariamente a lo reportado en otras investigaciones como la de Luo *et al.* (2014) quienes realizaron un experimento de 84 días para ver el crecimiento de la tilapia, comparando el sistema de recirculación y sistema Biofloc. Observando que en sistema Biofloc hubo una diferencia significativa en la tasa de crecimiento específico (TCE) (2.13) comparado con el tratamiento control (1.90). Lo anterior también fue reportado por Long *et al.* (2015), ya que evaluaron el efecto del sistema Biofloc en el crecimiento de la tilapia durante 8 semanas de experimentación, observando que la TCE fue significativamente mayor en sistema Biofloc (2.04) que en el sistema convencional (1.92). Por otra parte, la investigación realizada por Prabu *et al.* (2017), donde probaron dietas con 32% de proteína, diferentes porcentajes de triptofano y 20% de hojuela de Biofloc, se observó que el incremento en peso de las tilapias fue significativo, ya que comenzaron con un peso menor a 5g y en un periodo de 60 días el tratamiento

con el promedio de peso más alto fue de 41.84g. Los autores indican que estos resultados se deben a que el Biofloc afecta positivamente la actividad enzimática digestiva de los organismos en cultivo mejorando la asimilación de nutrientes. Por otro lado, Azim y Little, (2008), evaluaron el crecimiento de *O. niloticus* en Biofloc, adicionando como fuente de carbono externa harina de arroz y melaza. La ganancia en peso fue de 40g en sistema Biofloc en un periodo de 12 semanas de experimentación, atribuyendo este crecimiento a que la mayoría de las tilapias son conocidas por utilizar partículas de alimentos producidos *in situ*, incluidas las bacterias suspendidas.

Por otro lado, la supervivencia fue mayor en los tratamientos con probióticos respecto al control, aun cuando el análisis metagenómico no mostró efectos importantes sobre la microbiota del Biofloc, *Rhodococcus* sp y *B. subtilis* mejoraron el bienestar de los peces al funcionar como bioestimulantes del sistema inmune y a mejorar la calidad del agua lo que les permitió alcanzar una mayor supervivencia como lo señala Mesalhy *et al.* (2008) quienes indican que al añadir probióticos en la dieta se incrementa la respuesta inmune y por consiguiente esta variable.

## 10. Conclusiones

El presente trabajo fue de gran relevancia ya que son pocos los estudios de secuenciación masiva que reportan toda la comunidad bacteriana que se desarrolla en los sistemas Biofloc, pese a que hay algunos trabajos realizados mediante el aislamiento e identificación con pruebas microbiológicas convencionales y organismos cultivados, estos no brindan toda la información que se obtiene con análisis metagenómicos, los cuales no solo nos permiten identificar la diversidad y abundancia de especies, sino en muchos casos la función ecológica que están realizando dichas bacterias. Este estudio amplía el conocimiento sobre los Filos que se desarrollan en el Biofloc ya que en la mayoría de los casos solo se consideraban a los Filos dominantes Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria, con los resultados de esta investigación se amplía la información ya que fueron identificados 20 Filos dentro de los que se consideraron con mayor abundancia Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia y Fusobacteria.

La adición de los probióticos *B. subtilis* y *Rhodococcus* sp. no impactó en la composición bacteriana del Biofloc debido probablemente a que dichas bacterias aisladas del tracto intestinal de la trucha no

resistieron las condiciones ambientales del sistema de cultivo o fueron desplazadas por la microbiota del Biofloc, así mismo considerar la dosis y el tiempo de administración. Por lo que se requiere realizar más investigaciones para evaluar la pertinencia de la adición de probióticos en un sistema Biofloc.

Si bien no se observaron diferencias significativas en el crecimiento y peso de los organismos la sobrevivencia mejoró sustancialmente con el uso de probióticos. Además, los parámetros de calidad de agua, sobre todo los compuestos nitrogenados, se mantuvieron dentro de los niveles requeridos para el cultivo de la tilapia, lo cual resulta interesante, ya que se hace un menor impacto ambiental por el uso del recurso agua.

## **11. Agradecimientos**

El primer autor agradece al programa de Posgrado de la Maestría en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco por el apoyo otorgado y a su vez al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haber otorgado la beca para concluir satisfactoriamente el plan de estudios en el tiempo adecuado, con el número de CVU 763372.

## 12. Referencias bibliográficas

- Ahmad I., Rani A. B., Verma A. K. and Maqsood, M. 2017. Biofloc technology: an emerging avenue in aquatic animal healthcare and nutrition. *Aquaculture International*, 25: 1215-1226.
- Asaduzzaman M., Rahman M.M., Azim M.E., Islam M.A., Wahab M.A., Verdegem M.C.J., Verreth J.A.J. 2010. Effects of C/N ratio and substrate addition on natural food communities in freshwater prawn monoculture ponds. *Aquaculture* 306: 127–136.
- Avnimelech Y. 2009. *Biofloc technology: a practical guidebook*. 3rd ed. Baton Rouge, LA.
- Avnimelech Y. 2012. *Biofloc technology. A practical guidebook*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge.
- Azim M.E. and Little D.C. 2008. The Biofloc technology (BFT) in indoor tanks: water quality, Biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 283: 29-35.
- Balcázar J. L., De Blas I., Ruiz-Zarzuola I., Cunningham D., Vendrell D. and Múzquiz, J. L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary microbiology*, 114: 173-186.
- Bartelme R.P., McLellan S.L. and Newton R.J. 2017. Freshwater recirculating aquaculture system operations drive biofilter bacterial community shifts around a stable nitrifying consortium of ammonia-oxidizing archaea and comammox Nitrospira. *Frontiers in microbiology*, 8: 101.
- Bartie K.L., Huys G., Swings J., Oanh D.T.H., Phuong N.T., Shariff M. and Giacomini M. 2005. The Asiaserist Project: A Study of Antimicrobial Resistance Associated with Asian Aquacultural Environments. In *Workshop on Antibiotic Resistance in Asian Aquaculture Environments*.
- Becerra M.J., Martínez L.R., Martínez M., Hernández J., López J.A. and Mendoza F. 2014. Effect of using autotrophic and heterotrophic microbial-based-systems for the pre-grown of *Litopenaeus vannamei*, on the production performance and selected haemolymph parameters. *Aquaculture Research* 45: 944-948.
- Beardsley C., Moss S., Malfatti F. and Azam F. 2011. Quantitative role of shrimp fecal bacteria in organic matter fluxes in a recirculating shrimp aquaculture system. *FEMS Microbiology Ecology*, 77: 134-145.

- Borja A. 2002. Los impactos ambientales de la acuicultura y la sostenibilidad de esta actividad. Boletín Instituto Español de Oceanografía ISSN: 0074-0195: 41-49.
- Bossier P. and Ekasari J. 2017. Biofloc technology application in aquaculture to support sustainable development goals. *Microbial biotechnology*, 10: 1012-1016.
- Buschmann A. 2007. Impacto ambiental de la acuicultura el estado de la investigación en Chile y el mundo. 67p.
- Cardona E., Gueguen Y., Magré K., Lorgeoux B., Piquemal D., Pierrat F. and Saulnier D. 2016. Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. *BMC Microbiology*, 16: 2-9.
- Carranco M.A., Calvo M.C. y Pérez-Gil F. 2011. Carotenoides y su función antioxidante. *Archivos Latinoamericanos de nutrición* 61: 233-241.
- Castro T., Monroy M.C., Castro J., Lara R. y Castro G. 2011. Efecto de cuatro probióticos en el crecimiento y la sobrevivencia de *Carassius auratus*. *Ciencia pesquera*. 19: 21-28.
- Cienfuegos M.K., Monroy D.M.C., Hamdan P.A., Castro M.J. y Becerril C.D. 2017 Probiotics used in Biofloc system for fish and crustacean culture: A review. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 5: 103-110.
- Collazos L. 2015. Fundamentals of bioflocs technology (BFT). An alternative for fish farming in Colombia. A review. *ORINOQUIA*. 19 (1): 77-86.
- CONAPESCA. 2012. Criterios Técnicos y Económicos para la Producción Sustentable de Tilapia en México.
- Crab R., Kochva M., Verstraete W. and Avnimelech Y. 2009. Bio-flocs technology application in over-wintering of tilapia. *Aquaculture Engineering* 40: 105-112.
- Crab R., Lambert A., Defoirdt T., Bossier P. and Verstraete W. 2010. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. *Journal Applied Microbiology*, 109: 1643-9.
- Crab R., Defoirdt T., Peter B. and Verstraete W. 2012. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*, 356-357: 351-356.
- Cruz-Leyva M.C., Zamudio-Maya M., Corona-Cruz A.I., González-de la Cruz J.U. y Rojas-Herrera R. A. 2015. Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 2: 99-115.

- Del-Pozo J., Mishra N., Kabuusu R., Cheetham S., Eldar A., Bacharach E. and Ferguson H. W. 2017. Syncytial hepatitis of tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) is associated with orthomyxovirus-like virions in hepatocytes. *Veterinary pathology*, 54: 164-170.
- Defoirdt T., Halet D., Vervaeren H., Boon N., Van de Wiele T., Sorgeloos P., Bossier P. and Verstraete W. 2007. The bacterial storage compound poly- $\beta$ -hydroxybutyrate protects *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbelli*. *Environmental Microbiology*, 9: 445-452.
- Deng M., Chen J., Gou J., Hou J., Li D. and He X. 2018. The effect of different carbon sources on water quality, microbial community and structure of biofloc systems. *Aquaculture*, 482: 103-110.
- De Paiva E., Alves G., Otavio L., Olivera A. and Vasconcelos Gesteira T.C. 2016. Intensive culture system of *Litopenaeus vannamei* in commercial ponds with zero water exchange and addition of molasses and probiotics. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 51: 61-67.
- Díaz G. y Wachter C. 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latina de Microbiología*, 45 : 30-40.
- Ebeling J., Timmons M. y Bisogni J. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 346-358.
- Edgar R.C., Haas B.J., Clemente J.C., Quince C. and Knight R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27: 2194-2200.
- El-Sayed A. 2006. *Tilapia culture*. 1st ed. CABI Publishing, Wallingford.
- Emerenciano M., Ballester E., Cavalli R. and 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*, 19:891–901.
- Emerenciano M., Ballester E., Cavalli R. and Wasielesky W. 2012. Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). *Aquaculture Research*, 43: 447–457.
- Emerenciano M., Cuzon G., Arévalo M. and Gaxiola G. 2014. Biofloc technology in intensive broodstock farming of the pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum*: spawning performance, biochemical composition and fatty acid profile of eggs. *Aquaculture research*, 45: 1713-1726.

- Emerenciano M., Martínez L.R., Martínez M. and Miranda A. 2017. Biofloc Technology (BFT): A Tool for Water Quality Management in Aquaculture, Water Quality, Prof. Hlanganani Tutu (Ed.), InTech.
- Espinosa P.A. y Bermúdez A.M.D.C. 2012. La acuicultura y su impacto al medio ambiente. Estudios Sociales, 2: 218-232.
- FAO. 2002. Guidelines for the evaluation of Probiotics in foods. London Ontario, Canada: Food and Agricultural Organization of the United Nations/ World Health Organization.
- FAO. 2005. Visión general del sector acuícola nacional. . Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO).
- FAO. 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
- Gómez J.L., Peña B., Salgado H. and Guzmán M. 2003. Reproductive aspects of *Oreochromis niloticus* (Perciformes: Cichlidae) at Coatetelco lake, Morelos, Mexico. Revista de biología tropical, 51: 221-228.
- Guo F., Zhang S.H., Yu X. and Wei B. 2011. Variations of both bacterial community and extracellular polymers: the inducements of increase of cell hydrophobicity from biofloc to aerobic granule sludge. Bioresource technology, 102: 6421-6428.
- Gutiérrez L.A. 2013. Probiotics: an alternative for cleaner production and a possible replacement of the antibiotics as growth promoters in animal feeding. Producción + Limpia, 8: 135-146.
- Gutiérrez L.A., David C.A., Montoya O.I. y Betancur E. 2016. Efecto de la inclusión en la dieta de probióticos microencapsulados sobre algunos parámetros zootécnicos en alevinos de tilapia roja (*Oreochromis sp.*). Revista de Salud Animal, 38: 112-119.
- Günther J. y Jiménez R. 2004. Efecto del probiótico *Bacillus subtilis* sobre el crecimiento y alimentación de tilapia (*Oreochromis niloticus*) y langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) en laboratorio. Biología tropical, 53: 168-183.
- Hargreaves J.A. 2013. Biofloc Production Systems for Aquaculture. SRAC, 4503: 8-10.
- Huang J.Y., Kang S.T., Chen I., Chang L.K., Lin S.S., Kou G.H. and Lo C.F. 2017. Shrimp mir-10a Is Co-opted by White spot syndrome Virus to increase Viral gene expression and Viral replication. Frontiers in Immunology, 8: 1-12.

- Lara M., Briones L., Olvera M. 2002. Avances en la utilización de probióticos como promotores de crecimiento en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). En: Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Long L., Yang J., Li Y., Guan C. and Wu F. 2015. Effect of biofloc technology on growth, digestive enzyme activity, hematology, and immune response of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 448: 135-141.
- López J.B., Quintero G., Guevara A.L., Jaimes D.C., Gutiérrez S.M. y García J.M. 2006. Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Revista Nova- Publicación científica* 4: 5-6.
- Lozupone C. and Knight R. 2005. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 8228–8235.
- Luis-Villaseñor I.E., Voltolina D., Audelo J.M., Pacheco M.R., Herrera V.E. and Romero E. 2016. Effects of Biofloc Promotion on Water Quality, Growth, Biomass Yield and Heterotrophic Community in *Litopenaeus Vannamei* (Boone, 1931) Experimental Intensive Culture. *Italian Journal of Animal Science* 14: 332-337.
- Luo G., Gao Q., Wang C., Liu W., Sun D., Li L. and Tan H. 2014. Growth, digestive activity, welfare, and partial cost-effectiveness of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in a recirculating aquaculture system and an indoor biofloc system. *Aquaculture*, 422: 1-7.
- Luo G., Zhang N., Cai S., Tan H. and 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*, 479: 732-741.
- Martins P., Cleary D.F. Pires A.C. Rodrigues A.M., Quintino V., Calado R. and Gomes N.C. 2013. Molecular analysis of bacterial communities and detection of potential pathogens in a recirculating aquaculture system for *Scophthalmus maximus* and *Solea senegalensis*. *Plos one*, 8: 1-17.
- Mesalhy S.A., Fathi M.M. and John G. 2008. Effect of probiotic on the survival, growth and challenge infection in Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*, 39: 647-656.

- Miranda A., Mariscal M.A., López J. A. Rivas M. E., Emerenciano M., Sánchez A. and Esquer J. L. 2017. Effect of inoculation of the cyanobacteria *Oscillatoria* sp. on tilapia biofloc culture. *Aquaculture Research*, 48: 4725–4734.
- Monroy M.C., De Lara R., Castro J., Castro G. and Emerenciano M. 2013. Microbiology community composition and abundance associated to biofloc in tilapia aquaculture. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 48: 511-520.
- Monroy M.C., Rodríguez G., Castro J. and Becerril D. 2015. Importance and function of microbial communities in aquaculture systems with no water exchange. *Scientific Journal of Animal Science*, 4: 103-110.
- Ndi O.L. and Barton M.D. 2012. Resistance determinants of *Pseudomonas* species from aquaculture in Australia. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 3: 1-6.
- Olmos J. and Paniagua-Michel J. 2014. *Bacillus subtilis* a potential probiotic bacterium to formulate functional feeds for aquaculture. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 6: 361-365.
- Penny C., Gruffaz C., Nadalig T., Cauchie H.M., Vuilleumier S. and Bringel F. 2015. Tetrachloromethane-degrading bacterial enrichment cultures and isolates from a contaminated aquifer. *Microorganisms*, 3: 327–343.
- Poleo G., Aranbarrio J.V., Mendoza L. and Romero O. 2011. Cultivo de cachama blanca en altas densidades y en dos sistemas cerrados. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 46: 429-437.
- Prabu E., Rajagopalsamy C.B., Ahilan B., Jeevagan I.J. and Renuhadevi M. 2017. Effect of Dietary Supplementation of Biofloc Meal with Tryptophan on Growth and Survival of GIFT Tilapia. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6: 3426-3434.
- Rabagliati B., Morales S., Baudrand A.B., Jorquera R.A., Oddó B.J., García C.D., Carmona P.P., Cisternas M.C. y Huete G.Á. 2005. Neumonía cavitada por *Rhodococcus equi* en paciente inmunocomprometido no infectado por virus de inmunodeficiencia humana: Caso clínico y revisión. *Revista chilena de infectología*, 22: 155-160.
- Ray J.A., Lotz J.M. 2014. Comparing a chemoautotrophic-based biofloc system and three heterotrophic-based systems receiving different carbohydrate sources. *Aquacultural Engineering*, 63: 54-61.
- Rodríguez H., Piedad V., Daza M. y Ávila C. 2001. *Fundamentos de Acuicultura Continental*. 2ª ed. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura. República de Colombia.

- SAGARPA 2012. 6° Informe de Labores. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 1 de agosto de 2012.
- Samocha T.M., Patnaik S., Speed M., Ali A.M., Burger J.M., Almeida R.V., Ayub Z., Harisanto M., Horowitz A. and Brock D.L. 2007. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. *Aquacultural Engineering*, 36:184–191.
- Sánchez N., Sandoval A.H., Diaz F. and Serrano J.A. 2004. El género *Rhodococcus*. Una revisión didáctica. *Revista de la sociedad venezolana de microbiología*, 24: 24-33.
- Sanz Y., Collado C. y Dalmau J. 2003. Probióticos: Criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta Pediátrica Española* 61: 476-482.
- Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Lesniewski R.A., Oakley B.B., Parks D.H., Robinson C.J., Sahl J.W., Stres B., Thallinger G.G., Van Horn D.J. and Weber C.F. 2009. Introducing Mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied Environmental Microbiology*, 75:7537–7541.
- Schryver P., Crab R., Defoirdt T., Boon N. y Verstraete W. 2008. The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture*, 277: 125-137.
- Severiche C., Castillo M. and Acevedo B. 2013. Manual de métodos analíticos para la Determinación de Parámetros Físicoquímicos Básicos en Aguas. Cartagena de Indias, Colombia.
- Soto J. 2010. Cultivo de tilapia en estanquería recubierta con plástico impermeabilizante bajo un sistema de recirculación rancho San Luis, Castamay, Campeche. Manifiesto de impacto ambiental. 100 p.
- Soto E., Fernandez D., Thune R. and Hawke J. P. 2010. Interaction of *Francisella asiatica* with tilapia (*Oreochromis niloticus*) innate immunity. *Infection and immunity*, 78: 2070-2078.
- Tenorio-Colin G. 2003. Caracterización isoenzimática de *Oreochromis niloticus* y *O. mossambicus* introducidas en México. *Ciencia y mar*, 7: 3-9.
- Thakuria D., Schmidt O., Siúrtáin M.M., Egan D. and Doohan F.M. 2008. Importance of DNA quality in comparative soil microbial community structure analyses. *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 1390–1403.

- Timmons M.B., Ebeling J.M., Wheaton F.W., Sommerfelt S.T. and Vinci B.J. 2002. Microbial biofloc and protein levels in green tiger shrimp. Recirculating aquaculture systems, 748 pp. Caruga Aqua Ventures, New York.
- Todorova S. y Kozhuharova L. 2010. Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. *World Journal Microbiological Biotechnology*, 26:1207–1216.
- Tsofack J.E.K., Zamostiano R., Watted S., Berkowitz A., Rosenbluth E., Mishra N. and del Pozo J. 2017. Detection of Tilapia lake virus in clinical samples by culturing and nested reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 55: 759-767.
- Vieites J.M., Guazzaroni M.E., Beloqui A., Golyshin P.N. and Ferrer M. 2008. Metagenomics approaches in systems microbiology. *FEMS microbiology reviews*, 33: 236-255.
- Villamil L. y Martínez M. 2009. Probióticos como herramienta biotecnológica en el cultivo de camarón: reseña. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras* 38: 165-187.
- Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M. and Cole J.R. 2007. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied Environmental Microbiology*, 73: 5261–5267.
- Wang Y. 2007. Effect of probiotics in growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 269: 259–264.
- Wei Y.F., Liao S.A. and Wang, A.L. 2016. The effect of different carbon sources on the nutritional composition, microbial community and structure of bioflocs. *Aquaculture*, 465: 88-93.
- Wilén B.M., Onuki M., Hermansson M., Lumley D. and Mino T. 2008. Microbial community structure in activated sludge floc analysed by fluorescence in situ hybridization and its relation to floc stability. *Water Research*, 42: 2300-2308.
- Yilmaz P., Parfrey L.W., Yarza P., Gerken J., Pruesse E., Quast C., Schweer T., Peplies J., Ludwig W. and Glöckner F.O. 2014. The SILVA and “all-species living tree project (LTP)” taxonomic frame-works. *Nucleic Acids Research*, 42: 643–648.
- Zhou Q., Chen T. and Han S. 2017. Characteristics of Bacterial Communities in Cyanobacteria-Blooming Aquaculture Wastewater Influenced by the Phytoremediation with Water Hyacinth. *Water*, 9: 1-11.

- Zokaeifar H., Balcázar J.L., Saad C.R., Kamarudin M.S., Sijam K., Arshad A. and Nejat N. 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 33: 683-689.
- Zuenko V.A., Laktionov K.S., Pravdin I.V., Kravtsova L.Z. and Ushakova N. A. 2017. Effect of *Bacillus subtilis* in feed probiotic on the digestion of fish cultured in cages. *Journal of Ichthyology*, 57: 152-157.



# International Journal of Fisheries and Aquatic Studies

E-ISSN: 2347-5129

P-ISSN: 2394-0506

(ICV-Poland) Impact Value: 5.62

(GIF) Impact Factor: 0.549

IJFAS 2018; 6(2): 525-533

© 2018 IJFAS

www.fisheriesjournal.com

Received: 07-01-2018

Accepted: 08-02-2018

**Cienfuegos Martínez Kathia**

Maestría en Ciencias

Agropecuarias, Bioinformática y

Microbiología Ambiental.

Universidad Autónoma

Metropolitana- Unidad Lerma,

Mexico

**Monroy Dosta María del Carmen**

Departamento del Hombre y su

ambiente. Laboratorio de

Producción de Alimento Vivo

para la Acuicultura, Mexico

**Hamdan Partida Aida**

Departamento de Atención a la

Salud. Laboratorio de

Microbiología y Biología

Molecular. Universidad

Autónoma Metropolitana-

Unidad Xochimilco, Mexico

**Castro Mejía Jorge**

Departamento del Hombre y su

ambiente. Laboratorio de

Producción de Alimento Vivo

para la Acuicultura, Mexico

**Aguirre Garrido José Félix**

Departamento de Ciencias

Ambientales, Grupo de

Biotecnología, Bioinformática y

Microbiología Ambiental.

Universidad Autónoma

Metropolitana- Unidad Lerma,

Mexico

**Bustos Martínez Jaime Amadeo**

Departamento del Hombre y su

ambiente. Laboratorio de

Producción de Alimento Vivo

para la Acuicultura, Mexico

## Correspondence

**Monroy Dosta María del Carmen**

Departamento del Hombre y su

ambiente. Laboratorio de

Producción de Alimento Vivo

para la Acuicultura, Mexico

## Effect of two probiotics on bacterial community composition from biofloc system and their impact on survival and growth of tilapia (*Oreochromis niloticus*)

**Cienfuegos Martínez Kathia, Monroy Dosta María del Carmen, Hamdan Partida Aida, Castro Mejía Jorge, Aguirre Garrido José Félix and Bustos Martínez Jaime Amadeo**

### Abstract

The main goal of this study was to evaluate the effect of two probiotics on bacterial community composition of Biofloc system using molasses as carbon source. 135 tilapia organisms with an initial mean weight of  $7.08 \pm 0.17$ g and a total length of  $7.47 \pm 0.16$ cm were used for the present study. The fish were cultivated in plastic containers of 100L testing three experimental diets: Biofloc as control, Biofloc enriched with *Bacillus subtilis* and Biofloc enriched with *Rhodococcus* sp. Every 15 days, weight and length, as well as water quality parameters were analyzed. For DNA extraction, 1L of water was extracted from each treatment (initial, middle and final phase). The samples were sent to IMR to make the massive sequencing of the region V4-V5 from 16S rRNA. The bioinformatic analysis was made with MOTHUR and STAMP programs. 20 phyla were obtained, from which the most abundant were: Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia and Fusobacteria from each treatment. Bacterial community showed variations in different periods, at the beginning were similar in all the cases, while at the end *Rhodococcus* sp. was different because it showed variations in the composition. The probiotics did not show significant effects in growth but improved the tilapia organism's survival.

**Keywords:** biofloc, probiotics, massive sequencing, *Oreochromis niloticus*

### 1. Introduction

The Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) has become, in Mexico, an important economic species, as in 2016, 117,806 tons production was reported with an increase of 15% with respect to the last year [1]. It is a species with wide range tolerance to environmental variations, easy reproduction, and with possibility to culture in different aquaculture systems [2; 3]. However, this species is not exempted to show problems associated with diseases or nutritional deficiencies, which represents a limit factor to increase the tilapia production [4; 5]. At same time, the increase of their production has generated a concern to environmental impact, generated by this activity, because the effluent discharges derived from its production, rich in organic matter, chemicals, antibiotics, and hormones which were used in the culture system and impact on the ecosystem [6], which allow the development of new culture production systems with low environmental impact [7; 8]. This is the case of Biofloc technology, which is supported in generation of microbial floccules produced by external carbon source, where heterotrophic bacteria that develops have principal functions in carbon and nitrogen recycle (present in organic matter) in the nutrient availability, in better water quality, disease control, and cultured organism's nutrition [9; 10].

On the other hand, the use of probiotic additives in aquaculture have increased as an alternative to the use of chemicals and antibiotics for diseases control. Several studies have shown that it contributes to intestinal microbial balance, increase the immune response, and increase the nutrient assimilation, which leads to better survival and growth of cultured species [11]. Based on the above, the scientific community assures that microbial controlled manipulation can be beneficial in productive systems [12] and in recent years, diverse studies were focused in the use of Biofloc system and probiotic additives inclusion, trying to increase the obtained benefits when these technologies were applied separately. However, it is

unknown the microbial community's dynamic associated to floccules, to implicated taxonomic groups, the variation can be done when probiotic bacteria were applied to system, and their effect to cultured organisms.

With respect to probiotics, there is a biotechnology which in last 20 years has increased worldwide about fish and crustacean culture [13, 14], not only because their application was associated with gut health in cultured species, but also with environmental bioremediation of soil and water in aquaculture systems. The effects of strains of *Bacillus subtilis*, *Paracoccus* sp., *Bacillus pumillus*, among others, added to water directly, involve the modulation of microbiological profile in ponds, degradation of undesirable residues (ammonic, nitrite, and hydrogen sulfide), higher mineralization of organic matter and, decrease of anaerobic conditions in lower surface of ponds, avoiding noxious anoxic areas [15].

The definition of probiotic [16] is: "Live microorganisms which added in adequate quantities provide benefit actions on host and environment wellness that surrounds them". With respect to the advantages that probiotics grant it can be mentioned the nutrient assimilation increase, stimulation of immune system, potential pathogen exclusion, and nitrogen compound degradation in culture water. That's why they were used to prevent infections, growth promoters, and improve water quality [17, 18, 19]. Between probiotics most used were lactic bacteria, bifidobacteria, and yeast. In recent years, bacteria strains which are used have been expanded, principally *Bacillus* sp. genus, which were commercialized in preparation form, with one or more live microorganisms, which allow the production of diverse aquatic organisms in aquaculture [17, 20]. So, the goal of this investigation is to make the comparison effect in tilapia organisms with two probiotic additives on bacteria community composition in Biofloc system, and their effect on *Oreochromis niloticus*.

## 2. Materials and Methods

This study was made in the Chemical Analysis of Live Food Laboratory and Microbiology and Molecular Biology Laboratory at Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco.

### 2.1 Experimental design and culture conditions

The culture of tilapia in Biofloc system was made in nine plastic containers of 100L capacity, with an air diffuser to assure the particles movement. In each container 15 juvenile's tilapias with a mean weight of  $7.08 \pm 0.17$  g and mean length of  $7.47 \pm 0.16$  cm were placed. Dairy was applied commercial food (Alimentos del Pedregal®, Toluca, State of Mexico) with 45% of protein and particle size of 0.6-0.8 mm, considering 10% of total weight. Ratio was adjusted every 15 days. To assure the Biofloc development in culture system, the relation C/N=20:1 was maintained [9], by controlling the supply of molasses as external carbon source. Furthermore, were added two different probiotics: *Bacillus subtilis* and *Rhodococcus* sp., in bacterial concentration of  $1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. The experiment was formed by one control treatment (Biofloc), one treatment with Biofloc enriched with *Bacillus subtilis*, and one treatment with Biofloc enriched with *Rhodococcus* sp. Each treatment has three replicates and the experiment was done in a period of 60 days.

### 2.2 DNA extraction

At initial, middle and final phase of the experiment (day one,

30 days, 60 days), water samples were taken from each treatment in sterile beakers of 1L capacity coded as: 1) IC (Initial Control), IB (Initial *Bacillus subtilis*), IR (Initial *Rhodococcus* sp.); 2) MC (Middle Control), MB (middle *Bacillus subtilis*), MR (Middle *Rhodococcus* sp.); and 3) FC (Final Control), FB (Final *Bacillus subtilis*), FR (Final *Rhodococcus* sp.). After obtaining the sample, this was centrifuged to obtain the pellet and suddenly make the DNA extraction using Silica Extraction Kit (Gene Reach Biotechnology Corp) [21]. DNA concentration was measured with Bio-photometer Eppendorf. The quality of genomic DNA extraction was detected in 1% agarose gel [22].

### 2.3 Illumina sequencing

The samples were send to sequencing service Integrated Microbiome Resource (IMC) in Ontario, Canada to make the massive sequencing of 16S RNA gen V4 and V5 region with Illumina MiSeq with chemical of kit 300 + 300 V3. The amplification products for PCR of the regions V4-V5 variables of 16S rRNA gen were obtained using universal primers 515 F (Illumina adapters + 5'GTGYCAGCMGCCGCGGTAA3') and 926 R (Illumina adapters + 5'CCGYCAATYMTTTRAGTTT3').

The multiplexing, and sequencing of amplicons were made by double label design of indexing using barcode of 8 pb with the kit Nextera XT Index v2 (Illumina, San Diego, CA, USA).

### 2.4 Bioinformatic analyses

Bioinformatics analyses were made using MOTHUR, version 1.39.5, following the MiSeq SOP technique [23]. Selected reads must meet the following criteria: no ambiguous bases, a minimum length of 400 bp, no homopolymers of 8 bp and above. Demultiplexing was done with a barcode mismatch tolerance of one base for the 8-base molecular identifier tags. Operational taxonomic units (OTUs) were assigned to qualified reads at 3% dissimilarity using average-neighbor algorithm, chimeric reads were identified and excluded using UCHIME [24], and singletons were excluded to avoid inflated OTUs numbers using recommended MOTHUR's commands. Species diversity and richness, as well as rarefaction curves were computed at 97% similarity, as part of MOTHUR's alpha diversity pipeline, with the database Silva bacterial reference alignment [25]. Five metrics were calculated to assess the bacterial communities including number of observed OTUs, Shannon diversity index, and the estimators Inv-Simpson and Chao1 for species richness. Calculation of these parameters was done by normalizing all the libraries. Principal coordinates analysis (PCoA) were performed with UniFrac [26] using clustering at 97 % sequence identity. The RDP taxonomy classifier function was used to align and assign identities to the Illumina sequence data [27]. Downstream statistical analysis was performed using STAMP [28].

### 2.5 Water and sedimentable solids quality

Once a week, water samples were taken from each experimental plastic container to evaluate their quality. For that, temperature (°C), pH, and dissolved oxygen (DO, %) were measured with a multiparametric equipment HANNA (HI 9829). At same time, were analyzed the nitrogen compounds, like nitrites (NO<sub>2</sub>-, mg/L), nitrates (NO<sub>3</sub>.mg/L), and ammonium (NH<sub>4</sub>+, mg/L) with autoanalyzer HANNA Aquaculture Photometer (HI83203), according to standard methods of HANNA (HANNA Company, 2003) [29]. To

measure the sedimentable solids quantity produced by Biofloc system was use an Imhoff cone, introducing 1L of water from each plastic container and let it sedimented by 15 to 20 minutes to know the sedimentable solids volume in mL/L [19; 30].

**2.6 Growth and survival of *Oreochromis niloticus***

To obtain the biometric values, every 15 days fish were weighted with Adventurer™ Pro OHAUS balance and the total length of tilapias were measured with digital Scala® Vernier. With these values were obtained the Intrinsic Growth Rate (IGR) and the Absolute Growth Rate (AGR). Likewise, the organisms were daily counted to determined survival rate.

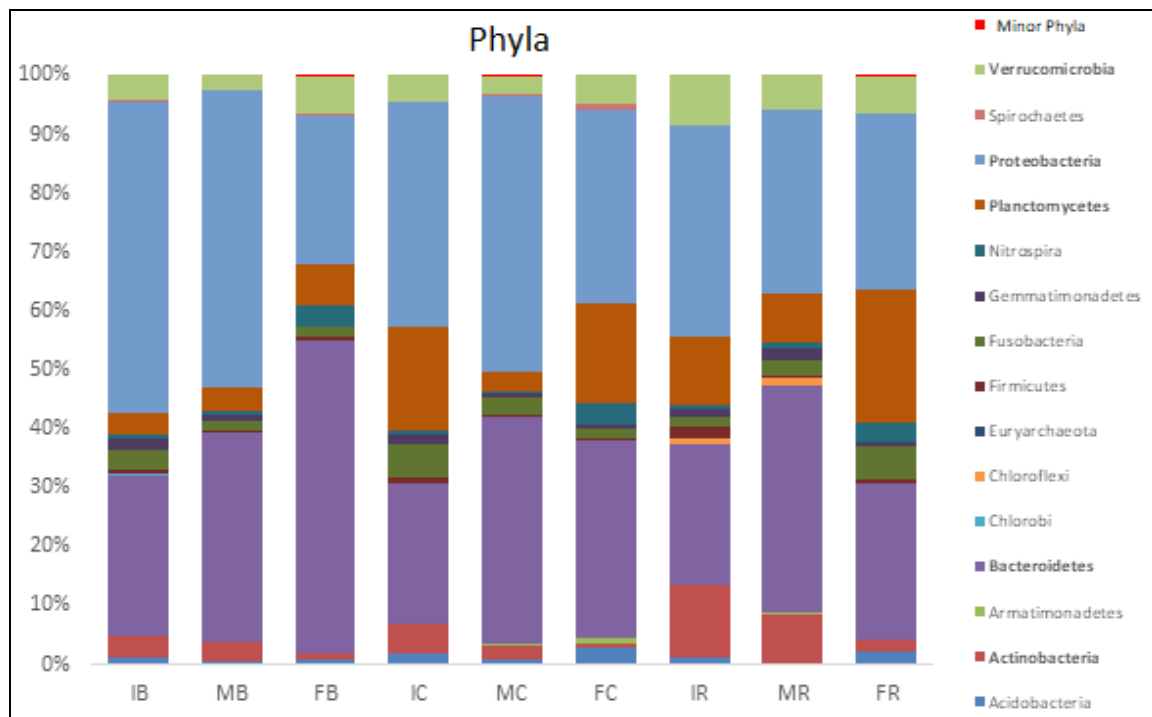
**2.7 Statistical analysis**

A database was made in Excel 2013 program to obtain descriptive statistics of water quality and fish growth values, for later make a one-way ANOVA analysis of a random model. In case obtaining significant differences ( $P < 0.05$ ), a multiple mean comparison was made using Tukey test from SYSTAT 12.0 program.

**3. Results**

**3.1 Bacterial communities**

The metagenomic analysis results showed that microbial community associated to Biofloc is represented by 20 phyla. Those who showed highest relative abundance were: Proteobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes, Verrucromicrobia, and Actinobacteria (Fig. 1).



**Fig 1:** Relative abundance of bacteria phyla presents in Biofloc and Biofloc with probiotics

These phyla were present on all samples of three experimental phases. Nevertheless, in treatments with probiotic *B. subtilis* the dominant phylum was Proteobacteria, even though its relative abundance presented variations regarding time, at initial and middle phases of experiment shows 55 and 50% respectively, while at final phase show only 20%. Regarding to treatments with *Rhodococcus* sp. the relative abundance of Proteobacteria was the same (30%) in different analyzed phases. On the other hand, control treatment (Biofloc without probiotic) obtained a relative abundance of 35% at initial phase, 45% at middle phase and 30% at final phase. The phylum Firmicutes to which the genus *Bacillus* belongs and Actinobacteria, that includes *Rhodococcus* sp., are present in the study, nevertheless, were found with a relative abundance

lower to 10%.

Table 1 shown higher and lower relative frequency values in each treatment. Highest values were found in MB, MC, FC treatments (31.20, 31.10, 17.31% respectively) with Alphaproteobacteria group; IB, FB, MR treatments (11.78, 19.12, 16.94% respectively) with Flavobacteria group; IR treatment (12.28%) with Actinobacteria group; and FR treatment (15.36%) with Planctomycetacia group. Lowest values were observed in IB, MB, IC, MC, IR, MR treatments (1.36, 0.63, 0.45, 0.50, 0.79, 0.33% respectively) with Gammaproteobacteria group; FB, FR treatments (0.22, 0.65% respectively) with Betaproteobacteria group; and FC treatment (0.21%) with Actinobacteria group.

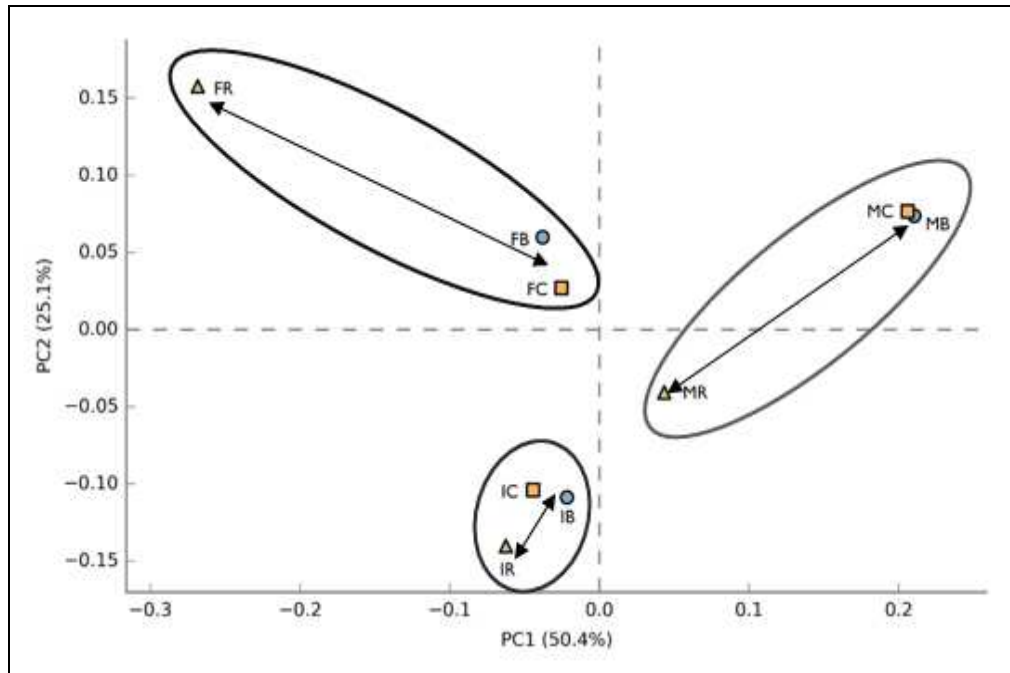
**Table 1:** Relative frequency of bacteria families identified with most frequency from each treatment.

| Taxonomic classification |                     |                     |                       | Treatments |       |       |       |       |       |      |       |      |
|--------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|------|
| Phyla                    | Class               | Order               | Family                | IB         | MB    | FB    | IC    | MC    | FC    | IR   | MR    | FR   |
| Proteobacteria           | Gammaproteobacteria | Gammaproteobacteria | Pseudomonadaceae      | 1.36       | 0.63  | 3.22  | 0.45  | 0.50  | 2.35  | 0.79 | 0.33  | 2.54 |
|                          | Betaproteobacteria  | Burkholderiales     | Burkholderiales_incer | 4.81       | 2.23  | 0.22  | 10.71 | 5.88  | 1.46  | 4.71 | 5.86  | 0.65 |
|                          | Alphaproteobacteria | Caulobacteriales    | Caulobacteraceae      | 4.82       | 31.20 | 6.28  | 6.38  | 31.10 | 17.31 | 6.98 | 14.42 | 4.62 |
| Bacteroidetes            | Sphingobacteria     | Sphingobacteriales  | Chitinophagaceae      | 3.96       | 4.58  | 18.49 | 2.58  | 4.17  | 5.95  | 6.86 | 5.78  | 2.61 |
|                          |                     |                     | Sphingobacteriaceae   | 1.75       | 1.79  | 6.51  | 1.23  | 3.94  | 3.78  | 2.86 | 6.10  | 7.62 |

|                 |                  |                 |                   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-----------------|------------------|-----------------|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                 | Flavobacteria    | Flavobacterials | Flavobacteriaceae | 11.78 | 22.34 | 19.12 | 10.52 | 22.28 | 8.62  | 2.80  | 16.94 | 3.95  |
| Actinobacteria  | Actinobacteria   | Actinomycetals  | Mycobacteriaceae  | 3.75  | 3.03  | 0.57  | 5.05  | 2.32  | 0.21  | 12.28 | 6.99  | 1.12  |
| Planctomycetes  | Planctomycetacia | Planctomycetals | Planctomycetaceae | 4.72  | 4.45  | 6.14  | 18.51 | 3.51  | 14.92 | 12.61 | 8.11  | 15.36 |
| Verrucomicrobia | Opitutae         | Opitutals       | Opitutaceae       | 2.13  | 1.13  | 1.08  | 1.14  | 1.38  | 1.44  | 3.28  | 1.81  | 1.41  |
| Fusobacteria    | Fusobacteria     | Fusobacterials  | Fusobacteriaceae  | 3.92  | 1.79  | 1.54  | 5.91  | 3.32  | 1.30  | 1.89  | 2.61  | 3.96  |

The main component analysis for different treatments in experimental phases show that initial phase values of all treatments were near each other. All of them began with a similar microbial composition as shown in Figure 2. In middle phase at control and *B. subtilis* treatment were different

regarding to *Rhodococcus* sp. which show that composition of bacterial community changed regarding to other treatments. In final phase, *Rhodococcus* sp. treatment was different from each other's, because have variation in their composition change.



**Fig 2:** Microbial composition of Biofloc samples, Biofloc + *B. subtilis* and Biofloc + *Rhodococcus* sp. for each sequencing of 16s rRNA gen, V4 and V5 region

In general, diversity and richness index showed similar values between initial and middle phases, but specie richness was higher for *B. subtilis* treatment. In the initial phase, Sobs richness was 1497, Chao=3494.5 and in middle phase Sobs=1347, Chao=3052.02, while in final phase the highest richness was for *Rhodococcus* sp. treatment with values of Sobs=1716 and Chao=4066.62. Also, bacterial community

diversity was higher at final phase of control treatment. Nevertheless, the number of coverage was high, because all samples obtained a value between 0.97 and 0.99. Regarding to sequencing number, the phase with lowest number was the middle with *Rhodococcus* sp. treatment (29250) and highest number was final phase with *B. subtilis* treatment (Table 2).

**Table 2:** Number of obtained sequences, sample coverture, richness and diversity of bacterial community of different treatments measured through Illumina MiSeq analysis of fragments of gen 16S rRNA amplified by PCR.

| Samples | Sequences Number | Coverage | Community Richness       |                           | Community Diversity   |                     |
|---------|------------------|----------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------|
|         |                  |          | Sobs (Observed richness) | Chao (Estimated richness) | InvSimpson (Richness) | Shannon (Diversity) |
| FB      | 34157            | 0.97     | 1548                     | 3374.02                   | 39.17                 | 4.74                |
| FC      | 32556            | 0.97     | 1561                     | 3518.82                   | 47.46                 | 4.89                |
| FR      | 31256            | 0.97     | 1716                     | 4066.62                   | 27.96                 | 4.79                |
| IB      | 32018            | 0.97     | 1497                     | 3494.5                    | 53.64                 | 5.09                |
| IC      | 30782            | 0.98     | 1259                     | 2686.62                   | 52.93                 | 4.98                |
| IR      | 24040            | 0.99     | 754                      | 1281.65                   | 41.37                 | 4.68                |
| MB      | 23782            | 0.97     | 1347                     | 3052.02                   | 33.21                 | 4.69                |
| MC      | 28447            | 0.97     | 1235                     | 2965.94                   | 35.87                 | 4.55                |
| MR      | 29250            | 0.98     | 1176                     | 2265.66                   | 64.19                 | 4.90                |

On the other hand, the rarefaction curves of treatments in different experiment stages are shown in Fig. 3, where it is observed that number of Operational Taxonomic Units (OUT's) was high except in the initial phase sample of

Biofloc + *Rhodococcus* sp. (IR). In general, the effort of sequencing was adequate with coverage values higher than 95% as shown in Table 2 and Figure 3.

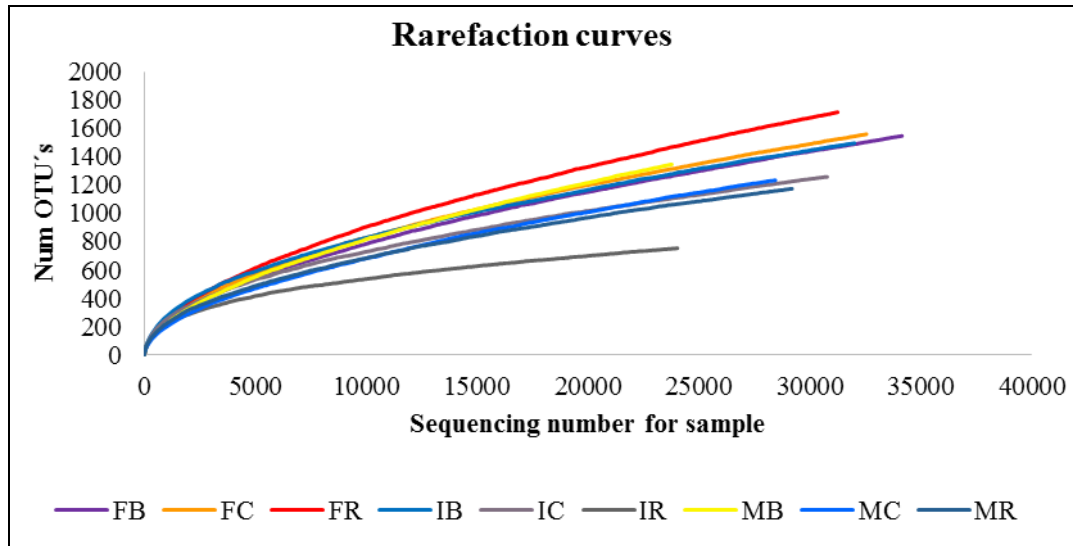


Fig 3: Rarefaction curves of the samples of Biofloc with corresponding probiotics in the different stages of experiment

### 3.2 Water quality and sedimentable solids parameters

Regarding water quality parameters as temperature, dissolved oxygen, pH and nitrogenous compounds did not show

significant variations during the whole experiment ( $P < 0.05$ ) in all experimental treatments (Table 3).

Table 3: Average values and standard deviation of the water quality parameters of the treatments.

| Parameters                         | Biofloc + <i>Rhodococcus sp.</i> Biofloc + <i>Bacillus subtilis</i> Biofloc |       |       |                       |       |       |                       |       |       |  |
|------------------------------------|---|-------|-------|-----------------------|-------|-------|-----------------------|-------|-------|--|
|                                    | Mean SD   | Min   | Max   | Mean SD               | Min   | Max   | Mean SD               | Min   | Max   |  |
| pH                                 | 7.67 ( $\pm 0.21$ )a  | 7.20  | 7.85  | 7.57 ( $\pm 0.18$ )a  | 7.36  | 8.01  | 7.67 ( $\pm 0.16$ )a  | 7.45  | 7.95  |  |
| Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) | 21.58 ( $\pm 0.72$ )a   | 20.69 | 22.77 | 21.86 ( $\pm 0.78$ )a | 20.29 | 22.44 | 21.69 ( $\pm 0.66$ )a | 20.63 | 22.40 |  |
| Dissolved Oxygen mg/L              | 89.89 ( $\pm 6.67$ )a   | 74.83 | 94    | 87.39 ( $\pm 7.25$ )a | 77.67 | 96.37 | 89.85 ( $\pm 5.73$ )a | 80.10 | 95.1  |  |
| NO <sub>2</sub> - mg/L             | 0.59 ( $\pm 0.28$ )a  | 0.28  | 1.15  | 0.52 ( $\pm 0.26$ )a  | 0.22  | 1.15  | 0.58 ( $\pm 0.31$ )a  | 0.19  | 1.15  |  |
| NO <sub>3</sub> - mg/L             | 24.17 ( $\pm 5.40$ )a   | 18.73 | 30.0  | 24.70 ( $\pm 4.13$ )a | 13.6  | 30.0  | 22.96 ( $\pm 4.26$ )a | 13.43 | 30.0  |  |
| NH <sub>4</sub> + mg/L             | 0.80 ( $\pm 0.16$ )a  | 0.39  | 0.80  | 0.63 ( $\pm 0.12$ )b  | 0.51  | 1.55  | 0.61 ( $\pm 0.15$ )b  | 0.41  | 0.87  |  |
| Sedimentable solids                | 5   | 0     | 5     | 5                     | 5     | 5     | 5                     | 5     | 10    |  |

The data are mean values ( $\pm$  standard deviation). Different letters in a row show significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments.

### 3.3 Growth of tilapia

The intrinsic growth rate (IGR) and absolute growth rate (AGR) in length and weight of fish, are shown in Table 4. Both variables did not show significant differences between

treatments with  $P = 0.755$  and  $P = 0.472$  respectively.

The survival was different for *Rhodococcus sp.* treatment (91%) and *B. subtilis* treatment (89%) regarding to control group (71%).

Table 4. Growth parameters of *O. niloticus* in the different treatments

| Parameter                  | Control                      | BFT + <i>Bacillus subtilis</i> | BFT + <i>Rhodococcus sp.</i> |
|----------------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Initial weight (g)         | 7.15 $\pm$ 1.03 <sup>a</sup> | 6.88 $\pm$ 0.98 <sup>a</sup>   | 7.21 $\pm$ 1.01 <sup>a</sup> |
| Final weight (g)           | 8.97 $\pm$ 2.61 <sup>a</sup> | 9.21 $\pm$ 2.38 <sup>a</sup>   | 9.54 $\pm$ 1.97 <sup>a</sup> |
| AGR (g day <sup>-1</sup> ) | 0.030                        | 0.039                          | 0.039                        |
| IGR (%/day)                | 0.37                         | 0.48                           | 0.46                         |
| Initial length             | 7.61 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup> | 7.28 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>   | 7.52 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup> |
| Final length               | 8.26 $\pm$ 1.25 <sup>a</sup> | 8.11 $\pm$ 1.08 <sup>a</sup>   | 8.24 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup> |
| AGR (g day <sup>-1</sup> ) | 0.011                        | 0.014                          | 0.012                        |
| IGR (%/day)                | 0.14                         | 0.18                           | 0.15                         |
| Survival (%)               | 71                           | 89                             | 91                           |

The data are mean values ( $\pm$  standard deviation). Different letters in a row show significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments.

## 4. Discussion

Microorganisms are a fundamental part of trophic networks in aquatic environments, by contributing to nutrient recirculation and interacting with a broad range of organisms [31]. To understand their specific niche function, it is essential to identify and quantify each integrant of this community. That's why metagenomics techniques are very important as an emergent tool for studying non-cultures microorganism's communities [32]. The results of metagenomics analysis in this study show that microbial community associated to Biofloc

was represented by 20 phyla, which highest relative abundance were: Proteobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes, Verrucromicrobia, and Actinobacteria, but Protobacteria and Bacteroidetes phyla were the ones with higher relative abundances in all treatments. These results agree with respect those reported in an investigation [33], which made an experiment to evaluate the effect of addition of tapioca starch, cellulose, and combination of both sources on Biofloc microbial diversity when herbivorous carp was cultured, using massive sequencing. These authors report that

independent that carbon source were added to culture system, Proteobacteria and Bacteroidetes phyla show the highest relative abundance. It should be noted that bacteria of these phyla were reported in different studies as ubiquitous in aquatic environments and aquaculture production systems [34, 25, 36].

On other hand, it has been proved that microbial Proteobacteria group is important to nutrient recycling process and mineralization of organic components in aquatic systems [37], and this group include several phototrophic and heterotrophic genders with high degradative capacity of compounds like methane and methanol in aquatic environments [38]. Other study [39], mentioned that Betaproteobacteria, also identified in this investigation, was aerobic or facultative bacteria group, which can transform nitrogen compounds in aquatic environments. One of principally genus is *Nitrosomonas* that oxidize ammonia.

Bacteria families with highest relative abundance in this study, have also been reported in aquaculture systems and Biofloc systems like Pseudomonadaceae [40], Caulobacteraceae [34], Chitinophagaceae [41], Sphingobacteriaceae [42], which were efficient bacteria to transform several compounds in water column like cellulose, chitin, collagen, and nitrogen compounds produced during culture process.

One of the most important objectives of this investigation was to evaluate the effect of probiotic addition on Biofloc microbial community in tilapia culture. The analysis results showed that probiotic addition does not modify the present microbial community and neither dominates within the system because relative abundance of *B. subtilis* was very low specially in the final phase of the experiment (lower than 10%), opposite to what was expected, because it is one the genus most used as probiotic in aquaculture with positive effects in growth, survival, immune response, and disease control of fishes and crustaceans, which allow their capacity of competitive exclusion [15, 43, 44]. Nevertheless, in Biofloc culture system, must take into account that production conditions of aquatic organisms differ significantly regarding to conventional systems, because promote the growth of complex diversity of heterotrophic bacteria using an external carbon source and high aeration supply, which act not only cultivated species, but also in bacterial groups that can adapted to such conditions [45, 46], but unlike some authors [47] which mentioned that they do not obtain any positive effects when commercial probiotic like *Bacillus* spp. and *Lactobacillus* sp. in Biofloc system for shrimp culture were supplied. Authors mentioned that this is possible when processes of anaerobiosis happens at pond bottom or by probiotic concentration which probiotic was added.

Regarding to treatments where *Rhodococcus* sp. was added, it was not observed an effect on Biofloc bacterial community, also their relative abundance at three experimental phases were lower than 10%, even though it is known that this microorganism easily adapts to aquaculture systems, even in adverse conditions, for other genders, because their high metabolic diversity with which it can biodegrade and use diverse carbon sources, metals, hydrocarbons, among others [48].

It is important to mention that in Biofloc systems it has been documented the presence of probiotic bacteria that develops *in situ* in natural way, because in this systems with low or non-water exchange, fishes feces which were liberate to water, there are bacteria that are part of intestinal microbiota

and when they have contact with water, rich in carbohydrates due to the input of external carbon source, proliferate significantly without need of probiotic addition of external sources [49, 50].

The analyzed diversity index in this work indicates that bacterial richness (Chao) and diversity (Shannon) in Biofloc is high (4066.62 and 5.08 respectively) considering the mentioned in an investigation [33, 37], which obtained bacterial richness and diversity values of 677 and 4.82 respectively in Biofloc cultures, indicating that are high values for aquatic environments. Also, in other study [51] which reported Shannon index value of >5.0 in tilapia culture with Biofloc, showed high diversity. The Chao index was also high with a value of 7656.

Rarefaction curves of treatment at different experimental stages showed a high number of OUT's (1716), higher than reported by other studies with values between 623 and 277.59 [33, 37]. According to some authors [51], coverage value was high when was close to 1.

Regarding to physicochemical parameters there were not any significant variation between treatments in all experimental period, mainly in nitrogenous compounds which are one of the more stressful factors for fish, because nitrites values were between 0.52 and 0.59 mg/L, nitrates between 22.96 and 24.17 mg/L and ammonia between 0.61 and 0.80 mg/L being within optimal ranges for tilapia culture [3, 52, 53]. Some authors [54], mentioned that one of Biofloc benefits used to growth aquatic organisms, was the reduction and stabilization of nitrogenous compounds, because organic wastes accumulated in ponds was degraded, and produced ammonia by fishes was nitrified or assimilated by microbial community, without the need of water exchange on conventional culture systems. It has also been reported that cyanobacteria transform ammoniac nitrogen in compounds that are not harmful for fish in culture and produce microbial biomass available for following trophic levels [55].

Regarding the weight and length organisms increase, there were not significant differences between treatments, but with respect IGR values that show significant differences (P=0.030 and P=0.039 respectively), was agree with a study [56], which made an 84 days' experiment to saw tilapia growth rate, comparing recirculation system with respect Biofloc system, and observed too, significant difference in IGR values compared to control treatment, but different with AGR, which did not show significant differences (P=0.37 in weight; P=0.48 in length). In other study [57], which evaluated the effect that Biofloc system produced on tilapia growth for eight experimental weeks, they observed that IGR was significantly higher in Biofloc system than in conventional system. On other hand, other study [58], which applied diets with 32% of protein, different percentages of tryptophan and 20% of Biofloc flake, observed that tilapia weight increase significantly because they began with a weight under 5g and in 60 days' treatment, organisms obtained highest mean weight value of 41.84g. The authors mentioned that these results were provoked because Biofloc positively affect the digestive enzymatic activity of cultured organisms, improving the nutrient assimilation. Some authors evaluated the *O. niloticus* growth in Biofloc [59], adding rice flour and molasses as external carbon source. The weight gain was 40g in Biofloc system in an experimental period of 12 weeks, because tilapia organisms can use food particles produced *in situ*, included suspended bacteria.

Survival was higher in treatments with Biofloc enriched with

probiotics with respect control treatment, even when metagenomics analysis did not showed any important effects on Biofloc microbiota, *Rhodococcus* sp and *B. subtilis* improved the wealth being health of fish, because they improve, not only the immune system but also water quality, which allowed to reach a higher survival values as mentioned in a study <sup>[60]</sup>, which indicates that by adding probiotics to diet, immune response increments and therefore this variable.

## 5. Conclusions

The present work shows great relevance because the use of massive sequencing technique, as important tool to obtain better information about bacterial community, which were developed in Biofloc systems, although there are some works that made isolation and identification with conventional microbiological tests and cultured organisms, these doesn't give all the information that is obtained with this metagenomics analyses, which not only allow to identify the diversity and abundance of species, but also the ecological function that those bacteria have in their habitat. This study expands the knowledge about Phyla that develop in Biofloc systems, because in most cases, it was only considered the dominant Phyla Firmicutes, Proteobacteria, and Actinobacteria, but with this metagenomics tool were identified 20 phyla among those that were considered with greater abundance Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia and Fusobacteria.

The addition of probiotics *B. subtilis* and *Rhodococcus* sp. Did not affect in bacterial composition of Biofloc, because these bacteria isolated from tilapia intestinal, did not support environmental conditions of culture system or were displaced by Biofloc microbiota. Also, it must be considered the dose and time of administration. Therefore, it is required to make more investigations to evaluate relevance of probiotic addition in Biofloc systems.

Although no significant differences were observed in length, weight and survival of organisms, improved substantially with probiotic use. Also, water quality parameters, especially nitrogenous compounds, were maintained optimum to those levels was required for tilapia culture, which was important, because there is a lower environmental impact using water resource for this aquaculture activity.

## 6. Acknowledgments

The first author thanks to Postgraduate program of Agricultural Sciences Master's Degree of Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco for the given support and also to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) from Mexico, for the scholarship to successfully complete curriculum at the right time, with the CVU number 763372.

## 7. References

1. SAGARPA 2012. 6° Informe de Labores. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 1 de agosto de 2012.
2. Tenorio-Colin G. Caracterización isoenzimática de *Oreochromis niloticus* y *O. mossambicus* introducidas en México. Ciencia y Mar. 2003; 7(19):3-9.
3. El-Sayed A. Tilapia culture. 1st ed. CABI Publishing, Wallingford, 2006, 40.
4. Del-Pozo J, Mishra N, Kabuusu R, Cheetham S, Eldar A, Bacharach E *et al.* Syncytial hepatitis of tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) is associated with orthomyxovirus-like virions in hepatocytes. Veterinary Pathology. 2017; 54(1):164-170.
5. Tsofack JEK, Zamostiano R, Watted S, Berkowitz A, Rosenbluth E, Mishra N *et al.* Detection of Tilapia lake virus in clinical samples by culturing and nested reverse transcription-PCR. Journal of Clinical Microbiology. 2017; 55(3):759-767.
6. Espinosa PA y Bermúdez AMC. La acuicultura y su impacto al medio ambiente. Estudios Sociales. 2012; 2:218-232.
7. Ahmad I, Rani AB, Verma AK, Maqsood M. Biofloc technology: an emerging avenue in aquatic animal healthcare and nutrition. Aquaculture International. 2017; 25(3):1215-1226.
8. Bossier P, Ekasari J. Biofloc technology application in aquaculture to support sustainable development goals. Microbial Biotechnology. 2017; 10(5): 1012-1016.
9. Avnimelech Y. Biofloc technology: a practical guide book. 3rd ed. Baton Rouge, LA, 2009, 182.
10. Beardsley C, Moss S, Malfatti F, Azam F. Quantitative role of shrimp fecal bacteria in organic matter fluxes in a recirculating shrimp aquaculture system. FEMS Microbiology Ecology. 2011; 77(1):134-145.
11. Gutiérrez LA, David CA, Montoya OI y Betancur E. Efecto de la inclusión en la dieta de probióticos microencapsulados sobre algunos parámetros zootécnicos en alevinos de tilapia roja (*Oreochromis* sp.). Revista de Salud Animal. 2016; 38(2):112-119.
12. Emerenciano M, Cuzon G, Arévalo M, Gaxiola G. Biofloc technology in intensive broodstock farming of the pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum*: spawning performance, biochemical composition and fatty acid profile of eggs. Aquaculture Research. 2014; 45(10):1713-1726.
13. Pandiyan P, Balaraman D, Thirunavukkarasu R, George EGJ, Subaramaniyan K, Manikkam S, *et al.* Probiotics in aquaculture. Drug Invention Today. 2013; 5(1):55-59.
14. Swapna B, Venkatrayulu C, Swathi AV. Effect of probiotic bacteria *Bacillus licheniformis* and *Lactobacillus rhamnosus* on growth of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). European Journal of Experimental Biology. 2015; 5(11):31-36.
15. Olmos J, Paniagua-Michel J. *Bacillus subtilis* a potential probiotic bacterium to formulate functional feeds for aquaculture. Microbial & Biochemical Technology. 2014; 6(7):361-365.
16. FAO. Guidelines for the evaluation of Probiotics in foods. London Ontario, Canada: Food and Agricultural Organization of the United Nations/ World Health Organization, 2002.
17. Balcázar JL, De Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Cunningham D, Vendrell D, Muzquiz JL. The role of probiotics in aquaculture. Veterinary Microbiology. 2006; 114(3):173-186.
18. Hai NV. The use of probiotics in aquaculture. Journal of Applied Microbiology. 2015; 119(4):917-935.
19. Ringø E, Song SK. Application of dietary supplements (symbiotic and probiotics) in combination with plant products and  $\beta$ -glucans in aquaculture. Aquaculture Nutrition. 2016; 22(1):4-24.
20. Dotta G, Pedreira MJL, Jatobá A, Burgos MRE, Pilati C, Laterca MM. Acute inflammatory response in Nile tilapia fed probiotic *Lactobacillus plantarum* in the diet. Acta

- Scientiarum Biological Sciences. 2011; 33(3):239-246.
21. Huang JY, Kang ST, Chen I, Chang LK, Lin SS, Kou GH, Lo CF. Shrimp mir-10a Is Co-opted by White spot syndrome Virus to increase Viral gene expression and Viral replication. *Frontiers in Immunology*. 2017; 8:1-12.
  22. Thakuria D, Schmidt O, Siúrtáin MM, Egan D, Doohan FM. Importance of DNA quality in comparative soil microbial community structure analyses. *Soil Biology and Biochemistry*. 2008; 40(6):1390–1403.
  23. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB *et al.* Introducing Mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009; 75(23):7537–7541.
  24. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. 2011; 27(16):2194-2200.
  25. Yilmaz P, Parfrey LW, Yarza P, Gerken J, Pruesse E, Quast C *et al.* The SILVA and “all-species living tree project (LTP)” taxonomic frame-works. *Nucleic Acids Research*. 2014; 42(1):643–648.
  26. Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005; 71(12):8228–8235.
  27. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007; 73(16):5261–5267.
  28. Parks DH, Tyson GW, Hugenholtz P y Beiko RG. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*. 2014; 30(21):3123–3124.
  29. Luis-Villaseñor IE, Voltolina D, Audelo JM, Pacheco MR, Herrera VE and Romero E. Effects of Biofloc Promotion on Water Quality, Growth, Biomass Yield and Heterotrophic Community in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) Experimental Intensive Culture. *Italian Journal of Animal Science*. 2016; 14(3):332-337.
  30. Severiche C, Castillo M y Acevedo B. Manual de métodos analíticos para la Determinación de Parámetros Fisicoquímicos Básicos en Aguas. 1ª ed. Fundación Universitaria Andaluza Inca Garcilaso. Cartagena de Indias, Colombia, 2013, 95.
  31. Cruz-Leyva MC, Zamudio-Maya M, Corona-Cruz AI, González-de la Cruz JU y Rojas-Herrera RA. Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 2015; 2(4):99-115.
  32. Vieites JM, Guazzaroni ME, Beloqui A, Golyshin PN, Ferrer M. Metagenomics approaches in systems microbiology. *FEMS microbiology reviews*. 2008; 33(1):236-255.
  33. Deng M, Chen J, Gou J, Hou J, Li D, He X. The effect of different carbon sources on water quality, microbial community and structure of biofloc systems. *Aquaculture*. 2018; 482:103-110.
  34. Guo F, Zhang SH, Yu X, Wei B. Variations of both bacterial community and extracellular polymers: the inducements of increase of cell hydrophobicity from biofloc to aerobic granule sludge. *Bioresource technology*. 2011; 102(11):6421-6428.
  35. Wei YF, Liao SA and Wang AL. The effect of different carbon sources on the nutritional composition, microbial community and structure of bioflocs. *Aquaculture*. 2016; 465:88-93.
  36. Zhou Q, Chen T, Han S. Characteristics of Bacterial Communities in Cyanobacteria-Blooming Aquaculture Wastewater Influenced by the Phytoremediation with Water Hyacinth. *Water*. 2017; 9(12):1-11.
  37. Cardona E, Gueguen Y, Magré K, Lorgeoux B, Piquemal D, Pierrat F *et al.* Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. *BMC Microbiology*. 2016; 16(1):2-9.
  38. Martins P, Cleary DF, Pires AC, Rodrigues AM, Quintino V, Calado R *et al.* Molecular analysis of bacterial communities and detection of potential pathogens in a recirculating aquaculture system for *Scophthalmus maximus* and *Solea senegalensis*. *Plos one*. 2013; 8(11):1-17.
  39. Penny C, Gruffaz C, Nadalig T, Cauchie HM, Vuilleumier S and Bringel F. Tetrachloromethane-degrading bacterial enrichment cultures and isolates from a contaminated aquifer. *Microorganisms*. 2015; 3(3):327–343.
  40. Ndi OL, Barton MD. Resistance determinants of *Pseudomonas* species from aquaculture in Australia. *Journal Aquaculture Research and Development*. 2012; 3:1-6.
  41. Bartelme RP, McLellan SL, Newton RJ. Freshwater recirculating aquaculture system operations drive biofilter bacterial community shifts around a stable nitrifying consortium of ammonia-oxidizing archaea and comammox Nitrospira. *Frontiers in Microbiology*. 2017; 8:101.
  42. Bartie KL, Huys G, Swings J, Oanh DTH, Phuong NT, Shariff M *et al.* 2005. The Asiasist Project: A Study of Antimicrobial Resistance Associated with Asian Aquacultural Environments. In Workshop on Antibiotic Resistance in Asian Aquaculture Environments.
  43. Zokaeifar H, Balcázar JL, Saad CR, Kamarudin MS, Sijam K, Arshad A. *et al.* Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunology*. 2012; 33(4):683-689.
  44. Zuenko VA, Laktionov KS, Pravdin IV, Kravtsova LZ, Ushakova NA. Effect of *Bacillus subtilis* in feed probiotic on the digestion of fish cultured in cages. *Journal of Ichthyology*. 2017; 57(1):152-157.
  45. Wilén BM, Onuki M, Hermansson M, Lumley D, Mino T. Microbial community structure in activated sludge floc analyzed by fluorescence in situ hybridization and its relation to floc stability. *Water Research*. 2008; 42(8-9):2300-2308.
  46. Ray JA, Lotz JM. Comparing a chemoautotrophic-based biofloc system and three heterotrophic-based systems receiving different carbohydrate sources. *Aquacultural Engineering*. 2014; 63:54-61.
  47. De Paiva E, Alves G, Otavio L, Olivera A, Vasconcelos GTC. Intensive culture system of *Litopenaeus vannamei* in commercial ponds with zero water exchange and addition of molasses and probiotics. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 2016; 51(1):61-67.
  48. Sánchez N, Sandoval AH, Diaz F, Serrano JA. El género *Rhodococcus*. Una revisión didáctica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 2004; 24(1-

- 2):24-33.
49. Monroy DMC, Rodriguez G, Castro J and Becerril D. Importance and function of microbial communities in aquaculture systems with no water exchange. *Scientific Journal of Animal Science*. 2015; 4:103-110.
  50. Cienfuegos MK, Monroy DMC, Hamdan PA, Castro MJ, Becerril CD. Probiotics used in Biofloc system for fish and crustacean culture: A review. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. 2017; 5:103-110.
  51. Luo G, Zhang N, Cai S, Tan H, Liu Z. 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*. 2017; 479:732-741.
  52. Soto E, Fernandez D, Thune R, Hawke JP. Interaction of *Francisella asiatica* with tilapia (*Oreochromis niloticus*) innate immunity. *Infection and immunity*. 2010; 78(5):2070-2078.
  53. Ebeling J, Timmons M, Bisogni J. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*. 2006; 257(1-4):346-358.
  54. Emerenciano M, Martínez LR, Martínez M, Miranda A. Biofloc Technology (BFT): A Tool for Water Quality Management in Aquaculture, Water Quality, Prof. Hlanganani Tutu (Ed.). 2017; InTech. DOI: 10.5772/66416.
  55. Miranda BA, Mariscal LMA, López EJA, Rivas VME, Emerenciano M, Sánchez RA *et al.* Effect of inoculation of the cyanobacteria *Oscillatoria* sp. on tilapia biofloc culture. *Aquaculture Research*. 2017; 48(9):4725–4734.
  56. Luo G, Gao Q, Wang C, Liu W, Sun D, Li L *et al.* Growth, digestive activity, welfare, and partial cost-effectiveness of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in a recirculating aquaculture system and an indoor biofloc system. *Aquaculture*. 2014; 422:1-7.
  57. Long L, Yang J, Li Y, Guan C, Wu F. Effect of biofloc technology on growth, digestive enzyme activity, hematology, and immune response of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 2015; 448:135-141.
  58. Prabu E, Rajagopalsamy CB, Ahilan B, Jeevagan IJ, Renuhadevi M. Effect of Dietary Supplementation of Biofloc Meal with Tryptophan on Growth and Survival of GIFT Tilapia. *International Journal of Current Microbiology Applied Sciences*. 2017; 6(8):3426-3434.
  59. Azim ME, Little DC. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 2008; 283(1-4):29-35.
  60. Aly MS, Mohamed MF, John G. Effect of probiotic on the survival, growth and challenge infection in Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*. 2008; 39(1):647-656.