



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL
POR INVESTIGACIÓN

Título

**Relación entre los compuestos nitrogenados y las comunidades
microbianas presentes en un sistema de cultivo Biofloc y su
efecto en el crecimiento *Oreochromis niloticus***

QUE PRESENTA LA ALUMNA

Nombre

GUZMAN TIRADO KARLA MARIANA

Matrícula

2133063539

ASESOR INTERNO

Dra. en C. Monroy Dosta María del Carmen-UAM-X (28906)

ASESOR EXTERNO

INTITUTO NACIONAL DE LA PESCA

Biol. Leonardo Mundo Estrada

Ciudad de México,

Octubre 2019

Resumen

El objetivo de esta investigación fue establecer la relación entre los compuestos nitrogenados producidos en un sistema Biofloc para el cultivo de tilapia con las comunidades microbianas asociadas a los flóculos. Para lo cual se cultivaron 60 organismos de la especie *Oreochromis niloticus* que fueron divididos en dos tratamientos: un control (solo con alimento comercial) y otro con Biofloc utilizando como fuente de carbono residuos de Café. Ajustando los valores del alimento cada 15 días durante 12 semanas de estudio. Así mismo cada quince días se tomó muestras del agua para el conteo y caracterización de las comunidades bacterianas, para lo cual se utilizó el método propuesto APHA (1992). Se tomaron datos biométricos de los peces cada quince días para evaluar la ganancia en peso y sobrevivencia. Los resultados indican cambios en las comunidades bacterianas, principalmente en la abundancia durante las 6 quincenas de muestreo. Las comunidades con mayor abundancia fueron *Serratia liquefaciens* y *Enterobacter cloacae*, los cuales pertenecen a los grupos patógenos dentro del cultivo, sin embargo, en el sistema adicionado con café como fuente de carbono en la supervivencia y peso no se observaron cambios abruptos ya que bacterias como *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis* lograron un biocontrol efectivo sobre microorganismos patógenos. Así, los cultivos basados en el sistema Biofloc adicionados con fuentes de carbono, como el Café, siguen siendo una alternativa viable para las dificultades como; enfermedades en los organismos de Tilapia, Wu *et al.*, (2012) y Castro-Nieto *et al.*, (2012).

Palabras clave: *Oreochromis niloticus*, Biofloc, Microorganismos, Compuestos Nitrogenados.

Índice

1.-Introducción.....	4
2.-Revisión de la literatura.....	5
3.-Objetivos.....	7
4.-Metodología.....	8
5.-Resultados.....	9
6.-Discusión.....	11
7.-Conclusiones.....	13
8.-Referencias.....	14

1. Introducción

El continuo desarrollo de la acuicultura mundial requiere de nuevas estrategias y alternativas para alcanzar la sustentabilidad. En México esta actividad ha tomado mayor impulso con un crecimiento en los últimos años a una tasa promedio de 3,44 % anual (SAGARPA, 2012).

Uno de los principales problemas a los que se enfrenta la producción acuícola son las enfermedades infecciosas y una forma para enfrentar este problema es el uso de nuevas tecnologías como el Biofloc (BFT), que en un sistema de producción intensivo puede superar las dificultades como; el aumento de la biomasa por volumen de agua y el uso de menos cambios de agua superando paradigmas de sustentabilidad (Avnimelech, 2009).

Por otra parte en los sistemas de producción acuícola una de las problemáticas es la acumulación de los compuestos nitrogenados que ponen en riesgo la producción. Esta problemática se puede resolver mediante la manipulación de las comunidades microbianas (Avnimelech, 2012). Las bacterias y otros microorganismos en los sistemas de cultivo usan carbohidratos (azúcar, almidón y celulosa) como alimento, para la generación de energía y crecimiento, sin embargo, los aportes de restos nitrogenados de los peces (excreción + alimento no consumido), al disolverse desequilibran la relación del nitrógeno con el carbono, para controlar tal desequilibrio la BFT propone agregar algún material rico en carbono soluble, uno o una mezcla de carbohidratos (Samocha *et al.*, 2007). Para lograr el establecimiento de bacterias heterótrofas en los bioflóculos es necesario ajustar la relación carbono/nitrógeno (C: N) en el cuerpo de agua, ya que se requiere cerca de 20 unidades de carbono para asimilar una unidad de nitrógeno, esto se logra adicionando alimento de baja proteína y un carbohidrato, de esta manera las bacterias que crecen comienzan a usar compuestos como carbono orgánico, nitrógeno amoniacal, nitritos, nitratos y fosfatos como fuente de energía, oxidándolos en formas químicas y haciéndolos aprovechables por las algas, hongos, otras bacterias y organismos filtradores (Castro-Nieto, 2012).

Por lo que el objetivo de este estudio es determinar las variaciones de la comunidad microbiana cuando se adiciona una fuente de carbono como los residuos de café al sistema de cultivo y determinar si hay una disminución de los compuestos nitrogenados.

2. Revisión de literatura

Avnimelech (2012), menciona que una de las tecnologías que podría implementarse para mejorar la cría intermedia del camarón PL es el biofloc, que es un conglomerado de microbios, algas, protozoos y otros microorganismos junto con detritus (partículas de organismos muertos) que formaron un ecosistema único en forma de flóculo de partículas en suspensión, característica porosa, muy ligera y tiene un diámetro de 0.1 a varios mm). No solo para mejorar la calidad del agua, el biofloc también proporciona suplementos alimenticios con proteínas altas, ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y altos lípidos para el camarón (McIntosh *et al.*, 2000, Burford *et al.*, 2004a, Burford *et al.*, 2004, Avnimelech 2006, Wasielesky *et al.*, 2006). Además, puede reducir el uso de alimento comercial. Otros autores han considerado biofloc para mejorar el sistema inmune del camarón y reducir la proliferación de bacterias patógenas por la competencia espacial y alimenticia (Crab *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2015).

Maya *et al.*, (2016) realizaron una investigación donde comparo la producción microbiana de una comunidad en dos sistema de cultivo biofloc, donde utilizo melaza y melaza + harina de arroz como fuentes de carbono, obteniendo que con respecto a la abundancia y diversidad bacteriana, se observa en tratamiento de melaza 36 cepas bacterianas, 11 bacterias heterotróficas, seis oportunistas bacterias patógenas y siete probióticos potenciales, mientras que en el tratamiento de melaza + polvo de arroz se identificaron 17 especies, de las cuales nueve son bacterias heterótrofas degradantes, seguidas por seis cepas patógenas y solo dos especies probióticas. Concluyendo así que la tecnología BTF tiene algunas ventajas sobre los sistemas de cultivo convencionales, pues se puede observar una mejor eliminación de compuestos nitrogenados contaminantes, el aumento del crecimiento de bacterias heterótrofas, que junto a las bacterias probióticas, inhiben el desarrollo de bacterias patógenas potenciales en la acuicultura y reconocen el efecto beneficioso de la fuente de carbono externa utilizada para obtener el tipo y cantidad de bacterias que se desarrollan en estos sistemas de producción de cultivos.

Rode (2014), menciona que el componente principal del biofloc son las bacterias heterotróficas. La función del biofloc es reducir el desecho metabólico nitrogenado (amoníaco, nitrito) producido por la alimentación y producción de camarón. El amoníaco consumido por bacterias heterotróficas se convierte en proteína, que luego puede ser

consumida por el camarón y aprovechada para su crecimiento. Las bacterias heterotróficas necesitan carbono para que el amoníaco sea asimilado. Además de la alimentación comercial, se debe agregar una fuente suplementaria de carbono para estimular la producción de bacterias heterótrofas y reducir los desechos nitrogenados.

La microbiota es un componente esencial de las redes tróficas de ambientes de agua dulce, lo que contribuye a la regeneración de nutrientes. En los sistemas de producción acuícola se desarrollan muchos grupos microbianos, al igual que las bacterias y los hongos unicelulares, que pueden actuar de forma positiva en la transformación de la materia orgánica, eliminación de compuestos contaminantes y como fuente de biomasa microbiana disponible para organismos más grandes (Monroy *et al.*, 2015; Scryver *et al.*, 2008).

La alimentación del camarón tiene una proporción de carbono a nitrógeno (C: N) de aproximadamente 7-10: 1. Las bacterias heterotróficas preferirían una relación de aproximadamente 12-15: 1. Se deben agregar azúcares simples o almidones para aumentar la proporción y promover el crecimiento bacteriano. Los aditivos han incluido melaza, azúcar, sacarosa y dextrosa. Algunos productores usan glicerina. Cuanto más simple es el azúcar, más rápida es la respuesta de la bacteria.

De los microorganismos presentes en el Biofloc están los probióticos, los cuales suponen alternativas al uso de antibióticos para lograr la una acuicultura sostenible. Balcázar *et al.* 2006 y Boutin *et al.* 2013, mencionan que las características que deben tener los microorganismos considerados como probióticos son la capacidad de aumentar la asimilación de nutrientes y mejorar la actividad enzimática digestiva, que se refleja en el aumento de la supervivencia, talla y peso de los organismos cultivados. Los probióticos actúan en varios modos de acción, que pueden proporcionar protección contra patógenos y prevenir enfermedades como; control biológico que evita la detección de quórum y la transferencia de genes de resistencia, e interactúan con el fitoplancton, aumentan el rendimiento de especies cultivadas (con enzimas digestivas y nutrientes) y mejoraran la calidad del agua y del suelo (Balcazar *et al.*, 2006).

Por su parte, Wu *et al.*, (2012) mencionan que uno de los beneficios en el uso del bifloc es la capacidad de exclusión competitiva que tienen ciertas poblaciones bacterianas sobre bacterias patógenas.

Cuadro (2007), menciona que está demostrado que los probióticos mejoran la calidad de suelo y agua creando un entorno más favorable para la salud de peces y camarones, degradando y eliminándola materia orgánica residual de proteínas, carbohidratos, lípidos, disminuyendo y estabilizando amonios, fosfatos, sulfuros, fitoplancton, ayudando a incrementar el oxígeno disuelto. Aplicados directamente al alimento balanceado mejoran la microflora gastrointestinal, reducen trastornos digestivos, inhiben el crecimiento de patógenos, mejoran la digestión y el índice de conversión alimenticia (FCA). Teniendo como resultado final mejores cosechas y efluentes más limpios.

Krummenaeue *et al.* (2014), evaluaron el efecto de probióticos comerciales aplicados en un sistema Biofloc en un cultivo de *Litopenaeus vannamei* infectados con *Vibrio parahaemolyticus*. Como resultado se obtuvo el control de la vibriosis, aunque en cuanto al crecimiento no se observó diferencias significativas, la sobrevivencia si mostró mayor incremento con probióticos con un 83% en comparación con el control que obtuvo un 52%.

El género *Bacillus* ha sido ampliamente utilizado como probiótico porque se encuentran naturalmente en el medio ambiente y tiene varios mecanismos para competir contra patógenos (principalmente *Vibrio* spp.); también aumenta el rendimiento animal, mejora la calidad del agua y puede tolerar cambios en el pH, la temperatura y la salinidad (Ochoa-Solano y Olmos-Soto, 2006; Decamp *et al.*, 2008).

Monroy *et al.*, (2013), estimaron la abundancia de microorganismos asociados a un sistema biofloc, donde encontraron que a partir de la tercera semana de experimentación hubo presencia de bacterias como *Aeromonas* y *Vibrio* que a partir de la séptima semana ya no fueron detectadas. De igual manera encontraron la presencia de bacterias degradadoras en la cuarta semana como, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, a la levadura *Rhodotorula sp* y *Bacillus spp* que tiene propiedades probióticas.

3. Objetivos

3.1 General

- Determinar la relación entre los compuestos nitrogenados y las comunidades microbianas presentes en un sistema de cultivo Biofloc y su efecto en el crecimiento de *Oreochromis niloticus*.

3. 2 Específicos

- Determinar la diversidad y abundancia microbiana dentro del sistema Biofloc.
- Evaluar el crecimiento y sobrevivencia de *Oreochromis niloticus* en sistema Biofloc.
- Medir los compuestos nitrogenados en el sistema Biofloc.

4. Metodología

4.1 Obtención de los peces

Se obtuvieron 60 tilapias juveniles de un centro productor de tilapia de la Ciudad de México y se dividieron en 2 grupos; el grupo control y el grupo adicionado con Café. Los peces se midieron y pesaron para obtener la biomasa inicial y con ello se calculará la cantidad diaria de alimento requerido considerando el 10% de su peso (alimento comercial para tilapia, Pedregal® (Con un 45% de proteína y un tamaño de 0,6-0,8 mm (migaja 1)).

Para promover la formación de flóculos ricos en microorganismos se calculó la dosis diaria de Café como fuente de Carbono (C) para alcanzar una relación Carbono: Nitrógeno (C:N) 15:1, utilizando la fórmula de cálculos de exigencia recomendada por (Avnimelech, 2006).

4.2 Identificación de bacterias probióticas

Para realizar el conteo y caracterización de las comunidades bacterianas se utilizó el método propuesto por APHA (1992). A partir de la formación de los pequeños flóculos en el sistema, cada dos semanas se tomaron muestras de las que se sembró 0,1 mL en placas de agar Man-Rogosa Sharpe (MRS), Infusión Cerebro-Corazón (BHI) y Tiosulfato-Citrato-Sales Biliares (TCBS) por triplicado. Las placas se incubaron a 27°C durante 24 h. Transcurrido este periodo, se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias/mL⁻¹ (UFC/mL⁻¹) y se caracterizó la morfología colonial; posteriormente a través de resiembras sucesivas las cepas fueron purificadas.

La tinción de Gram se utilizó para observar la morfología celular usando un microscopio óptico (ZSX50 Olympus®). Este procedimiento se llevó a cabo durante 14 semanas.

Se confirma la identificación de las cepas con el sistema API20E, API20NE, APICHL, API CHL 50 y el Programa Apiweb™ Biomerieux.

4.3 Nitrógeno, supervivencia y peso de los peces

Cada quince días, a lo largo de la experimentación, se tomaron muestras de agua de los tratamientos para medir los compuestos nitrogenados mediante el uso del Fotómetro para acuicultura HANNA 83203 y se tomó el peso en gramos de los peces con una balanza digital de la marca Ohaius. La supervivencia se estimó por conteo por cilindro.

5. Resultados

En la figura 1 se muestra que en el sistema adicionado con café se obtuvo un valor promedio de supervivencia del 80% en la sexta y última muestra; por otra parte, para el grupo control se observa una pérdida en el quinto conteo, en promedio, solo alrededor del 20% de los peces sobrevivió.

En el peso se observó el mismo comportamiento, en la quinta y sexta quincena de muestreo el peso del grupo control disminuyó significativamente con solo 0.5 g.

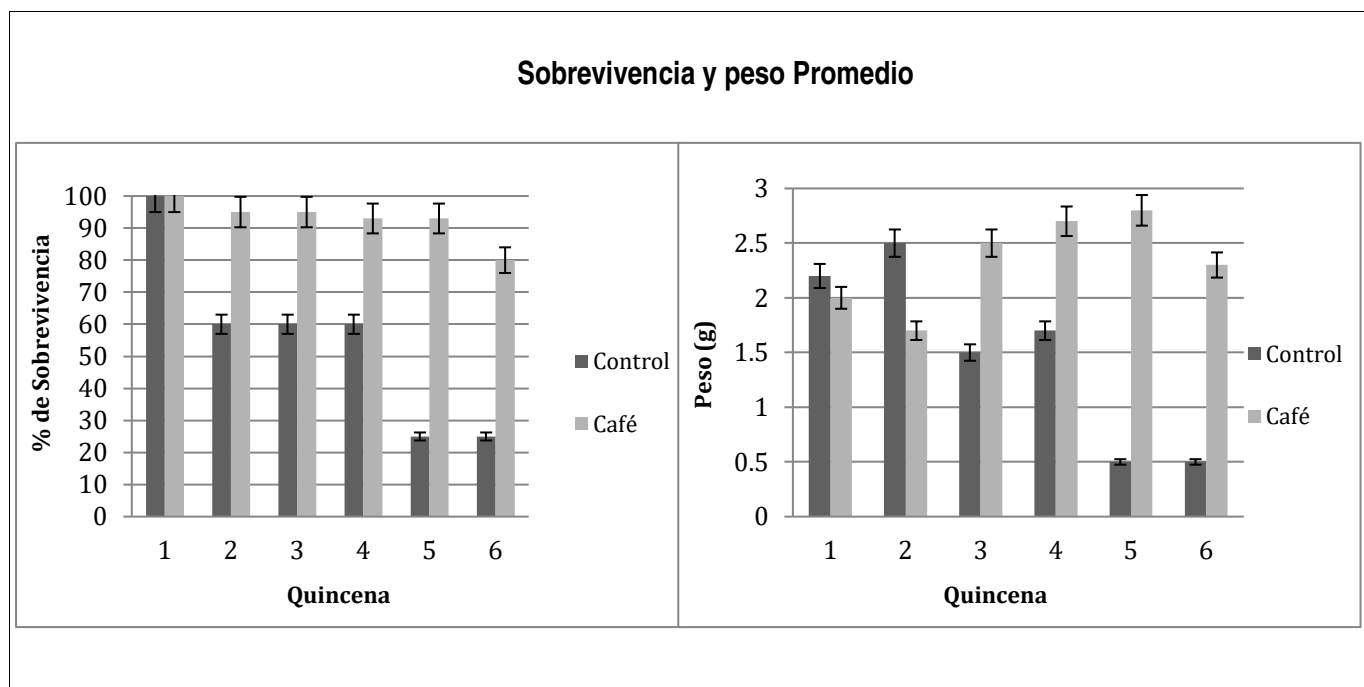


Figura 1. Comparación en supervivencia y peso de los peces control y café. 1 pez= 3.33% de la población de cada grupo.

En la figura 2 se muestra la abundancia de las bacterias que se identificaron en el agua de los grupos Control y Café obtenidos durante las 6 quincenas del muestreo. Se observa que entre las especies bacterianas más abundantes para el grupo Control se

encuentra *Bacillus cereus* y *Enterobacter cloacae* con más de 300 UFC/mL⁻¹ (Unidades Formadoras de Colonias por mililitro), mientras que en el sistema Biofloc adicionado con Café las comunidades microbianas con mayor abundancia fueron *Bacillus cereus*, *Serratia liquefaciens* y *Enterobacter cloacae*, todas con más de 300 UFC/mL⁻¹.

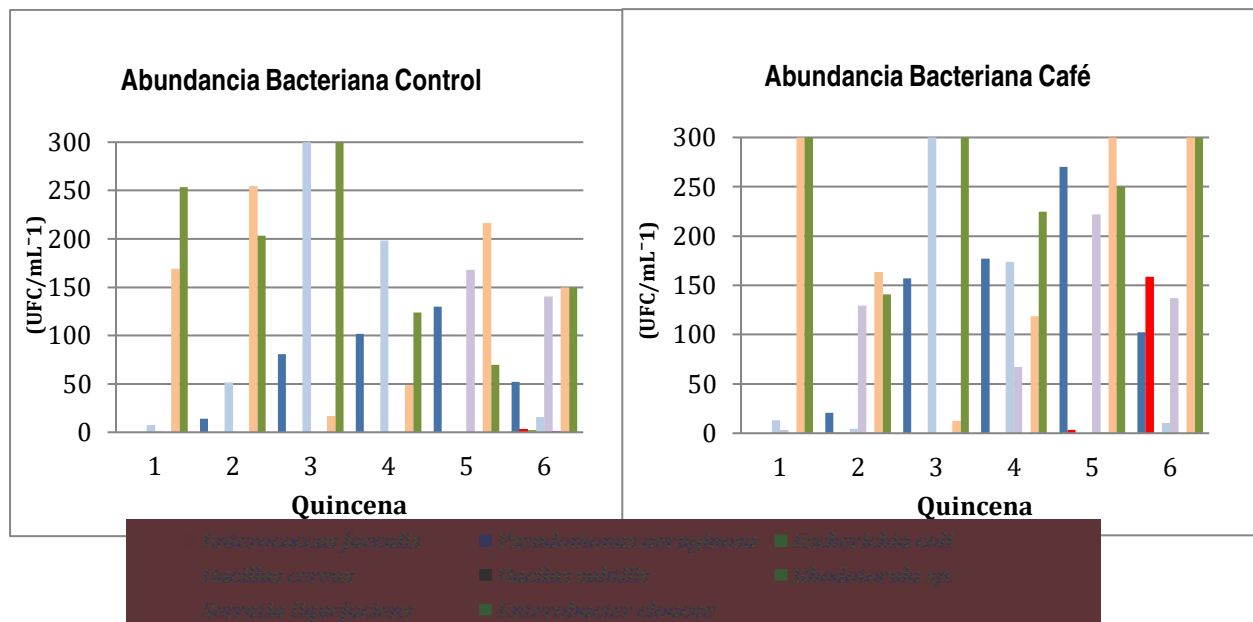


Figura 2. Abundancia total de Bacterias identificadas cada 15 días en el grupo control/café.

La figura 3 corresponden a los compuestos nitrogenados, mostrando una concentración elevada de Nitritos en las primeras 3 quincenas para ambos grupos, iniciando con 25 mg/l (Control/ Café) y viendo una disminución amplia en la cuarto y quinto muestreo, de 2.5 y 11.3 mg/l respectivamente. En los Nitritos se obtuvieron valores de entre 4.5 y 0.06± mg/l, terminando con 0.3 mg/l en Control y 2.7mg/l para Café. La primera quincena se obtuvo una concentración de 5 mg/l para control y 2.8 para Café en Amonio y fue disminuyendo hasta 0.4 y 0.1 mg/l.

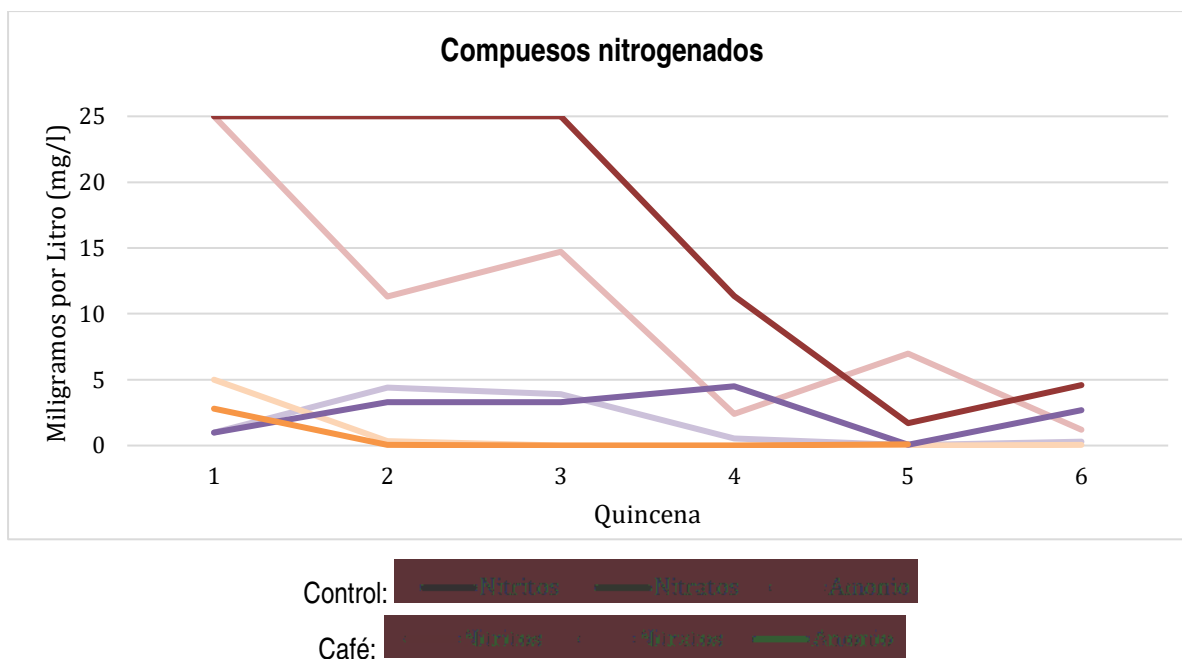


Figura 3. Nitritos, Nitratos y Amonio de los grupos Control/Café tomados quincenalmente.

6. Discusión

Los resultados del estudio indicaron variaciones en la comunidad de bacterias encontradas en el sistema Biofloc, principalmente en la abundancia de estos microorganismos. Los grupos bacterianos que dominaron en el sistema desde la primera quincena de muestreo fueron *Serratia liquefaciens* y *Enterobacter cloacae*, para ambos grupos, que según Monroy *et al.*, (2013) y Austin *et al.*, (1995) son microorganismos patógenos que producen enfermedades en los organismos cultivados, como las tilapias, causando pérdida de masa en el sistema, sin embargo en el grupo con tratamiento con Café como fuente de carbono se observa que a pesar de tener estas bacterias no se registró una pérdida significativa de organismos ya que más del 85% de peces sobrevivió, en cambio en el grupo Control la disminución fue de más del 75% de organismos. Así mismo, Cienfuegos *et al.*, (2017), mencionan que en los sistemas Biofloc se ha documentado la presencia de bacterias probióticas, que se desarrollan *in situ* de manera natural debido a la liberación de heces de los peces al agua, donde hay bacterias que son parte de la microbiota intestinal y al entrar en contacto con el agua rica en carbohidratos debido a la adición de una fuente externa de carbono, proliferan significativamente sin la adición de un probiótico desde una fuente externa, lo que explica la presencia de la bacteria *Bacillus* sp. en el grupo control donde no hubo adición de tratamiento alguno.

Por otra parte, se coincide con Monroy *et al.*, (2013), cuando menciona que el incremento de microorganismos heterótrofos como *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas mendocina*, *Bacillus* sp. *Micrococcus* sp, impiden la proliferación de los géneros *Aeromonas* y *Vibrio*, pues en esta investigación se registró una baja presencia de microorganismos como *E. coli* y *Pseudomona aeruginosa* a lo largo del experimento mientras que los géneros de *Bacillus* se encontraron con mayor frecuencia y con una mayor abundancia para el grupo adicionado con café.

La sobrevivencia del grupo Café puede deberse a la presencia de bacterias del género como *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis* ya que se han caracterizado como bacterias probióticas en los sistemas de producción acuícola. Según Maya *et al.* (2016); Monroy *et al.* (2013) y Ziaei-Nejad *et al.* (2006), mencionan, que dichas bacterias son microorganismos heterótrofos capaces de degradar materia orgánica los cuales tienen propiedades probióticas ya que secretan sustancias como exoenzimas y polímeros que evitan la proliferación de bacterias patógenas, además son bacterias encargadas de la transformación del nitrógeno en el ambiente acuático, coincidiendo con los resultados del estudio, ya que *Bacillus* se vio presente en la cuarta y quinta quincena de muestreo en donde al aumentar su abundancia los compuestos nitrogenados bajaron sus concentraciones notablemente y la sobrevivencia y peso no se vieron afectados al contrario del grupo Control. Por otra parte, la adición de una fuente de Carbono también contribuye a la sobrevivencia como mencionan Avnimelech, (2012) y Samocha *et al.*, (2007) quienes mencionan que la fuente de C utilizada en un sistema BFT influye directamente sobre el contenido nutricional del flóculo, la promoción del crecimiento y los porcentajes de supervivencia.

El Nitrógeno puede estar presente en ambientes acuáticos como: nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), amonio ionizado (NH_4^+), amonio no ionizado (NH_3), óxido ni-troso (N_2O), óxido nítrico (NO), nitrógeno molecular (N_2), nitrógeno orgánico disuelto (péptidos, purinas, aminas, aminoácidos), de estas formas los que constituyen la fuente principal de Nitrógeno son los nitritos, nitratos y el amonio (Callazos y Arias, 2015). El NO_2 y NH_3 en concentraciones altas, suelen ser tóxicos para los peces, así removerlos o transformarlos es esencial cuando se pretende aumentar la biomasa y disminuir las pérdidas en el sistema acuático. Con la adición de una fuente de carbono se aceleran los ciclos en la red trófica de las bacterias, principalmente las heterótrofas, y mejora la

asimilación del N, Avnimelech, (2009). En esta investigación los niveles de Nitrógeno fueron casi iguales en ambos tratamientos a lo largo de la experimentación, sin embargo, la supervivencia y por ende el aumento de masa en el sistema Café fue mayor, esto se asocia a que en el grupo Café la cantidad de bacterias heterótrofas fue superior que en el grupo Control.

De igual manera, la presencia de *Rhodococcus* sp. en el grupo adicionado con Café mejoró la calidad del agua ya que se redujeron las tasas de nitrógeno amoniacal debido a su capacidad para transformar compuestos nitrogenados, esta capacidad ha sido mencionada por Chen *et al.*, (2012), que demostró en experimentos su capacidad de nitrificación heterotrófica y desnitrificación aeróbica, obteniendo mejores tasas de reducción de amonio con *Rhodococcus* sp. que con la aplicación de otras especies bacterianas con funciones similares (*Bacillus* sp., *Pseudomonas alcaligenes*).

Es por ello que Wu *et al.*, (2012) y Castro-Nieto *et al.*, (2012) señalan que uno de los beneficios del biofloc es la capacidad de exclusión competitiva que tienen ciertas poblaciones bacterianas sobre bacterias potencialmente patógenas. Ferreira *et al.*, (2015), asegura que el sistema Biofloc por si solo proporciona protección y resistencia a los organismos, sin embargo al adicionarle una fuente de carbono, como los residuos de Café, aceleran la sucesión de bacteriana en el sistema y aportan una mayor protección a el cultivo de Tilapia, Maya *et al.*, (2016), Cuadro *et al.*, (2007).

7. Conclusion

El uso y cultivo de los biofloc microbianos a partir de una alta relación de C:N en el agua, es un sistema alternativo super-intensivo de producción, que reduce los niveles de nitrógeno en el ambiente acuático y mejora la calidad del agua; lo que en conjunto mantienen porcentajes elevados en la supervivencia y el peso.

Al proporcionar bacterias prebióticas como los del genero *Bacillus*, muestra la sustentabilidad del sistema en relación con un sistema de producción tradicional e incrementa la producción, reduciendo los costos de alimentación y mejorando la calidad del producto.

8. Referencias

1. Avnimelech, Y. (2006). Biofilters: the need for a new comprehensive approach. *Aquaculture Engineering*. Vol. 34, pp. 172-178.
2. Avnimelech, Y. (2009). Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture*. pp. 140-147.
3. Avnimelech, Y. (2012). *Biofloc technology -a practical guide book*, The World Aquaculture Society, Baton Rouge. pp. 272.
4. Balcázar, J.L., De Blas, I., Ruiz, Z.I., Cunningham, D., Vendrell, D., Múzquiz, J.L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.* pp. 173-186.
5. Boutin, S., Audet, C., Derome, N. (2013). Probiotic treatment by indigenous bacteria decreases mortality without disturbing the natural microbiota of *Salvelinus Fontinalis*. *Can. J. Microbil.* Vol. 59, pp. 1-9.
6. Burford, M.A., Sellars, M.J., Arnold, S.J., Keys, S.J., Crocos, P.J., Preston, N.P. (2004). Contribution of the natural biota associated with substrates to the nutritional requirements of the post-larval shrimp, *Penaeus esculentus* (Haswell) in high density rearing systems. *Aquaculture Research*. Vol. 35, pp. 508– 515.
7. Burford, M.A., Thompson, P.J., McIntosh, R.P., Bauman, R.H., Pearson D.C. (2004). The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity zero-exchange system. *Aquaculture*. Vol. 232, pp. 525–537.
8. Castro, NLM., Castro, B.T., De Lara, A.R., Castro, M.J., Castro, M.G. (2012). Sistemas Biofloc: un avance tecnológico en acuicultura. *Revista Digital del Departamento El Hombre y su Ambiente*. Vol.1 (1), pp. 1-6.
9. Chen, P.J.L., Li, Q.X., Wang, Y., Li, S., Ren, T., Wang, L. (2012). Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by bacterium *Rhodococcus* sp. *Bioresource Technology*. pp. 266–270.
10. Cienfuegos, M.K., Monroy, D.M.C., Hamdan, P.A., Castro, M.J., Becerril, C.D. (2017). Probiotics used in Biofloc system for fish and crustacean culture: A review. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. Vol. 5, pp. 103-110.
11. Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W. (2007). Nitrogen removal in aquaculture towards sustainable production. *Aquaculture*. Vol. 270 (1-4), pp. 1–14.

12. Cuadro, AW. (2017). The use of probiotics in aquaculture. Methodology application practical and simple. Disponible en: <http://revistas.udenar.edu.co/index.php/reipa/article/viewFile/1487/1826>.
13. Collazos, LF. y Arias, JA. (2015). Fundamentos de la tecnología biofloc (BFT). Instituto de Acuicultura de los Llanos, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia. Una alternativa para la piscicultura en Colombia. Vol. 19, pp 77-89.
14. Decamp, O. (2008). Probiotics for shrimps larviculture: review of field data from Asia and Latin America . *Acuacult.* Vol. 39, pp. 334-338.
15. De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., Verstraete, W. (2008). The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture.* Vol. 277, pp. 125-137.
16. Ferreira, GS, Bolívar, NC., Pereira, SA., Guertler, C., Vieira, FN., Mouriño, JLP., Seiffert, WQ. (2015). Microbial Biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture.* Vol. 448, pp. 273–279.
17. Kersters, K., De Vos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P., Stackebrandt, E. (2016). Introducción a las Proteobacterias. Los procariotas. En: *Proteobacterias: subclases alfa y beta.* Vol. 5, pp. 3–37.
18. Kirchman, DL. (2002). La ecología de Cytophaga – Flavobacteria en ambientes acuáticos. *FEMS Microbiol Ecol.* Vol. 39 (2), pp. 91–100.
19. Krummenauer, D., Samocha, T., Poersch, L., Lara, G., Wasielesky, W. (2014). The reuse of water on the culture of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in BFT system. *Journal of the World Aquaculture Society.* Vol. 45 (1), pp. 3-14.
20. Maya, GS., Monroy, DMC., Handam, PA., Castro, MJ., Rodríguez, MGA. (2016). Effect of two carbon sources in microbial abundance in a Biofloc culture system with *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies,* Vol. 4 (3), pp. 421-427.
21. McIntosh, D., Samocha, TM., Jones, ER., Lawrence, AL., Mckee, DA., Horowitz, S., Horowitz, A. (2000). The effect of a commercial bacterial supplement on the high density culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. *Aquacultural Engineering.* Vol. 21, pp. 215–227.
22. Monroy, DMC., Rodríguez, MGA., Castro, MJ., Castro, MG., Becerril, CD. (2015). Importance and function of microbial communities in aquaculture systems with no water exchange. *Scientific Journal of Animal Science.* Vol. 4 (9), pp. 103-110.

23. Monroy, DMC., Lara, AR., Castro, MJ., Castro, MG., Coelho, EMG. (2013). Composición y abundancia de comunidades microbianas asociadas al Biofloc en un cultivo de tilapia. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. Vol. 48 (3), pp. 511-520.
24. Ochoa, SJL., Olmos, SJ. (2006). The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiol.* Vol. 23, pp 519-525.
25. Rode, R. (2014). Purdue University, Aquaculture Research Lab Manager, Department of Forestry and Natural Resources, Purdue University.
26. SAGARPA 6° Informe de Labores (2012). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Disponible en: http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/Informe/documentos/sexta/6_informe_SAGARPA.pdf
27. Samocha, TM., Patnaik, S., Speed, M., Ali, AM., Burger, JM., Almeida, RV., Ayub, Z., Harisanto, M., Horowitz, A., Brock, D.L. (2007). Use of molasses as carbón source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult Eng.* Vol. 36, pp.184-191.
28. Wasielesky, W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, CL. (2006). Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. Vol. 258, pp. 396–403.
29. Wu, LC., Peng, Y., Peng, L., Li, S., Wang, Y Ma. (2012). Effect of wastewater COD/N ratio on aerobic nitrifying sludge granulation and microbial population shift. *Journal Environment Science*. Vol. 24 (2), pp. 234-241.

