



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Efecto del probiótico *Lactococcus lactis* sobre la composición microbiana, en agua e intestino del langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) con biofloc

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA

M. en C. Kathia Cienfuegos Martínez

COMITÉ TUTORIAL

Dra. María del Carmen Monroy Dosta (Codirector)

Dra. Aida Hamdan Partida (Codirector)

Dr. Martha Patricia Hernández Vergara (Asesor)

Ciudad de México, noviembre 2022.

El presente estudio se realizó en los Laboratorios de “Análisis Químico de alimento Vivo” del Departamento del Hombre y su Ambiente y “Microbiología y Biología Molecular” del Departamento de Atención a la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Monroy Dosta y la Dra. Aida Hamdan Partida, respectivamente.

El asesoramiento del presente trabajo estuvo a cargo de la Dra. Martha Patricia Hernández Vergara.

El autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro 763372, que comprendió del periodo de 01/09/2018 al 31/08/2022. El Doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Sistema Nacional de Posgrados del CONACyT, con número de referencia 001480.

El jurado designado por La Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis que presentó:

M. en C. Kathia Cienfuegos Martínez

14 de noviembre de 2022

JURADO:

Dr. Carlos Iván Pérez Rostro (Presidente)

Dra. Martha Patricia Hernández Vergara (Secretaria)

Dr. Luis Daniel Espinosa Chaurand (Revisor)

Dra. Elena Aréchaga Ocampo (Revisora)

Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez (Vocal)

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Carmen Monroy Dosta**, Codirectora de Tesis, por ser parte fundamental en mi formación profesional, por compartirme sus conocimientos, apoyo incondicional y su entera confianza para la realización de esta tesis, pero principalmente por brindarme su amistad sincera y dejarme conocer al hermoso ser humano que es.

A la **Dra. Aida Hamdan Partida**, Codirectora de Tesis, por su tiempo dedicado a la revisión del manuscrito, su disposición y apoyo constante. Por confiar en mí y además de brindarme su amistad.

A la **Dra. Patricia Hernández Vergara**, Asesora de tesis, por ser tan comprometida en sus revisiones, por aportar y compartirme su conocimiento, gracias por el seguimiento brindado y concederme parte de su valioso tiempo.

A mis **papás Mary y Luis**, porque desde que era niña me han motivado a superarme académicamente, siempre he contado con su apoyo incondicional y su amor infinito.

A mi esposo **Alberto Spindola**, que me alienta a seguir día a día, me transmite su vital energía y hace que no me rinda. Por su comprensión en momentos de exceso de actividades y por demostrarme su amor día a día.

A mis hermanas **Moni y Jessi**, por inspirarme, brindarme su confianza y amor. Además de darme a los mejores sobrinos del mundo, **Regis, Mat, Sofi y Amy** que amo y me aman con todo el corazón.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Declaración de originalidad

La que suscribe M. en C. Kathia Cienfuegos Martínez, alumna del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana y autora de la tesis o titulada: “Efecto del probiótico *Lactococcus lactis* sobre la composición microbiana, en agua e intestino del langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) con biofloc”,

Declaro que:

1. La tesis que presento ante el Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, para lo obtención del grado de Doctora es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y/o fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México a 14 de noviembre del 2022.

Atentamente

M. en C. Kathia Cienfuegos Martínez



DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

UNIDAD CUAJIMALPA
Av. Vasco de Quiroga 4871
Col. Santa Fe,
Cuajimalpa de Morelos
C.P. 05300, Cd. México

55 5814 6500 ext. 6534

doctoradocbs@correo.uam.mx

UNIDAD IZTAPALAPA
Av. Ferrocarril San Rafael
Atlixco 186, Col. Leyes de
Reforma 1a Sección, Iztapalapa
C.P. 09310, Cd. México

55 5804 4600 ext. 3461

UNIDAD LERMA
Av. De las Garzas 10
Col. El Panteón,
Lerma de Villada
C.P. 52005, Edo. de México

72 8282 7002 ext. 2002

<http://posgradocbs.uam.mx>

UNIDAD XOCHIMILCO
Calz. del Hueso 1100,
Col. Villa Quietud,
Coyoacán
C.P. 04960, Cd. México

55 5483 7000 ext. 7504



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Carta de Cesión de Derechos

En la Ciudad de México, el día 14 de noviembre del año 2022, quien suscribe M. en C. Kathia Cienfuegos Martínez, alumna del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, manifiesta que es autora intelectual de la tesis titulada “Efecto del probiótico *Lactococcus lactis* sobre la composición microbiana, en agua e intestino del langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) con biofloc”, bajo la dirección del Comité Tutoral conformado por la Dra. María del Carmen Monroy Dosta, la Dra. Aida Hamdan Partida y de la Dra. Martha Patricia Hernández Vergara, cede los derechos del trabajo de tesis a la Universidad Autónoma Metropolitana para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin permiso expreso de la autora o del Comité Tutoral del trabajo. Con el fin de solicitar autorización, los usuarios podrán escribir al correo electrónico kathiacienfuegos@gmail.com; si el permiso es otorgado, el usuario deberá dar el seguimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Kathia Cienfuegos Martínez

2183804893



DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

UNIDAD CUAJIMALPA
Av. Vasco de Quiroga 4871
Col. Santa Fe,
Cuajimalpa de Morelos
C.P. 05300, Cd. México

UNIDAD IZTAPALAPA
Av. Ferrocarril San Rafael
Atlixco 186, Col. Leyes de
Reforma 1a Sección, Iztapalapa
C.P. 09310, Cd. México

UNIDAD LERMA
Av. De las Garzas 10
Col. El Panteón,
Lerma de Villada
C.P. 52005, Edo. de México

UNIDAD XOCHIMILCO
Calz. del Hueso 1100,
Col. Villa Quietud,
Coyoacán
C.P. 04960, Cd. México

55 5814 6500 ext. 6534

doctoradocbs@correo.uam.mx

55 5804 4600 ext. 3461

72 8282 7002 ext. 2002

<http://posgradocbs.uam.mx>

55 5483 7000 ext. 7504

Índice

AGRADECIMIENTOS	2
ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN	9
ABSTRACT.....	10
Capítulo I. INTRODUCCIÓN	11
Capítulo II. MARCO TEÓRICO	12
<u>II.2 Generalidades de la especie <i>Macrobrachium</i></u>	<u>13</u>
II.3 Clasificación taxonómica	13
II.4 Distribución.....	13
II.5 Estructuras externas de los langostinos.....	14
II.6 Estructura interna de los langostinos	15
II.7 Ciclo de vida	16
II.8 Alimentación del langostino	17
II.10 Requerimientos ambientales	19
II.10.1 Temperatura	19
II.10.2 Oxígeno Disuelto	20
II.10.3 pH	20
II.11 Densidad de cultivo	20
II.12 Problemáticas en el cultivo del langostino.....	21
II.12.1 Uso excesivo de recursos para la producción acuícola.....	21
II.12.2 Efluentes contaminantes derivados de la producción.....	21
II.12.3 Enfermedades	22
II.12.4 Dietas y nutrición.....	22
II.13 Probióticos.....	23
II.13.1 Mecanismos de acción	23
<u>II.13.2 Beneficios generales de los probióticos en animales acuáticos</u>	<u>24</u>
II.13.4 Uso de probióticos en el crecimiento de peces y crustáceos	26
II.13.5 Impacto de los probióticos en la calidad del agua	29
II.13.6 Probióticos en el control de patógenos.....	30
II.13.7 Uso de probióticos en la respuesta inmune	31

II.13.8 Concentración y dosis de probiótico	32
II.13.9 Normatividad en el uso de probióticos	35
II.14 Sistema biofloc	36
II.14.3.1 Impacto del biofloc en la calidad del agua.....	40
II.14.3.2 Crecimiento de peces y crustáceos con sistema biofloc	42
II.14.3.3 Reducción del alimento.....	43
II.14.3.4 Control de microorganismos patógenos con el uso del biofloc.....	44
II.14.4 Uso de sistema biofloc con la adición de probióticos.....	45
II.14.5 Perspectivas en el sistema biofloc	46
II.14.6 Normatividad del uso del sistema biofloc	46
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	47
HIPÓTESIS.....	47
OBJETIVO GENERAL.....	47
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
Capítulo III. MATERIALES Y MÉTODOS	48
III.1 Obtención de los langostinos para el estudio.....	48
III.2 Diseño de las unidades experimentales.....	49
III.3 Diseño experimental	49
III.4 Cepa probiótica y bioencapsulado.....	50
III.5 Preparación de los sistemas de cultivo con biofloc y mantenimiento.....	51
III.6 Biometrías y ajuste de la ración alimenticia.....	52
III.7 Parámetros de calidad del agua y sólidos sedimentables	53
III.8 Análisis estadístico	54
III.9 Extracción de ADN de la comunidad bacteriana en biofloc.....	54
III.9.1 Extracción del ADN del agua	54
III.9.2 Extracción del ADN del intestino de los langostinos	55
III.10 Secuenciación masiva por Illumina	56
III.11 Análisis Bioinformático	56
Capítulo IV. RESULTADOS.....	57
IV.1 Supervivencia y crecimiento del langostino (<i>M. rosenbergii</i>) durante el estudio.....	57
IV.2 Calidad del agua.....	57
IV.3 Análisis metagenómico	59

IV.3.1 Unidades Taxonómicas Operacionales	59
IV.3.2 Índices de diversidad	60
IV.3.3 Comunidad microbiana	60
Capítulo V. DISCUSIÓN	67
V.1 Supervivencia y crecimiento	67
V.2 Parámetros de calidad del agua	70
V.3 Comunidades microbianas	72
Capítulo VI. CONCLUSIONES	77
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	79
ANEXOS	100

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
PL	Postlarva
BFT	Biofloc
PROB	Probiótico
BFTPROB	Biofloc con probiótico
NOM	Norma Oficial Mexicana
IND	Individuos
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosomal
OTU	Unidad Taxonómica Operativa
TCE	Tasa de Crecimiento Específica
ICA	Índice de conversión alimenticia
TAN	Nitrógeno Amoniacal Total
STAMP	Structural Time Series Analyser Modeller and Predictor

RESUMEN

En esta investigación se evaluó el efecto del probiótico *Lactococcus lactis* en la composición de la comunidad bacteriana, su riqueza y diversidad en el agua e intestino de postlarvas (PL's) de *Macrobrachium rosenbergii* cultivado en biofloc, así como su crecimiento y supervivencia. Las postlarvas tuvieron un peso promedio inicial de 0.1 ± 0 g y longitud de 1.4 ± 0 cm cultivado en biofloc, así como la supervivencia y el crecimiento de langostinos. Se utilizó un diseño experimental aleatorizado con los siguientes tratamientos: BFT: biofloc; BFTPROB: biofloc + probiótico; PROB: probiótico y CONT: control; todo por triplicado con 60 PL's/tratamiento. Los días uno (fase inicial), 64 (fase intermedia) y 127 (fase final) se determinó el peso y la longitud de los langostinos. En la fase final se extrajeron 15 intestinos de los langostinos y tres muestras de agua por tratamiento para obtener el ADN bacteriano, y realizar la secuenciación masiva del gen 16S ARNr de las muestras. En el análisis metagenómico en la fase final se identificaron 16 clases bacterianas en muestras intestinales y de agua. Los resultados indican que la incorporación de *L. lactis* no ocasionó cambios significativos ($p > 0.05$) en la comunidad microbiana del intestino de los langostinos ni en el agua de cultivo. El peso final de los langostinos en los grupos PROB y BFTPROB (6.3 ± 1.6 g, 6.8 ± 1.3 g respectivamente) fue significativamente superior al de los langostinos de los otros tratamientos. La supervivencia en los langostinos cultivados en BFT y BFTPROB fue del 100%, mientras que en el grupo CONT fue de 80 ± 1.5 %. Esto se atribuye a la comunidad microbiana que se estableció en el agua e intestino de los langostinos en cultivo con biofloc, y que sirvió como alimento con un alto aporte nutricional (proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales), además de considerar la presencia de bacterias con potencial probiótico en los flóculos, las cuales colonizaron el tracto intestinal, y mejorar la asimilación de nutrientes y posiblemente excluyeron microorganismos patógenos del intestino. Como conclusión las Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria, Flavobacteria y Clostridia fueron las clases con la mayor abundancia relativa. Además, el probiótico *L. lactis* no se observó dentro de los más abundantes, probablemente porque fue desplazado por la microbiota dominante del biofloc por lo que es importante considerar la dosis y el tiempo de administración además de que el probiótico sea aislado de la misma especie. Sin embargo, se considera que su presencia contribuyó a la supervivencia y crecimiento de los langostinos de los tratamientos BFT, BFTPROB y PROB.

PALABRAS CLAVE: langostinos, bacterias, flóculos, secuenciación masiva.

ABSTRACT

In this research, the effect of the probiotic *Lactococcus lactis* on the composition of the bacterial community, its richness and diversity in the water and intestine of postlarvae (PL's) of *Macrobrachium rosenbergii* cultured in biofloc, as well as their growth and survival, were evaluated. Postlarvae had an initial average weight of 0.1 ± 0 g and a length of 1.4 ± 0 cm cultured in biofloc, as well as survival and growth of shrimp. A randomized experimental design was acquired with the following treatments: BFT: biofloc; BFTPROB: biofloc + probiotic; PROB: probiotic and CONT: control; all in triplicate with 60 PL's/treatment. On days one (initial phase), 64 (intermediate phase) and 127 (final phase) the weight and length of the prawns are limited. In the final phase, 15 shrimp intestines and three water samples per treatment were extracted to obtain bacterial DNA, and massive sequencing of the 16S rRNA gene of the samples was performed. In the metagenomic analysis in the final phase, 16 bacterial classes were identified in intestinal and water samples. The results indicate that the incorporation of *L. lactis* did not cause significant changes ($p > 0.05$) in the microbial community of the shrimp intestine or in the culture water. The final weight of the shrimp in the PROB and BFTPROB groups (6.3 ± 1.6 g, 6.8 ± 1.3 g, respectively) was significantly higher than that of the shrimp in the other treatments. Survival in shrimp cultured in BFT and BFTPROB was 100%, while in the CONT group it was $80 \pm 1.5\%$. This is attributed to the microbial community that establishes itself in the water and intestine of prawns cultured with biofloc, and which depends as a food with a high nutritional value (proteins, carbohydrates, vitamins, and minerals), in addition to considering the presence of bacteria with probiotic potential in the flocs, which colonized the intestinal tract, and improved the assimilation of nutrients and possibly excluded pathogenic microorganisms from the intestine. In conclusion, the Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria, Flavobacteria and Clostridia were the classes with the highest relative abundance. In addition, the probiotic *L. lactis* is not among the most abundant, probably because it was displaced by the dominant biofloc microbiota, so it is important to consider the dose and administration time. However, it is considered that their presence contributed to the survival and growth of the prawns from the BFT, BFTPROB and PROB treatments.

KEYWORDS: freshwater prawns, bacterial, flocs, massive sequencing.

Capítulo I. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos tienen un rol importante en el agua donde se desarrollan de forma natural desempeñando funciones relevantes en la degradación de materia orgánica, los ciclos de nutrientes, la productividad, entre otras (Cruz-Leyva *et al.*, 2015). Además, pueden ser agregados en los sistemas de cultivo acuícola con el propósito de mejorar la calidad del agua, el control de enfermedades, la nutrición de los animales cultivados y reducir el impacto ambiental de los efluentes acuícolas (De Schryver *et al.*, 2008). Lo anterior es muy importante en búsqueda de métodos de producción acuícola más sustentables, que permitan reducir el uso de recursos como agua, suelo y limiten el uso de antibióticos y quimioterapéuticos en acuicultura.

En este sentido, una de las tecnologías más utilizadas en acuicultura para la manipulación de la microbiota es la aplicación de probióticos (Pandiyan *et al.*, 2013), que ha demostrado beneficios para la salud y la calidad del agua de las especies acuáticas cultivadas a través de diferentes mecanismos de acción como: la estimulación de la respuesta inmune, la secreción de sustancias que inhibe la proliferación de microorganismos patógenos, además de la producción de enzimas que inducen la absorción de nutrientes, lo que conlleva a mejorar el crecimiento de peces y crustáceos (Pérez-Chabela *et al.*, 2020).

Al añadir probióticos se presentan una serie de beneficios para el hospedero por la modificación de la microbiota intestinal que está relacionada con una amplia gama de procesos biológicos, incluidas las condiciones nutricionales, el sistema inmunitario y la reducción de compuestos nitrogenados que son transformados en sistemas de cultivo por dicha microbiota (Yamashita *et al.*, 2016; Das *et al.*, 2017). Por ello la importancia de estudiar la ecología microbiana intestinal de los langostinos, con el fin de reconocer las bacterias benéficas residentes y como son afectadas, por la nutrición, la composición del agua y el tipo de cultivo. El estudio de la composición microbiana de *M. rosenbergii* es fundamental para conocer profundamente las relaciones simbióticas entre la microbiota y el hospedero las cuales influyen en su bienestar y también para futuras aplicaciones en acuicultura.

Así mismo, en los últimos años, la búsqueda de nuevas tecnologías de acuicultura sustentable ha permitido el desarrollo de sistemas de cultivo como el biofloc, donde se llevan a cabo procesos de reducción microbiana a partir de la adición de una fuente de carbono (Ferreira *et al.*, 2015), permitiendo la promoción de bacterias desnitrificadoras, fitoplancton y zooplancton, que puede servir de alimento para las especies cultivadas y con un efecto positivo en la calidad del agua y el control de patógenos, con un menor impacto ambiental al limitar los recambios de agua y desechos en forma de efluentes (Avnimelech, 2007; Azim y Little, 2008).

Si bien ambas tecnologías han sido ampliamente estudiadas por separado, se desconoce su efecto en la microbiota intestinal y en el agua de cultivo del langostino (*M. rosenbergii*) y el uso de técnicas de secuenciación masiva y los métodos bioinformáticos sobre la composición específica de la comunidad microbiana que se establece al cultivar este crustáceo. Por lo anterior, en este estudio se evaluó la diversidad y abundancia de la comunidad microbiana mediante secuenciación masiva de muestras de agua y de intestino del langostino cultivado en biofloc con el probiótico *Lactococcus lactis*.

Capítulo II. MARCO TEÓRICO

II.1 Acuicultura

La acuicultura se refiere a la producción o cultivo de organismos acuáticos, pertenecientes a distintos grupos de peces, crustáceos, moluscos y plantas, esta actividad implica la intervención del hombre en el proceso tanto de cría o cultivo y le ofrece alternativas alimenticias y amplias oportunidades de negocio (FAO, 2018).

En los últimos años ha ido en aumento la demanda de productos acuícolas debido a su alto consumo, en el año 2020 hubo una producción de 88 millones de toneladas (FAO, 2022). Algunas de las principales especies que se consumen son: camarón, tilapia, trucha, atún, bagre y langostino (FAO, 2016). Particularmente el cultivo de langostino destaca sobre el cultivo de otras especies debido a que es un crustáceo que se puede cultivar en agua dulce, su tiempo de siembra es corto (9-12 meses) y se puede tener a pequeña o mediana escala con instalaciones sencillas (García-Guerrero *et al.*, 2013).

El cultivo de este crustáceo es muy importante porque es un alimento que se utiliza para consumo humano, tiene alto contenido de proteína, su carne es de buen sabor y es visualmente atractivo, tienen un alto valor económico y porque la conservación de lagunas especies está en riesgo; en el área de la investigación se requiere saber no solo de microorganismos patógenos en los organismos acuáticos, sino también de las comunidades bacterianas benéficas que se establecen en el sistema y su función ecológica, de lo cual también es necesario con el langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) (Cienfuegos *et al.*, 2018).

II.2 Generalidades de la especie *Macrobrachium*

Los langostinos del género *Macrobrachium* en sus primeros estadios de vida se caracterizan por ser, larvas planctónicas que habitan ambientes salobres y una vez que estos pasan a la etapa juvenil, comienzan a migrar desde la costa hasta las zonas altas de los ríos donde habitan en aguas dulces, contribuyendo al flujo de energía que posteriormente se convierte en biomasa a lo largo de los diferentes hábitats por los que transitan (Valencia y Campos, 2007). Esta característica, es conocida como anfidromía (McDowall, 2007), y sitúa a los langostinos en una posición sobresaliente en el elenco de adaptaciones y roles ecológicos presentes en los organismos acuáticos, incluso desde una perspectiva evolutiva (García-Guerrero *et al.*, 2013) (Figura 1).

II.3 Clasificación taxonómica

Macrobrachium rosenbergii

Clase: Malacostraca

Orden: Decápoda

Familia: Palaemonidae

Género: *Macrobrachium*



Figura 1. Langostino malayo (*M. rosenbergii*).

Foto de: <http://www.fao.org/fishery//>

II.4 Distribución

El género *Macrobrachium* lo integran 238 especies que se distribuyen desde la franja tropical y subtropical alrededor de todo el mundo De Grave *et al.* (2009). En este género, existe una amplia diversidad de la longitud, morfología y requerimientos del hábitat dependiendo de la especie (Bauer, 2011).

El langostino (*M. rosenbergii*) es un crustáceo nativo del sudeste de Asia, Sur del Pacífico, el norte de Oceanía y el oeste de las islas del Pacífico (FAO, 2009). Los organismos adultos de esta especie, actualmente se distribuyen por todas las zonas tropicales y subtropicales del mundo. Se localizan en

aguas dulces continentales como lagos, ríos, lagunas, pantanos, canales, estanques y áreas estuarinas, comunicados con el mar (Vega-Villasante *et al.*, 2011). Actualmente el langostino *M. rosenbergii* es cultivado en distintos países entre los que destacan por su alta producción: Bangladesh, Brasil, China, Ecuador, India, Malasia y Tailandia. En México no ha tenido los resultados que se esperaban desde que fue introducido en 1973, se necesita de varias estrategias para potenciar su producción (FAO, 2017).

En México las principales entidades con cultivo de *M. rosenbergii* son Tamaulipas, Jalisco, Morelos, Estado de México y San Luis Potosí. En el mercado local y regional la oferta del langostino es constante en los estados costeros de nuestro país, que son abastecidos a través de la actividad pesquera con especies nativas, ya que son escasas las UPA's que se dediquen al cultivo de este crustáceo.

II.5 Estructuras externas de los langostinos

El cuerpo de los langostinos se divide principalmente en dos partes, las cuales son el cefalotórax y el abdomen la primera parte está compuesta por dos antenas y anténulas, las cuales tienen función sensorial o táctil para poder percibir animales que estén cerca de ellos o para percepción de alimento, cuentan con una mandíbula la cual corta y desmenuza el alimento, su primer maxilar es para la manipulación del alimento y el segundo para la circulación del agua hacia la cámara branquial; posee tres maxilípedos que sirven para manipular alimento, asimismo cuentan con cinco pares de periópodos, donde los dos primeros recolectan alimento y del tercero al quinto tienen función marchadora (Lima *et al.*, 2014). La segunda parte del langostino, el abdomen, está integrado por cinco pleópodos los cuales tienen función natatoria. Su parte caudal está compuesta por el urópodo y el telsón. Estructuras que sirven para dar propulsión, el primero da dirección y el segundo sirve como defensa (FAO, 2017) (Figura 2).

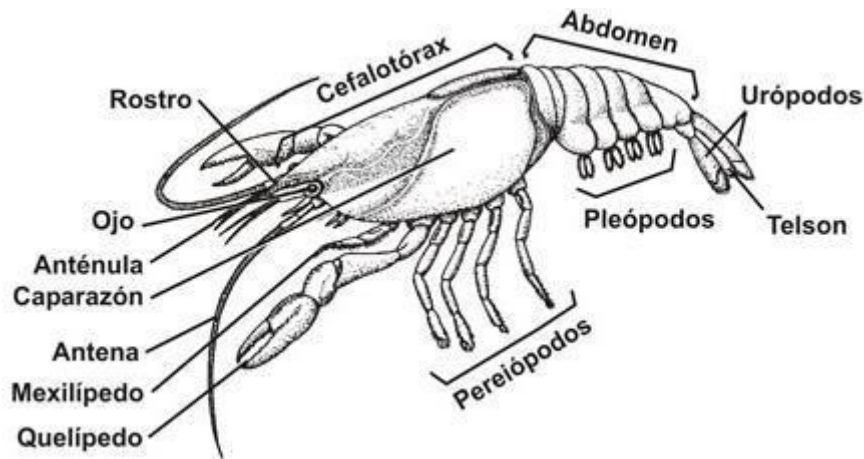


Figura 2. Estructuras externas del langostino (Vega-Villasante *et al.*, 2011)

II.6 Estructura interna de los langostinos

La estructura interna de los langostinos son el cerebro, el corazón, el estómago, estomago gástrico, pilórico, el hepatopáncreas y el intestino. El hepatopáncreas es el órgano más importante del sistema digestivo, es ahí donde se lleva a cabo la digestión, funciona como reservorio de nutrientes y además lleva a cabo funciones metabólicas como síntesis, absorción, secreción y metabolismo de lípidos e hidratos de carbono, también secreta enzimas involucradas en la respuesta antioxidante y estrés oxidativo de la catalasa y superóxido dismutasa (Sriket *et al.*, 2011). Parte esencial dentro del tracto digestivo es el intestino, en el cual se digiere el alimento y se absorben los aminoácidos, péptidos y ácidos grasos (Poljaroen *et al.*, 2017).

El estómago tiene regiones engrosadas llamadas ostiolos que intervienen en la trituración de alimentos, además de ser válvulas donde fluye la sangre (Lima *et al.*, 2014), la cual es bombeada a través de las arterias; particularmente la sangre de los langostinos contiene hemocianina que a diferencia de otros animales tienen hemoglobina, esta es una proteína que se encarga del transporte de oxígeno y en lugar de tener hierro presenta dos átomos de cobre, los cuales le dan coloración azul-verdoso a su sangre (Valverde *et al.*, 2016).

II.7 Ciclo de vida

Cuando las hembras de langostino se aparean y son fertilizadas, migran hacia aguas salobres donde las larvas eclosionan; esto ocurre principalmente en la época de lluvias (García-Guerrero *et al.*, 2013). Después de la eclosión de las larvas, pasan por 11 estadios para llegar a postlarva, en aproximadamente de 30 a 45 días (Ismael y New, 2000). Para el desarrollo de las larvas, se requiere una salinidad en el agua de 15 a 35 ppm, hasta que llegan a postlarva, donde buscan salinidades más bajas, paulatinamente hasta valores cercanos a 0 ppm (Vega-Villasante *et al.*, 2011; INAPESCA, 2018).

Después de tres meses en condiciones naturales o de estero, los organismos buscan lugares del río donde predomine el agua dulce (Ponce-Palafox *et al.*, 2002)., esto en su etapa de juvenil y adulto, ya que los langostinos tienen un desarrollo óptimo en salinidades menores a 13 ppm, de tal manera que comienzan su migración río arriba hacia agua dulce, para su desarrollo (García-Guerrero *et al.*, 2013). Para entonces los animales juveniles ya tienen de 6 a 7 cm de largo y pesan alrededor de 6 g, así mismo, su aspecto es el de un adulto (Valverde, 2021). Los juveniles de *Macrobrachium* tienen un crecimiento constante mediante mudas cada 4 a 6 días (Roman-Contreras, 1978). Y la madurez sexual la alcanzan en aproximadamente seis meses bajo condiciones favorables (FAO, 2017) (Figura 3).

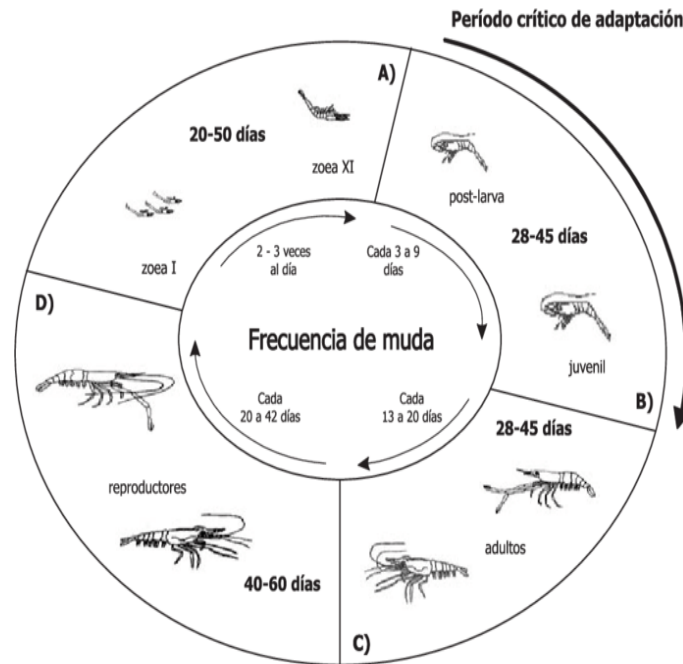


Figura 3. Ciclo de vida del Langostino y etapas de muda (Bibiano *et al.*, 2005).

II.8 Alimentación del langostino

Los langostinos son animales considerados carroñeros o detritívoros los cuales tienen cierta preferencia por materia en descomposición (INAPESCA, 2018). De manera natural consumen detritus orgánico, pequeños crustáceos, insectos, moluscos, anélidos, restos de organismos (Espinosa–Chaurand *et al.*, 2011). En condiciones de falta de alimento pueden ser caníbales (García-Guerrero *et al.*, 2013).

En condiciones experimentales los langostinos han sido alimentados con pequeños crustáceos, como es el caso de la *Artemia*, que ha sido ampliamente utilizada en la nutrición de larvas, juveniles, adultos y reproductores de peces y camarones debido a que tienen un alto contenido nutricional (50% de proteína, contiene ácidos grasos y lípidos) (Yao *et al.*, 2018; Le *et al.* 2019). Además, sirve como vector para administrar infinidad de sustancias como antibióticos, pigmentos, probióticos, con la finalidad de que lleguen casi intactos al tracto digestivo y pueden ser asimilados por las especies cultivadas (Gelabert *et al.*, 2008).

Además, los langostinos malayos han sido alimentados con biofloc y microalgas, obteniendo mejores resultados en su crecimiento al combinarse estos alimentos (Ekasari *et al.*, 2021). También se ha probado la alimentación de los langostinos con biofloc como alimento principal y se ha obtenido un perfil nutricional y una supervivencia superior a la reportada con alimentos tradicionales (Boada, 2016). Por otro lado, se sabe que en los cultivos con biofloc además de obtener un mayor crecimiento y supervivencia de los langostinos, se puede disminuir significativamente la ración de alimento comercial administrado (Pérez-Rostro *et al.*, 2014).

Para la elaboración del alimento peletizado para langostinos al igual que para otras especies acuáticas, se requiere que las fuentes proteicas empleadas sean de alta calidad, pero esta calidad dependerá de diversas condiciones en la conservación y de la calidad de la materia prima que se utilice (Rivas-Vega *et al.*, 2006) y por lo tanto también los costos de fabricación, por lo que su aprovechamiento eficiente y conversión alimenticia son fundamentales para que los costos de operación y de recuperación hagan a la actividad rentable económicamente. Lo anterior es importante de considerar sobre todo porque la harina de pescado es el principal ingrediente para la elaboración de dietas balanceadas debido a su alto valor nutricional, ya que son ricas en ácidos grasos poliinsaturados y proteínas y su porcentaje dependerá del pescado que se seleccione, pero también tiene un costo elevado, por lo que la aplicación de técnicas de cultivo eficientes como la de biofloc, en donde se tiene alimento complementario dentro del sistema, permite optimizar la eficiencia digestiva y por tanto los costos de la producción (Tacón y Metian, 2015).

II.9 Importancia ecológica y económica de los langostinos (*Macrobrachium* sp.)

Los langostinos, son un grupo de animales acuáticos que tienen un papel ecológico importante para la dinámica ambiental de los ecosistemas de ríos y lagunas (Murphy y Austin, 2005). Son depredadores de macroinvertebrados acuáticos y presa de vertebrados (Vega-Villasante *et al.*, 2014). Pese a su importancia, su conservación en el ambiente está en riesgo debido a que en los últimos 20 años ha habido una disminución en sus poblaciones, vinculada a la sobreexplotación y contaminación ambiental (García-Guerrero *et al.*, 2013).

En cautiverio los langostinos son excelentes candidatos para policultivo, principalmente con tilapia y su tiempo de siembra para comercializarlo es de 14 meses (Souza *et al.*, 2009). Algunas de las especies pertenecientes al género *Macrobrachium* como lo es *M. rosenbergii* tienen un alto valor económico en México, y pueden alcanzar un precio en el mercado de \$845 (MXN) por kilo en 2020,

lo anterior debido a la cultura de consumo como un producto caro, a su contenido de proteína (23g por cada 100g de carne), agradable sabor, bajo en grasa y atractivo visual; con base en las características biológicas anteriores, es que se ha intensificado el interés para cultivar este crustáceo, por lo que son un producto de alta calidad para consumo humano (García-Guerrero *et al.*, 2013), particularmente en el mercado gourmet.

En el campo de la investigación, a pesar de que los langostinos tienen un alto potencial para su producción y comercialización, la mayoría de las investigaciones se centran en técnicas de cultivo, mejoramiento genético y producción y otros animales como la tilapia y camarón debido a su alta demanda. Sin embargo, para que la producción de langostino mejore es necesario desarrollar biotecnologías que incrementen la producción de estos crustáceos. En la actualidad, algunos grupos de expertos se han dedicado a conocer características ecológicas y biológicas que describen al género *Macrobrachium*, sin embargo, si bien se conoce su biología básica, se tiene escasa información detallada del género, sus atributos poblacionales y como potenciar su explotación, además de la falta de conocimiento y estudios en el cultivo larvario y juvenil en aspectos nutricionales, así como profundizar en el microbioma del agua de cultivo y a nivel intestinal (García-Guerrero *et al.*, 2013) para que este pueda ser cultivado hasta alcanzar una producción competitiva con la tilapia y camarón y además considerarse como una especie alternativa para la acuicultura (Méndez, 2017).

II.10 Requerimientos ambientales

Para el óptimo desarrollo de los langostinos se necesita que en el sitio de cultivo se mantengan los requerimientos ambientales en los siguientes parámetros:

II.10.1 Temperatura

Los langostinos, del mismo modo que todos los crustáceos son animales cuya temperatura corporal depende del medio en el que se encuentran y por lo tanto son sensibles a sus modificaciones. El intervalo óptimo para el cultivo de langostinos fluctúa entre 26°C y 32°C (Boyd y Zimmermann, 2000). Por encima de los 32°C o por debajo de los 28°C su apetito se reduce junto con su crecimiento y por debajo de los 20°C, prácticamente se detiene (Guzmán-Arroyo, 1987). Las temperaturas dentro de la franja comprendida entre los 8 y 10°C son generalmente letales para los langostinos,

mientras que temperaturas por encima de 38°C ocasionan estrés térmico que también suele causar alta mortalidad (Vega-Villasante *et al.*, 2011; INAPESCA, 2018).

II.10.2 Oxígeno Disuelto

El oxígeno disuelto en el agua resulta indispensable para la supervivencia de los langostinos. Muchos de los problemas dentro de un estanque están relacionados con los bajos niveles de este, como problemas en la salud de los langostinos, manchas negras en el caparazón, altas mortalidades (Valverde, 2021). La concentración de oxígeno disuelto ideal para un buen crecimiento del langostino se encuentra en 5 mg/l (Boada, 2016; INAPESCA, 2018). Los langostinos, al igual que diferentes animales acuáticos sujetos de cultivo, cuando son sometidos a condiciones de bajo nivel de oxígeno presentan un crecimiento menor al normal, son más susceptibles a contraer enfermedades e incluso pueden morir (Valverde, 2021).

II.10.3 pH

Los valores óptimos de pH fluctúan entre 7 y 8.5. La máxima acidez tolerada por los langostinos es de pH 6.5, mientras que en un pH de 3.0 hay mortalidad masiva, no obstante, la máxima alcalinidad que está reportada para un cultivo sano es de 8.5 (Vega-Villasante *et al.*, 2011; Boada, 2016; INAPESCA, 2018).

II.11 Densidad de cultivo

Durante el cultivo de langostinos del género *Macrobrachium* las densidades de siembra de acuerdo con el INAPESCA (2018) es de 3 a 6 postlarvas/L o de 4 a 8 organismos/m², aunque pueden variar dependiendo de la intensificación de la producción y va desde 4 a 20 postlarvas/m² para sistemas semiintensivos y por arriba de 25 postlarvas/m² en intensivo (Negrini *et al.*, 2017); aunque, es importante considerar que conforme se incrementa la densidad, el control de las variables ambientales debe ser más estricto al igual que la alimentación, es decir dosificar las raciones y no dejar de alimentar para evita posible canibalismo (Vega-Villasante *et al.*, 2011; FAO, 2017; INAPESCA, 2018).

II.12 Problemáticas en el cultivo del langostino

II.12.1 Uso excesivo de recursos para la producción acuícola

Para la producción de organismos acuáticos como el langostino es muy importante y necesaria la utilización del recurso agua, tanto para pequeños, medianos o grandes sistemas de cultivo ya que el requerimiento puede alcanzar hasta varios cientos de metros cúbicos por día, por lo que el agua se convierte en un factor limitante de la actividad debido a su escases a nivel mundial, debido a que es un recurso clave para mantener estables los compuestos nitrogenados en el agua (Borja, 2002).

Para el cultivo intensivo y semiintensivo del langostino se requiere y se debe contar de un espacio amplio para colocar los estanques, por lo cual es indispensable tener un lugar adecuado que cumpla con los requerimientos como el clima y la disponibilidad del agua (García- Guerrero, 2013).

II.12.2 Efluentes contaminantes derivados de la producción

Uno de los principales problemas del cultivo de peces y crustáceos es la intervención intensiva que generan las prácticas para su producción, las cuales van degradando el medio ambiente, debido a que los cuerpos de agua como ríos, mares y lagos reciben grandes cantidades de desechos, como el alimento no consumido por los animales, productos de excreción, materias fecales, químicos, hasta microorganismos como bacterias y parásitos, lo que puede ocasionar enfermedades en los organismos en cultivo (Silvera *et al.*, 2018).

Para hacer frente a las enfermedades provocadas por virus y bacterias en algunos cultivos acuícolas, se hace uso indiscriminado de antibióticos y sustancias químicas que pueden afectar al ecosistema, en el que se desarrolla la actividad (Vega-Villasante, 2014). Este impacto tiene un costo ambiental importante porque representa un contaminante para el recurso agua; económico, al no tener la misma calidad y aplicación para otros sistemas de producción y social, debido a que el langostino y otros productos se dirigen para el consumo humano y se crea resistencia bacteriana (Buschmann, 2007). Ante este escenario, surge el interés por el uso de nuevas tecnologías y sistemas de cultivo que minimicen dichos impactos.

II.12.3 Enfermedades

Durante el cultivo de langostinos se pueden presentar enfermedades, debido a que los crustáceos se encuentran vulnerables, por las condiciones del cultivo y además por los constantes cambios de los factores abióticos lo cual provoca que los animales lleguen a estresarse y ser susceptibles a tener enfermedades causadas principalmente por virus o bacterias como *Vibrio* que causan alta mortalidad de los organismos y por ende se tienen pérdidas económicas (Ajadi *et al.*, 2019).

Algunas de las principales causas de mortalidad del langostino son las enfermedades bacterianas como la mancha negra que atacan la cutícula (Johnson y Bueno, 2000).

II.12.4 Dietas y nutrición

La nutrición en los langostinos comprende tanto procesos fisiológicos como químicos en los cuales el organismo asimila los alimentos necesarios para su óptimo crecimiento y acción de sus funciones vitales (Méndez, 2017). La nutrición involucra a la ingestión, digestión, absorción, transporte de nutrientes y eliminación de los desechos (Vega-Villasante *et al.*, 2014). Diversos nutrientes deben estar presentes en la dieta de los langostinos para que lleven a cabo sus funciones, tales como las proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales (Méndez, 2017).

El alimento que comúnmente se les administra a los langostinos no cumple con los requerimientos nutricionales para su óptimo crecimiento debido a que no se tiene un alimento específico para estos y se tiene que hacer uso de alimento para camarón (INAPESCA, 2018). El alimento es considerado la mayor inversión por parte de los productores para la producción del langostino, debido a su alto costo (Méndez, 2017).

Además de lo anterior el alimento para camarón se elabora con harina de pescado, lo cual es una contradicción en la actividad acuícola debido a que se extraen peces para la elaboración del propio alimento de animales acuáticos; por lo cual, se ha optado por utilizar otro tipo de harinas, sin embargo es necesaria la implementación de alimento específico para langostinos que cumpla con los porcentajes nutrimentales adecuados de proteína, fibra, ceniza y minerales y sustituir el uso de la harina de pescado (Espinosa *et al.*, 2013).

II.13 Probióticos

Se han realizado diversas investigaciones en las que se ha evaluado el efecto de la adición de microorganismos probióticos en cultivos de tilapia, camarón y langostino en los que se ha demostrado el beneficio tanto en la salud como en el crecimiento de los organismos (Wang *et al.*, 2019; Cano-Lozano *et al.*, 2021; Frozza *et al.*, 2021). La aplicación de probióticos ha evolucionado con el tiempo, al igual que su definición, el más adecuado para su uso en la actividad acuícola el propuesto por Villamil y Martínez (2009), la cual hace referencia a los probióticos como “microorganismos vivos que al ser administrados como suplemento en la dieta en cantidades adecuadas, pueden llegar a causar modificaciones en la microbiota gastrointestinal del hospedero y generar efectos benéficos como un aumento en la conversión alimentaria, en la calidad del agua y resistencia a enfermedades, todo esto con el objetivo de mejorar la salud en los animales”.

Para considerar a los microorganismos como probióticos, deben de cumplir con ciertos requerimientos tales como: 1) ser seguro para el animal, es decir, que no cause enfermedad, también deben llegar vivos al tracto gastrointestinal y ser capaces de colonizarlo para lograr una exclusión competitiva eficaz, 2) inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos tanto Gram positivos como Gram negativos, al producir ácidos u otras sustancias que inhiban su crecimiento, 3) tener un corto tiempo de reproducción, 4) tolerar el pH gástrico y las sales biliares, tienen que ser estables al contacto con bilis, ácidos y enzimas y 5) ser estables y viables durante el almacenaje (Gutiérrez, 2013).

II.13.1 Mecanismos de acción

Los beneficios de los probióticos en los animales cultivados son diversos como, la prevención y el tratamiento de trastornos gastrointestinales de diversa etiología lo cual ocurre al incrementar el desarrollo del epitelio intestinal, 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 (Sanz *et al.*, 2003) (Tabla 1).

Tabla 1. Principales mecanismos de acción de bacterias probióticas.

Mecanismos de acción	Descripción
Colonización del tracto digestivo	Los microorganismos probióticos tienen la capacidad de adherirse rápidamente al epitelio intestinal a través de moléculas conocidas como adhesinas e impiden que microbios indeseables se adhieran.
Competencia por nutrientes y energía	Los microorganismos están compitiendo constantemente por nutrientes que se encuentran en el medio. 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.
Antagonismo con microorganismos patógenos	Una de las acciones de los probióticos es proteger la colonización de patógenos, mediante la producción de ácidos grasos de cadena corta, ácidos orgánicos volátiles como el ácido láctico, creando un ambiente hostil para microorganismos patógenos. También producen bacteriocinas y biocinas que son péptidos con actividad antimicrobiana.
Calidad del agua	Las bacterias heterótrofas requieren energía para sintetizar su propia materia orgánica por lo que a través de la desnitrificación la obtienen, con la enzima amonio monooxigenasa se oxida el amonio y pasa a nitrato, posteriormente a través de la enzima nitrato oxidoreductasa se transforma de nitrato a nitrito el cual pasa por el último proceso de oxidación hasta llegar a gas nitrógeno (Andrade <i>et al.</i> , 2015). La calidad del agua ha sido asociada especialmente con <i>Bacillus</i> sp. Esto ocurre porque las bacterias Gram positivas son mejores transformando materia orgánica a CO ₂ ; a diferencia de las bacterias Gram negativas.
Promotores de crecimiento	Las bacterias probióticas se alimentan de los compuestos no digeribles en el intestino y como resultado de su metabolismo producen vitaminas del grupo B, calcio, absorben minerales como el magnesio que pueden servir de nutrientes a los peces y crustáceos. Particularmente los <i>Bacteroidetes</i> y <i>Clostridium</i> aportan vitaminas y ácidos grasos de cadena corta, importantes para el crecimiento óptimo. Además, las bacterias probióticas participan en la producción de enzimas extracelulares como proteasas, lipasas las cuales contribuyen a la asimilación de nutrientes y contribuyen a la digestión.

Balcázar *et al.* (2006)

II.13.2 Beneficios generales de los probióticos en animales acuáticos

Son diversos los probióticos que se han utilizado en la acuicultura, ya que cada uno tiene beneficios específicos. Estos se han administrado en varias especies como tilapia, bagre, carpa, así como diferentes tipos de peces de ornato, además en crustáceos como langostinos y camarones, todos con resultados variados en relación con la especie a la que se le suministran y a sus hábitos alimenticios (Tabla 2).

Tabla 2. Beneficios que se han obtenido en estudios en los últimos seis años al utilizar probióticos en peces y crustáceos

Probiótico	Especie cultivada	Beneficio obtenido	Autor y año
<i>Bacillus subtilis</i>	Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Al adicionar el probiótico en un cultivo con tilapia el crecimiento específico fue mayor ($p < 0.05$) después de 8 semanas de experimentación.	Liu et al. (2017)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Tilapia (<i>O. niloticus</i>)	Al agregar una concentración de cadmio de 1 mg L ⁻¹ las tilapias tuvieron un declive en la diversidad microbiana intestinal, pero al añadir el probiótico los cambios se revirtieron, ya que se redujo la abundancia de <i>Flavobacterium</i> y <i>Pseudomonas</i> . Además de que se promovió significativamente el rendimiento del crecimiento.	Zhai et al. (2017)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Al adicionarse <i>Lactococcus</i> en un cultivo de trucha arcoíris se obtuvo una menor mortalidad (20%), comparado con el tratamiento control (80%).	Araújo et al. (2015)
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Trucha (<i>O. mykiss</i>)	Al añadir el probiótico en cultivo de trucha, la actividad del sistema inmune incrementó, lo cual fue indicado por los valores de leucocitos, IgM y neutrófilos. <i>Enterococcus casseliflavus</i> mejoró la resistencia frente a la infección por <i>Streptococcus iniae</i> .	Safari et al. (2016)
<i>Bacillus subtilis</i> y <i>Lactobacillus</i> .	<i>M. rosenbergii</i>	Con la combinación de los probióticos (<i>Bacillus subtilis</i> y <i>Lactobacillus</i>) en un cultivo de langostinos con biofloc, los animales aumentaron la cantidad de hemocitos, la actividad fagocítica, la sérica de superóxido dismutasa y lisozima. Esto se relacionó con el aumento significativo ($p < 0.05$) de la abundancia de los dos probióticos en el agua de cultivo e intestino.	Miao et al. (2017)

Además, se sabe que ciertos probióticos tienen un alto potencial en biorremediación, presentan 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). Además, algunos probióticos producen pigmentos carotenoides como la astaxantina 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).

II.13.3 *Lactococcus lactis*

El género *Lactococcus*, está incluido dentro de la familia Streptococcaceae, y se describió por primera vez en 1985 después de la división del género *Streptococcus*, que incluía un grupo de microorganismos conocidos como estreptococos lácticos representados por agentes aislados de material vegetal, ganado lechero y productos lácteos (Song *et al.*, 2017).

Lactococcus es uno de los probióticos más utilizados e importantes ya que destaca por su acción de inhibir la proliferación y colonización de otros microorganismos considerados patógenos primarios u oportunistas (Kimoto *et al.*, 1999; Gueimonde *et al.*, 2006; Balcázar *et al.*, 2008). Tienen la capacidad de estimular enzimas digestivas las cuales incrementan la digestión alimenticia (Pérez-Chabela *et al.*, 2020), asimismo, se incrementa la actividad de proteasa, amilasa y lipasa con lo cual aumenta la absorción de nutrientes, lo cual contribuye a un mayor crecimiento (Ramírez-Torrez *et al.*, 2019). También las bacterias ácido-lácticas, así como el género *Bacillus* tienen capacidad bactericida ya que produce Nisina y presentan actividad antagónica contra *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp. y *Vibrio* sp. (Kesarcodi *et al.*, 2008) (Figura 4).

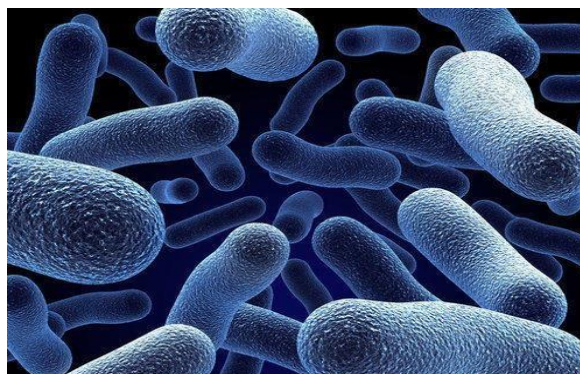


Figura 4. Vista microscópica del probiótico *Lactococcus lactis*

II.13.4 Uso de probióticos en el crecimiento de peces y crustáceos

En la actualidad se reporta un número considerable de investigaciones orientadas a determinar el efecto probiótico de algunos microorganismos en el crecimiento de peces y crustáceos, por ejemplo, Boonthai *et al.* (2011), utilizaron cinco probióticos: *Bacillus subtilis*, *B. polymyxa*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* y *B. thuringiensis* de forma liofilizada (FD) y células pulverizadas (LS) en el cultivo de

Penaeus monodon y después de 75 días de experimentación observaron que el peso y longitud de los camarones en todos los tratamientos con probiótico fueron superiores (1210.87% y 187.65% respectivamente) a los observados en el grupo control (sin probiótico) (890.09% y 125.93% respectivamente) por lo que los autores concluyeron que las bacterias probióticas tienen potencial para optimizar el cultivo de camarón y mejorar el rendimiento en el crecimiento.

Seenivasan *et al.* (2015), evaluaron el efecto de tres probióticos (*Lactobacillus sporogenes*, *Bacillus subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae*) suministrados en dietas para postlarvas de *M. rosenbergii* sobre la supervivencia, crecimiento y actividad de las enzimas digestivas durante 60 días y observaron que el probiótico *S. cerevisiae* promovió un mayor crecimiento en peso y longitud (5.68 cm y 1.88 g respectivamente) en los langostinos comparado con el control (4.80 cm y 1.28 g) atribuido a una mejor absorción de nutrientes.

Ghosh *et al.* (2016), evaluaron el efecto de dos probióticos comerciales (Zymetin, Super PS y combinados) suministrados en el agua y alimento, en el crecimiento y rendimiento productivo de juveniles de *M. rosenbergii* durante 240 días. Los resultados indican que el peso ganado de los langostinos en los que se suministró la mezcla de los dos probióticos fue mayor a la de los crustáceos en los otros dos tratamientos y el control (50.59, 47.03, 42.31 y 38.52 g), por lo cual concluyeron que la adición de la mezcla de estos probióticos comerciales puede aplicarse en una granja acuícola para aumentar la producción de langostinos. Por su parte, Ibar *et al.* (2017), evaluaron el efecto de la incorporación de un probiótico comercial en agua con cultivo de rohu (*Labeo rohita*), así como su efecto en la calidad del agua y en el crecimiento. Los resultados indican que la incorporación del probiótico incrementó el crecimiento de los peces respecto al control, además su supervivencia fue del 100%, mientras que en el tratamiento control fue del 80%.

Los resultados de la aplicación de probióticos en organismos acuáticos son variados y se relaciona con la respuesta de la especie al probiótico, aunque la mayoría de los estudios se centran en evaluar el efecto sobre el crecimiento y supervivencia, existen otros parámetros como eficiencia nutricional y estado de salud que también pueden verse favorecidos por la presencia de los probióticos en los organismos (Kumar *et al.*, 2013). Con base en lo anterior se puede considerar que el efecto de los probióticos en la acuicultura depende de diversos factores y protocolos aplicados a las especies acuáticas (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de la aplicación de probióticos en dietas/agua de cultivo de peces y crustáceos.

Probiótico	Días de experimento	Especie	Resultados en crecimiento	Autor y año
<i>Bacillus subtilis</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i>	60 días	<i>Macrobrachium malcolmsonii</i>	Al añadir <i>B. subtilis</i> en cultivo de langostinos se observó un mayor crecimiento, el peso aumentó 3.5 veces (peso inicial de 5.86 g y peso final de 20.25 g) y con <i>P. fluorescens</i> el aumento fue de 2.7 (peso inicial 6.80 g y peso final 18.50 g).	John <i>et al.</i> (2018)
<i>Clostridium butyricum</i>	60 días	<i>M. rosenbergii</i>	Al añadir el probiótico en un cultivo de langostinos infectados con <i>Vibrio harveyi</i> , se observó un mayor peso ganado y mayor tasa de crecimiento específico los cuales fueron significativos ($p < 0.05$) comparado con el control (590 y 380%; 3 y 0.5 %/día respectivamente).	Sumon <i>et al.</i> (2018)
<i>Bacillus cereus</i>	28 días	<i>M. rosenbergii</i>	Los tratamientos donde se agregó el probiótico a una concentración de 1×10^4 UFC/g tuvieron un peso ganado y una mayor tasa de crecimiento específica (32.84% y 1.01 %/día, respectivamente) comparados con el tratamiento sin probiótico (17.13 y 0.56 %/día respectivamente).	Wee <i>et al.</i> (2018)
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> y <i>Lactobacillus reuteri</i>	60 días	Trucha (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Los probióticos administrados en una cantidad de 1 g kg ⁻¹ en la dieta de trucha, ejercieron una actividad protectora antioxidante y que promueve su crecimiento.	Giannenas <i>et al.</i> (2015)
Probióticos comerciales Improval y Prosol	105 días	<i>M. rosenbergii</i>	Al añadir el probiótico comercial en cultivo con langostinos en etapa post larva y juvenil se registró un peso corporal final (16.14 y 26.64g respectivamente), ganancia de peso corporal neta (15.76 y 19.49g respectivamente) mayores comparado con el grupo control (6.28g y 14.27g; 5.9 y 7.12).	Gupta y Dhawan, (2013).

II.13.5 Impacto de los probióticos en la calidad del agua

En diversas investigaciones se han evaluado diferentes probióticos y su efecto sobre la calidad del agua en los sistemas de cultivos acuícolas, debido a la interacción entre los parámetros de la calidad del agua como son el amonio, nitrito y nitrato y los organismos en cultivo, lo que puede variar la producción; al respecto Hasan *et al.* (2012), observaron que al añadir 10 g de probióticos comerciales en las dietas para camarón la concentración de nitritos, nitratos y amonio fueron menores en los tratamientos con la aplicación de diferentes probióticos comerciales: pH Fixer (*Bacillus* sp.) Water Super Biotic (*Bacillus* sp. y *Streptococcus* sp.) Super PS (*Rhodobacter* sp. y *Rhodococcus* sp.) y Zymetin (*Bacillus mesentericus*), comparados con el grupo control (sin probióticos) además se obtuvo un peso mayor en los camarones (*Penaeus monodon*), así como una mayor supervivencia con probióticos (83%) respecto al control (71%).

Thurlow *et al.* (2019), observaron que al agregar el probiótico *Bacillus velezensis* en el agua durante el cultivo de bagre (*Ictalurus punctatus*), el fósforo total (0.110 mg/l), nitrógeno total (0.195 mg/l) y nitrato (0.013 mg/l) presentes en el agua tuvieron una disminución significativa en comparación con un sistema sin probióticos (0.136, 0.334 y 0.051 mg/l respectivamente), lo cual fue muy importante debido a que se permitió mantener los niveles de dichos parámetros en el intervalo óptimo para el cultivo, disminuyendo los recambios de agua.

Por su parte Cai *et al.* (2019), observaron que efectivamente al adicionar los probióticos *Bacillus licheniformis* y *Bacillus flexus* en el agua de cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*) (menores a 1 mg/L) los niveles de nitrógeno amoniacal total en el agua fueron menores a los reportados en tratamientos tradicionales, lo que trajo un beneficio a los camarones como mejorar eficazmente el crecimiento, las actividades de las enzimas inmunes innatas y las actividades de las enzimas digestivas.

Melgar Valdes *et al.* (2013), evaluaron los parámetros de calidad del agua durante un cultivo con camarón (*L. vannamei*), en el cual se adicionó un probiótico comercial compuesto por *Rhodopseudomonas palustris*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* y *Saccharomyces cerevisiae* (EMTM, Japan). Durante el cultivo todos los parámetros se mantuvieron constantes y dentro del intervalo óptimo, por otro lado, se relacionó el crecimiento de los camarones del tratamiento con el probiótico con algunos parámetros como el oxígeno disuelto, el pH y la salinidad a través de un análisis discriminante, lo que permitió concluir que al usar el probiótico hay un efecto positivo en el crecimiento y las condiciones del cultivo de *L. vannamei*.

De manera similar a lo anterior Akter *et al.* (2017), reporta que durante un cultivo de *M. rosenbergii*, los parámetros de calidad del agua permanecieron constantes y dentro del intervalo óptimo para el crecimiento del langostino al haber administrado probióticos comerciales en el alimento.

Durante el cultivo de *Pangasius sutchi*, *Catla catla* y *Labeo rohita*, Padmavathi *et al.* (2012), observaron que al agregar probióticos en el agua, la concentración de amonio (0.38 mg/l), nitritos (0.03 mg/l) y fosfatos (0.41 mg/l), fue menor ($p < 0.05$) a la observada en el tratamiento control (0.51 mg/l de amonio, 7 mg/l de nitritos y 0.56 mg/l de fosfatos), esto atribuido a los procesos de desnitrificación del amonio, lo cual indica que estos microorganismos vivos son fundamentales para mantener la calidad del agua estable y dentro de lo óptimo para las especies que se cultivan.

II.13.6 Probióticos en el control de patógenos

En diversos estudios se ha probado efecto de la administración de probióticos durante el cultivo de especies acuáticas, con el propósito de combatir o desplazar a los microorganismos patógenos que causan altas mortalidades, con lo que se ha demostrado que en su mayoría los resultados positivos, por lo que se mantiene el interés de su evaluación y uso.

Entre los estudios de la aplicación de probióticos en organismos acuáticos destaca el de Ren *et al.* (2013), quienes evaluaron durante el cultivo de tilapia (*O. niloticus*) el efecto de la adición del probiótico *Lactobacillus plantarum* en poblaciones infectadas con *Aeromonas hydrophila* en comparación con una población sin probióticos. Al final del estudio observaron que el tratamiento con probiótico redujo el daño en el intestino de las tilapias provocado por *A. hydrophila*. Además, se observó la presencia de bacterias *L. plantarum* adheridas al intestino anterior de las tilapias, que es la zona más sensible del intestino y la más susceptible a lesiones, por lo que concluyeron que el probiótico *L. plantarum* tiene potencial en la colonización del intestino, además de la exclusión de microorganismos patógenos.

Por otra parte, el interés por la aplicación de probióticos en la acuicultura y otras industrias ha incentivado a la búsqueda de nuevas especies, por lo que se han aislado diferentes probióticos del tracto digestivo de animales, tanto de especies acuáticas como especies terrestres, los cuales se han suministrado a organismos acuáticos con buenos resultados. Al respecto Mujeeb *et al.* (2017), detectaron que la bacteria *Brevibacillus laterosporus* aisladas del tracto digestivo de postlarvas de *M. rosenbergii*, presentó actividad antibacteriana contra patógenos como *A. hydrophila* y *Vibrio parahaemolyticus* en un cultivo de los langostinos de la misma especie. Lo anterior indica que es

posible obtener probióticos específicos para su uso en la misma especie que fue aislada y la cultivada, lo que puede traer una mayor eficiencia de fijación intestinal. Así mismo identificaron que otros géneros bacterianos como *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Streptococcus* y *Enterobacteriaceae*, también fueron inhibidos por el probiótico.

Al igual que en langostinos, son varios los probióticos que se han evaluado en camarones (*L. vannamei*), con resultados positivos como es el caso de Sánchez-Ortiz *et al.* (2015), quienes observaron que al usar tres probióticos (*Bacillus licheniformis*, *B. subtilis* y *B. subtilis* subsp. *subtilis*) en las dietas de camarones juveniles previamente infectados con el virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV), y con el virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV), los probióticos permitieron una mayor expresión génica del sistema inmunitario en presencia de WSSV e IHHNV y redujo ($p < 0.05$) la prevalencia de estas infecciones.

García-Bernal *et al.* (2018), reportaron que al infectar a postlarvas de camarón (*L. vannamei*) con *V. parahaemolyticus* observaron que aquellas postlarvas alimentadas previamente con dietas suplementadas con el probiótico *Streptomyces* spp., durante 30 días, presentaron un menor daño en el hepatopáncreas debido a *Vibrio*, en comparación con un daño sin la aplicación de probiótico, donde se presenta una menor integridad histológica, con un alto grado de atrofia. Lo que sugiere que el uso de este probiótico mejora el estado fisiológico de las postlarvas, y previene o disminuye el daño de enfermedades infecciosas en el camarón.

Por su parte, Chumpol *et al.* (2016) probaron la bacteria probiótica púrpura no sulfurosa (PNSB) para determinar su capacidad de controlar el patógeno *Vibrio* spp. en un cultivo de camarón y determinaron que las bacterias probióticas inhibieron a tres especies de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. vulnificus*, y *V. parahaemolyticus*), debido a que secretan compuestos que los excluyen, observando así su potencial de exclusión competitiva ante microorganismos que pueden causar daño fisiológico y tener pérdidas ya sea en el número de producción o en el crecimiento de los camarones.

II.13.7 Uso de probióticos en la respuesta inmune

Uno de los principales beneficios de los probióticos es estimular el sistema inmune del hospedero, ya que estos actúan sobre las células implicadas en la inmunidad natural y la inmunidad específica (Balcázar *et al.*, 2006), lo que trae efectos benéficos en los organismos acuáticos que puede variar dependiendo de la especie y el microorganismo usado (Tabla 4).

Tabla 4. Beneficios obtenidos en el sistema inmune al adicionar probióticos en cultivo de peces y crustáceos

Microorganismos utilizados	Resultados obtenidos	Autor y año
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Rhodopseudomonas palustris</i> y <i>Bacillus coagulans</i>	Al incorporar el probiótico <i>Bacillus coagulans</i> en un cultivo de camarón (<i>L. vannamei</i>) se observó un aumento significativo tanto de la actividad fenoloxidasa (actividad que lleva a cabo la enzima responsable de la melanización) así como en la actividad superóxido dismutasa (actividad de defensa antioxidante).	Wang y Gu (2010)
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Al ser añadido el probiótico en cultivo de trucha (<i>O. mykiss</i>), se obtuvo una estimulación de la respuesta inmune, debido a que se promovió una mayor actividad fagocítica y mejoró la supervivencia tras una infección experimental con <i>Aeromonas bestiarum</i> e <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> .	Pieters <i>et al.</i> (2008)
Dos probióticos comerciales con mezcla de diferentes microorganismos	En los tratamientos donde se añadieron los probióticos con cultivo de langostinos (<i>M. rosenbergii</i>), se observó que el recuento de hemocitos tuvo un aumento significativo en la prueba en sangre. Este recuento es importante ya que el estado inmunológico de un animal se refleja con el resultado del perfil hematológico.	Jakhar <i>et al.</i> (2016)
<i>L. rhamnosus</i> , <i>Enterococcus faecium</i> y <i>Bacillus subtilis</i> .	Las truchas que se les administró <i>L. rhamnosus</i> y <i>Enterococcus faecium</i> tuvieron una producción significativa de IL-1 β , la cual se encarga de la iniciación de la cascada de reacciones para activar las células T y las células asesinas naturales (NK).	Panigrahi <i>et al.</i> (2007)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Lactobacillus</i> sp.	Al agregar los probióticos en un cultivo de tilapia (<i>O. niloticus</i>), se evaluaron parámetros inmunológicos obteniendo como resultado en la actividad lisozima sérica, superóxido dismutasa cabeza-riñón, inmunoglobulina total y títulos de aglutinación bacteriana sérica mayores, comparado con el grupo control (sin probiótico).	Ridha y Azad (2012)
<i>Bacillus pumilus</i>	Se evaluaron diferentes niveles del probiótico en concentraciones de 1×10^7 , 1×10^8 y 1×10^9 UFC /g, en un cultivo de langostinos, observando que el peso final, el peso ganado y la tasa de crecimiento específica fueron significativamente mayores respecto al control ($p < 0.05$). Además, se estimuló la respuesta inmune, ya que la actividad de catalasa, óxido nítrico sintasa y fosfatasa ácida aumentaron en los tratamientos con el probiótico.	Zhao <i>et al.</i> (2019)

II.13.8 Concentración y dosis de probiótico

Algunos de los aspectos que constantemente se determina durante una investigación para el uso y la aplicación de probióticos son las concentraciones y la dosificación a las cuales pueden ejercer el mayor beneficio posible al hospedero, principalmente en aspectos como el crecimiento, la supervivencia, exclusión de patógenos y en la mejora de la calidad del agua, aunque no se han

establecido concentraciones mínimas y máximas requeridas, para obtener los beneficios esperados, lo anterior también se presenta con la dosificación evaluada (Mujeeb *et al.*, 2017).

Al respecto Zhou *et al.* (2009), evaluaron el efecto de la incorporación de *Bacillus coagulans* como aditivo en el agua del cultivo de poslarvas del camarón *L. vannamei*, sobre la supervivencia; observaron que el probiótico mejoró la supervivencia de los camarones en comparación con el tratamiento control, así mismo indican que la concentración del probiótico de 5.0×10^5 UFC ml^{-1} promovió una mayor actividad proteolítica, amilolítica y lipolítica, en los camarones, lo que mejoró la supervivencia y estimuló la actividad de enzimas digestivas, generando una mejor asimilación de nutrientes.

Mientras que en el trabajo realizado por Kumar *et al.* (2013), evaluaron la funcionalidad de *B. licheniformis* en tres concentraciones, sobre juveniles de *M. rosenbergii*. Para ello, se determinó el efecto sobre la microbiota intestinal, y la respuesta inmune innata. Los autores indican que obtuvieron que el mayor crecimiento y mejor respuesta inmune al agregar una densidad bacteriana de 1×10^9 UFC g^{-1} . Los conteos microbianos en el intestino indicaron que la presencia de *B. licheniformis* fue mayor ($p < 0.05$) en los grupos tratados, comparado con el control, asociando a una disminución de cepas con potencial patógeno, como *Aeromonas* spp. y *Pseudomonas* spp.

Por su parte Seenivasan *et al.* (2011), determinaron el efecto de cuatro concentraciones de probióticos comerciales Binifit™ (0.5%, 1%, 1.5% y 2%) sobre la supervivencia, el crecimiento, los componentes bioquímicos y el presupuesto de energía de *M. rosenbergii*, y encontraron que los mejores resultados se presentaron con la concentración del 2%.

Por su parte, Elsabagh *et al.* (2018), evaluaron el efecto de una mezcla probiótica de cepas de *Bacillus* a diferentes concentraciones (*Bacillus subtilis* 3.25×10^9 CFU g^{-1} , *Bacillus licheniformis* 3.50×10^9 CFU g^{-1} y *Bacillus pumilus* 3.25×10^9 CFU g^{-1} ; con un número total de 1.0×10^{10} UFC g^{-1}) en dietas para tilapia; al final del estudio observaron que en los dos tratamientos con probióticos las tilapias tuvieron un crecimiento superior al tratamiento control (sin adición de probióticos), por lo que los autores concluyeron que con la adición del probiótico comercial en el alimento, aporta grandes beneficios en el crecimiento, inmunidad y función intestinal, así como la calidad del agua durante el cultivo de la tilapia.

Si bien existen diferentes estudios en los que se ha demostrado la eficiencia del uso de probióticos en acuicultura, es importante considerar que la concentración del probiótico es un factor muy importante en la eficacia, por lo que es necesario establecer la concentración más adecuada para

los animales acuáticos como peces y crustáceos en cultivo (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto de diferentes concentraciones de probióticos en el cultivo de especies acuáticas.

Probiótico	Concentración	Especie cultivada	Resultado obtenido	Autor y año
<i>Bacillus subtilis</i>	1×10 ⁶ y 1×10 ⁸ UFC ml ⁻¹	<i>Penaeus monodon</i>	En un cultivo de camarones hubo una reducción de mortalidad de 90% al adicionar el probiótico después de haber sido expuestos a <i>V. harveyi</i> , demostrando que las dos concentraciones del probiótico controlaron la proliferación del patógeno. Lo que indicó que es una alternativa al uso de antibióticos.	Vaseeharan y Ramasamy (2003)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1×10 ⁷ , 1×10 ⁸ y 1×10 ⁹ UFC g ⁻¹	<i>M. rosenbergii</i>	Los langostinos de los tratamientos con probiótico tuvieron un crecimiento, así como eficiencia de la alimentación, composición bioquímica y respuesta inmune significativa en comparación con el control.	Dash <i>et al.</i> (2016)
<i>Lactobacillus delbrukei subsp. bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Citrobacter farmeri</i>	5×10 ⁷ UFC g ⁻¹	<i>O. mykiss</i>	Se observó que los probióticos <i>L. acidophilus</i> y <i>L. bulgaricus</i> mejoran el crecimiento de trucha en comparación con el grupo control (sin probiótico).	Mohammadian <i>et al.</i> (2019)
<i>Bacillus subtilis</i>	1×10 ⁸ UFC ml ⁻¹	<i>M. rosenbergii</i>	Al agregar el probiótico en un cultivo de larvas de langostino hubo un efecto significativo positivo en el crecimiento. Además, la supervivencia fue mayor en los grupos con probióticos (55.3% ± 1.02), comparado con el control (36.2% ± 5.02).	Keysami <i>et al.</i> (2007)

II.13.9 Normatividad en el uso de probióticos

El incremento de la producción acuícola nacional en calidad y cantidad implica un mejoramiento en los procesos de producción, lo que involucra a los aspectos ambientales, sociales y económicos, es decir, el desarrollo sostenible de la actividad (Cuellar-Lugo *et al.*, 2018). En este sentido, el desarrollo e implementación de probióticos en el mundo y de manera particular en México, es una realidad y representa una de las mejores opciones para optimizar la producción acuícola (Cienfuegos *et al.*, 2017).

No obstante, la funcionalidad y hasta ahora, inocuidad de esta biotecnología, involucra una investigación y aplicación responsable. En México, no existe, hasta ahora, un marco regulatorio sobre esta biotecnología, a pesar de ello, existe la Norma Oficial Mexicana NOM-061-ZOO-1999, dentro de la cual se menciona que, “para el caso de aditivos probióticos, elaborados con microorganismos productores de ácido láctico o similar, previo a su regulación, debe efectuarse su constatación para determinar el género y especie utilizada, así como especificar la concentración de microorganismos viables expresada en Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml) o gramo de producto terminado”.

Por lo anterior y siendo esto lo único especificado para el manejo de probióticos en México, hay mucho por hacer en el campo de la normatividad para la aplicación de aditivos probióticos en acuicultura para su correcta utilización sin que su aplicación genere un daño en el medio ambiente y las especies asociadas al cultivo. La aplicación de probióticos *per se* es muy importante, por lo que su adición debe acompañarse de la evaluación de su funcionalidad responsable, debido al impacto que se puede generar, por lo que se requiere que esta biotecnología tenga bases científicas que regulen su aplicación, sobre todo porque en algunos productos disponibles en el mercado, se desconoce las condiciones de almacenamiento, dosificación, y vida útil del producto, lo que en consecuencia puede provocar disminución de la funcionalidad de este (Villamil y Martínez, 2009; Ramírez-Torrez *et al.*, 2019).

II.14 Sistema biofloc

Además de las investigaciones dirigidas a establecer las ventajas de la adición de probióticos en acuicultura, se han realizado estudios para determinar sus beneficios en conjunto con otros sistemas o tecnologías sustentables que hagan frente a las problemáticas actuales de eficiencia energética y cuidado del medio ambiente, así como problemáticas de índole social y económico; en ese aspecto es que en la actualidad se mantiene un interés creciente por la tecnología “biofloc” (BFT en inglés), la cual consiste básicamente en un conjunto de flóculos microbianos compuestos de bacterias, rotíferos, nematodos, copépodos, microalgas, entre otros, estos se mantienen unidos en un sistema acuícola y se alimentan a partir de subproductos de la actividad y de la adición de carbono al cuerpo de agua (Avnimelech, 2012; Ballester *et al.*, 2017).

Para que se establezcan los flóculos se requiere una relación constante 20:1 es decir, 20 unidades de carbono por una unidad de nitrógeno; no obstante, las unidades de carbono pueden variar desde 10 a 20 unidades (Emerenciano *et al.*, 2013). Para ello se puede utilizar una fuente de carbono externa como: melaza, harina de arroz, café, moringa, tapioca, entre otras. Los microorganismos que se desarrollan en dicho sistema 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 (Wasiolesky *et al.*, 2006; Ballester *et al.*, 2010; Crab *et al.*, 2012).

El sistema biofloc se basa en un mínimo o cero recambio de agua, es decir, menos efectos negativos al ambiente y además como beneficio adicional, se produce proteína microbiana que puede utilizarse como alimento. De acuerdo con Emerenciano *et al.* (2011), esta tecnología se desarrolló en los años 70 por IFREMER-COP (French Research Institute for Exploitation of the Sea, Oceanic Center of Pacific) y se probó con diferentes especies entre las que destacan: *L. monodon*, *Fenneropenaeus merguensis* y *L. vannamei*.

II.14.1 Impacto del biofloc en la acuicultura

La intervención intensiva que generan las prácticas acuícolas va degradando el medio ambiente, primero por la utilización del agua debido a que recibe grandes cantidades de desechos, como el alimento no consumido por los peces, productos de excreción, materias fecales, químicos, hasta microorganismos patógenos como virus, bacterias, hongos y parásitos; segundo porque se introducen hormonas, antibióticos y sustancias químicas al ecosistema, usadas durante la actividad,

lo que tiene un costo ambiental, económico y social que en su mayoría puede ser negativo (Buschmann, 2007).

Una parte importante de los desechos acuícolas se va al fondo de los estanque 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 (Burford *et al.*, 2003; Wasielesky *et al.*, 2006; Crab *et al.*, 2007; Negrini *et al.*, 2017). Durante mucho tiempo, el método más común para eliminar o disminuir las cargas de metabolitos en el agua de cultivo ha sido la sustitución continua de agua, aunque el volumen de agua necesario, incluso para pequeños a medianos sistemas de acuicultura, puede ser de varios cientos de metros cúbicos por día, por lo que el agua se convierte en un factor limitante de la actividad (Borja, 2002).

En las empresas de acuicultura intensiva, el alimento es uno de los insumos más importantes y de mayor costo, debido a su relevancia para el éxito de la producción, sin embargo se tiene la desventaja que en muchos de los casos el 60% del alimento que se suministra no lo aprovechan los organismos porque no siempre cubren sus requerimientos nutrimentales y tienen baja digestibilidad (Emerenciano *et al.*, 2017), lo que ocasiona que los productores a baja escala 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 (Mendoza *et al.*, 2000). Como consecuencia, la producción se ha desarrollado basada en la industria de harina de pescado (Hargreaves, 2013).

Con el propósito de generar nuevas alternativas tecnológicas sustentables, que disminuyan los costos de producción acuícola derivados del uso de alimento balanceado, se considera la Tecnología de biofloc como una alternativa viable, ya que gracias a los flóculos microbianos que se desarrollan en el sistema mejoran la calidad del agua debido a la acción de las bacterias heterótrofas que oxidan el nitrógeno amoniacal (Emerenciano *et al.*, 2013). Los flóculos del biofloc son además alimento natural *in situ* disponible las 24 horas para los animales cultivados y por ende se reducen los costos de alimento comercial, lo que tiene un impacto positivo en la economía del productor. A su vez, ha aumentado la aplicación de la BFT debido a que, gracias a la acción probiótica de las bacterias presentes en el sistema y la exclusión de los microorganismos patógenos se tiene como consecuencia una mayor supervivencia de los animales cultivados y un óptimo crecimiento (Crab *et al.*, 2010).

II.14.2 Microbiota en biofloc

Las comunidades microbianas del biofloc están formadas por poblaciones de células de varias especies; que interactúan entre sí y desarrollan 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). Además, 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 pueden reducir en más del 25% (Monroy *et al.*, 2013).

Uno de los estudios más relevantes en el que se describe la microbiota del biofloc mediante secuenciación masiva es el de Deng *et al.* (2018), en el cual evaluaron el efecto de la adición de almidón de tapioca, celulosa y la combinación de los dos, sobre la diversidad microbiana del biofloc durante el cultivo de la carpa herbívora, lo anterior permitió observar que, sin importar la fuente de carbono adicionada al sistema de cultivo, los Phyla Proteobacteria y Bacteroidetes son los de mayor abundancia relativa, así mismo se reporta que las bacterias pertenecientes a este filo son ubicuas en ambientes acuáticos y sistemas de producción acuícola (Guo *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017).

También se ha demostrado que las Proteobacterias, se encuentran presentes comúnmente en sistema biofloc, y son el grupo microbiano encargado del proceso de reciclaje de nutrientes y en la mineralización de componentes orgánicos en sistemas acuáticos (Cardona *et al.*, 2016). Al respecto Martins *et al.* (2013), indican que las Proteobacterias comprenden varios géneros fotótrofos y heterótrofos con alta capacidad oxidativa de compuestos como el metano y metanol en ambientes acuáticos. Ju y Zhang (2015), mencionan que las Betaproteobacterias también encontradas comúnmente en biofloc, son un grupo de bacterias aeróbicas o facultativas encargadas de transformar los compuestos nitrogenados en los ecosistemas acuáticos y uno de los géneros más importantes de este grupo son *Nitrosomonas*, las cuales oxidan el amoníaco.

Las bacterias de las familias Pseudomonadaceae (Ndi y Barton, 2012), Caulobacteraceae (Gou *et al.*, 2011), Chitinophagaceae (Bartelme *et al.*, 2017), Sphingobacteriaceae (Bartie *et al.*, 2005), reportadas en sistemas con biofloc son bacterias eficientes para la transformación de diversos

compuestos dentro de la columna de agua como la celulosa, quitina, colágeno y los compuestos nitrogenados generados durante el cultivo (Cienfuegos *et al.*, 2018).

A pesar de la importancia que tienen las bacterias en el funcionamiento del tracto digestivo, son pocas las investigaciones en las que se ha evaluado la composición microbiana que se desarrolla en el agua de cultivo, así como en el intestino de las especies cultivadas, así mismo las publicaciones reportan la caracterización taxonómica únicamente a nivel de Phylum (González-de la Cruz *et al.*, 2011). Al respecto Tzeng *et al.* (2015), mediante un estudio de secuenciación masiva determinaron que el principal Phylum bacteriano en el intestino de *Macrobrachium nipponense* fue Proteobacteria, seguido de Firmicutes y Actinobacteria.

Por otro lado, Chen *et al.* (2017), observaron mediante la técnica de secuenciación masiva del agua e intestino de *M. nipponense* que, los cambios en el entorno pueden influir en la microbiota intestinal no solo al proporcionar microorganismos asociados al medio ambiente directamente, sino también al interferir indirectamente en la composición de las bacterias intestinales establecidas.

II.14.3 Beneficios generales del cultivo de peces y crustáceos en sistemas con biofloc

Además del uso de probióticos para peces y crustáceos se ha optado por la utilización de la BFT, sobre todo para el cultivo de tilapia y camarón, que son dos de las especies más cultivadas a nivel mundial y porque se desarrollan óptimamente en este sistema (Mansour y Esteban, 2017). Los resultados de producción y estado de salud de los organismos cultivados en biofloc son diversos y varían con relación en las condiciones en que se desarrolla y en la duración del estudio (Tabla 6).

Tabla 6. Beneficios obtenidos en peces y crustáceos en el sistema biofloc.

Espece	Días de experimentación	Resultados obtenidos	Autor y año
Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	90 días	En los tratamientos con BFT con cultivo de tilapia se determinó una producción neta 45% más alta que en el sistema convencional.	Azim y Little (2008)
Camarón (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	60 días	En el sistema biofloc con cultivo de camarón se mostró un mayor rendimiento del crecimiento. Además de que hubo un aumento significativo del 4% en la resistencia contra <i>Vibrio harveyi</i> .	Lee <i>et al.</i> (2017)
Carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)	30 días	En un cultivo de carpa en biofloc se observó mayor crecimiento al ser alimentadas con el 75% de dieta comercial. Además, el grupo control (sin biofloc) fue el grupo con mayor mortalidad (64.2%).	Najdegerami <i>et al.</i> (2016)
Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	145 días	En un cultivo de tilapia en biofloc se observó que los compuestos nitrogenados con los niveles más bajos fueron los tratamientos con azúcar como fuente de carbono externa en comparación con la melaza líquida, en polvo y el grupo control (sin biofloc).	Rodrigues <i>et al.</i> (2018)
Camarón (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	90 días	En un estudio con cultivo de camarón en biofloc, se redujeron las concentraciones de amoníaco total, nitritos y nitratos. Como resultado el sistema se encontraba estable y por ende se obtuvo una supervivencia arriba del 80%.	Kumar <i>et al.</i> (2016)

II.14.3.1 Impacto del biofloc en la calidad del agua

Comparando con los sistemas de producción convencionales usados en la acuicultura, la Tecnología biofloc proporciona una alternativa más económica para los productores ya que se disminuyen los costos de tratamiento de agua. Lo anterior debido a que en cultivos convencionales el funcionamiento normal de los estanques se basa en el intercambio de agua (por lo general un 10 % por día) como método para controlar la calidad del agua (Hernández *et al.*, 2019). En contraste con lo anterior, el sistema biofloc puede operar con un bajo intercambio de agua con tasas de 0.5 a 1% por día o cero recambios de agua, mientras la concentración de oxígeno sea igual o superior a 4.0 mg L⁻¹ para mantener en suspensión a los flóculos (Crab *et al.*, 2009).

En cuanto al mantenimiento de la calidad del agua, los parámetros químicos están regulados por la comunidad bacteriana que se establece a través de una relación carbono-nitrógeno (C:N), la cual se logra agregando una fuente de carbono con el principal objetivo de garantizar la proliferación de las bacterias heterótrofas, las cuales transforman los compuestos nitrogenados como el amoníaco en compuestos más simples y que no son dañinos para los animales en cultivo (Samocho *et al.*, 2007; Asaduzzaman *et al.*, 2010) (Tabla 7).

Tabla 7. Beneficios obtenidos en la calidad del agua en cultivo de peces y crustáceos en sistema biofloc.

Especie cultivada	Días del experimento	Resultados en calidad del agua	Año y autor
<i>Litopenaeus vannamei</i>	28 días	En un cultivo de camarón en biofloc se observó que a salinidades de 25 y 35 g L ⁻¹ , se registraron mayores concentraciones de alcalinidad, así como mayor volumen de flóculos además de principales iones (Cl, Na, Mg, Ca, K) y alta concentración de nitratos. Respecto a las salinidades de 2 a 4 g L ⁻¹ , se registró un aumento en la concentración de nitritos y amonio, lo cual ocasionó una alta mortalidad del camarón.	Esparza-Leal <i>et al.</i> (2016)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	30 días	Durante el estudio de camarón en biofloc se evaluaron parámetros de calidad de agua, teniendo como resultado que el amonio total, nitrito y nitrato estuvieron dentro del intervalo óptimo en los dos tratamientos con la adición de la fuente de carbono.	Suita <i>et al.</i> (2015)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	21 días	En cultivo de camarón con biofloc, las concentraciones de TAN y N-NO ₂ , fueron más bajas ($p < 0.5$) comparados con el control. Además de que se obtuvo mayor peso final individual, un aumento en la biomasa y una tasa de conversión de proteínas para los tratamientos con biofloc en comparación con el control.	Luis-Villaseñor <i>et al.</i> (2015)
<i>Oreochromis sp.</i>	105 días	Al cultivar tilapia en biofloc, se observó que la calidad del agua fue mayor con biofloc. Se pudo mantener en el agua de cultivo valores de pH de 7.5 y la concentración de amoníaco fue inferior a 1.1 mg L ⁻¹ .	Widanarn y Mayram (2012)

II.14.3.2 Crecimiento de peces y crustáceos con sistema biofloc

Las investigaciones en las que se ha evaluado el cultivo de peces y crustáceos en sistema biofloc se centran en obtener las bases biotecnológicas para lograr una adecuada producción y además un mayor crecimiento en los animales (Emerenciano *et al.*, 2017). Al respecto Hapsari (2016), evaluó un cultivo de juveniles de *Clarias gariepinus* en un sistema convencional en comparación con dos tratamientos, con biofloc y con el probiótico (*Bacillus* sp.). Los resultados fueron alentadores debido a que los tratamientos con biofloc y probióticos generaron 30% más de crecimiento en comparación con el control.

Por otro lado, y además de un incremento en el crecimiento, se reporta que durante el cultivo de langostinos en biofloc se puede incrementar la densidad y con ello la producción; al respecto Negrini *et al.* (2017), evaluaron diferentes densidades de cultivo durante la producción de juveniles de *M. rosenbergii* en un sistema biofloc durante 60 días. Al final del estudio observaron que los langostinos que se mantuvieron a una densidad de 50/ m² tuvieron la mayor supervivencia ($p < 0.05$) (73%) en comparación con los de mayor densidad (100, 150, 200 y 250). Lo anterior indica que efectivamente con el biofloc se puede incrementar la densidad del cultivo de los langostinos en comparación con la densidad tradicional de 10 ind/m².

Una estrategia para incrementar la eficiencia de los sistemas de biofloc, es la de incrementar la densidad de bacterias benéficas durante el cultivo, por lo cual en años recientes se ha evaluado la eficiencia de bacterias probióticas durante el cultivo de especies acuáticas. Al respecto Aguilera-Rivera *et al.* (2014), adicionaron *Lactobacillus* spp. A un sistema de cultivo de camarón (*L. vannamei*) con biofloc y observaron que la incorporación del *Lactobacillus* promovió un mayor crecimiento del camarón en comparación con el sistema convencional, además de un incremento de la respuesta inmune del camarón, al observar una disminución y control de diversas lesiones que tenía el camarón causadas por bacterias del género *Vibrio*.

Por su parte Luo *et al.* (2014), compararon el crecimiento en un estudio con cultivo de Tilapia en biofloc y en un sistema de recirculación, teniendo como resultado un mayor crecimiento mayor en biofloc, ya que se obtuvo una ganancia de peso total de 36.95 y 28.87 (kg m⁻³) respectivamente, este aumento fue debido al alimento natural *in situ* que se desarrolla en los flóculos y los cuales son altos en proteína.

II.14.3.3 Reducción del alimento

La expansión masiva de la acuicultura en las últimas décadas ha comenzado a hacer frente a algunas limitaciones importantes, como es el aumento de los precios de la harina de pescado, que es la principal materia prima para la fabricación de las dietas acuícolas, aunque la presión causada por la sobrepesca en las poblaciones naturales puede disminuir el crecimiento de la acuicultura futura (Hua *et al.*, 2019). En ese sentido se reporta que el volumen de harina de pescado usado para la alimentación de animales se incrementó durante el 2006 de 23 mil a 78 mil toneladas y en la actualidad el volumen de harina y aceite de pescado destinado para acuicultura es de 15 millones de toneladas (FAO, 2018), lo anterior es precisamente la razón por la que se desarrollan diversas investigaciones para obtener fuentes alternativas de proteínas para sustituir el uso de las harinas de pescado en la acuicultura (Crab *et al.*, 2012; Avnimelech, 2012), además de optimizar las biotecnologías de cultivo para que la alimentación de los organismos sea eficiente y sostenible como la tecnología de cultivos en biofloc y técnicas de alimentación amigables con el entorno como el uso de probióticos.

La Tecnología de biofloc es una herramienta promisorio para el desarrollo de la acuicultura sustentable y eficiente, debido a 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 (Fimbres 2015). Con lo anterior se puede incrementar la tasa de crecimiento de los organismos en un 10 a 20%, con la consecuente reducción de costos de alimentación que puede variar desde 10% hasta el 50 % (Azim *et al.*, 2008; Poleo *et al.*, 2011; Hargreaves, 2013).

Por otro lado, la calidad nutricional de biofloc puede variar debido a factores como la densidad, iluminación y biomasa en el sistema, pero en general se considera que es buena para el cultivo de organismos acuáticos ya que el contenido de proteína puede ser de 25 a 50% y el contenido de grasa oscila del 0.5 a 15 % (Emerenciano *et al.*, 2013). Una gran ventaja de especies como la tilapia o el langostino es que tiene la capacidad de aprovechar los flóculos presentes en un cultivo de biofloc, contribuyendo con casi el 50% de su requerimiento de proteína lo que la hace una especie idónea para sistemas en biofloc (Avnimelech, 2007).

II.14.3.4 Control de microorganismos patógenos con el uso del biofloc

Las enfermedades infecciosas son la causa mayoritaria de numerosas pérdidas económicas en acuicultura, las cuales pueden causar mortalidades superiores al 90% en granjas (Fernández-Alonso *et al.*, 2001); por lo que, en determinadas circunstancias, los antibióticos pueden proporcionar un medio útil para ayudar a controlar algunas enfermedades bacterianas, sin embargo, hay muchos problemas asociados con su uso, como es la aplicación inadecuada de antibióticos lo que ha dado lugar al desarrollo de resistencia bacteriana y por lo tanto patologías más difíciles de erradicar (Tendencia *et al.*, 2001) . Como consecuencia, existe una necesidad urgente de técnicas de control alternativo más sostenibles (Defoirdt *et al.*, 2007).

La Tecnología biofloc se considera una nueva estrategia para el control de patógenos, en contraste con los enfoques convencionales, ya que durante el cultivo parece presentarse un efecto de exclusión competitiva entre las bacterias probióticas presentes en el biofloc frente a otros grupos microbianos, gracias a que secretan una gran variedad de exoenzimas y polímeros que generan un ambiente hostil a bacterias, sobre todo patógenas (Monroy *et al.*, 2015).

Las bacterias probióticas que se establecen en el biofloc son provenientes de las heces que liberan los organismos en cultivo (peces y crustáceos) y que contienen parte de la microbiota intestinal, la cual 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 supervivencia y crecimiento de las especies cultivadas, así mismo un incremento en la respuesta inmune en contra de los procesos infecciosos (Kumar *et al.*, 2013).

Durante la evaluación, Maya *et al.* (2016), identificaron bacterias con potencial probiótico en un sistema con biofloc, entre las que destacaron las pertenecientes a géneros como *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Saccharomyces* entre los más importantes, lo que indica que en el sistema se puede observar la presencia de microorganismos con potencial probiótico provenientes del tracto intestinal de las especies en cultivo y permanecer en el agua, posiblemente debido a su presencia en las heces.

II.14.4 Uso de sistema biofloc con la adición de probióticos

La tecnología biofloc ha mostrado ser un sistema sustentable el cual hace frente a diversas problemáticas de suma importancia en estos tiempos. Asimismo, se ha buscado e implementado la adición de probióticos en biofloc, esto con el objetivo de mejorar los cultivos y la producción de organismos acuáticos (Mujeeb *et al.*, 2017). En conjunto la tecnología de biofloc y aplicación de probióticos en acuicultura puede traer ventajas productivas, que varían debido a la especie en cultivo y probióticos usados (Tabla 8).

Tabla 8. Resumen de investigaciones que describen el efecto de la adición de probióticos en un sistema biofloc en determinado tiempo en un cultivo de peces o crustáceos.

Autor(es) y año	Especie estudiada	Probiótico utilizado	Resultado
Hu <i>et al.</i> (2017)	<i>Litopenaeus vannamei</i>	<i>Bacillus</i>	Determinaron que el uso del probiótico con la adición de melaza puede inhibir patógenos al promover la proliferación de bacterias benéficas.
Miao <i>et al.</i> (2017)	<i>M. rosenbergii</i>	<i>Bacillus subtilis</i> y <i>Lactobacillus</i>	Mejoraron la inmunidad humoral del camarón con el uso de probióticos en biofloc.
Kim <i>et al.</i> (2015)	<i>Fennerpenaus chinensis</i>	<i>Bacillus sp.</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> y <i>Rhodobacter sp.</i>	Se incrementó el crecimiento del camarón y la respuesta inmune en distintas concentraciones (60, 80, 100, 120, y 140%).
Ferreira <i>et al.</i> (2017)	<i>Litopenaeus vannamei</i>	<i>Bacillus subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>	Se mostró que las bacterias provenientes del biofloc, controlaron la proliferación de <i>Vibrio</i> y no las bacterias probióticas añadidas, ya que no hubo diferencia significativa de los tratamientos respecto al control.
Aly <i>et al.</i> (2008)	<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> y <i>Lactobacillus acidophilus</i>	El porcentaje de supervivencia y el peso de los peces fueron mayores en los tratamientos con probióticos y biofloc.

II.14.5 Perspectivas en el sistema biofloc

Uno de los principales retos a resolver en los sistemas biofloc es el desarrollo de investigaciones sobre el microbioma, así como las variaciones que se dan por la incorporación de distintas fuentes de carbono, por la diversidad de especies cultivadas y las variaciones ambientales que hay entre los diferentes cultivos de peces y crustáceos (Cienfuegos *et al.*, 2018).

Lo anterior brindará una mejor comprensión y por lo tanto la factibilidad de su aplicación y aprovechamiento con la finalidad de mejorar la producción acuícola aportando y resolviendo las necesidades de los productores. Además, es importante considerar la normatividad del uso de esta Tecnología, ya que no hay regulación alguna sobre la utilización de la BFT, lo cual es necesario, debido a que, durante los cultivos acuícolas se producen animales que se usan para consumo humano (Emerenciano *et al.*, 2013).

II.14.6 Normatividad del uso del sistema biofloc

Para el correcto uso del biofloc se emplean diversos manuales como el de Avnimelech (2012), en el cual menciona como se desarrolla este sistema a partir de una adecuada relación de carbono proveniente de una fuente externa y nitrógeno, así como los intervalos óptimos en que se deben mantener los parámetros de calidad de agua para la proliferación de microorganismos y para una adecuada producción de animales en cultivo.

A pesar de lo anterior, no existe una Norma Oficial Mexicana que haga mención del uso, aplicación y productos de los sistemas de biofloc. Lo anterior es un tema de suma importancia, ya que los animales que comúnmente se cultivan en este sistema se consumen por el humano, como lo es la tilapia del Nilo y el camarón (FAO, 2018). Por lo tanto es importante la creación y aplicación de una norma que indique y regule el manejo adecuado de la Tecnología biofloc, en la que se incluyan por ejemplo, las especies que se pueden cultivar en este sistema, las fuentes de carbono viables a utilizar, las relaciones C: N más eficientes en relación con las condiciones de cultivo y especie, parámetros de calidad del agua, manejo de residuos del sistema, así como el manejo de los animales, así como las densidades óptimas específicas para este tipo de sistema (Avnimelech, 2009; Beardsley *et al.*, 2011).

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo influye la adición del probiótico *Lactococcus lactis* a una concentración de 1×10^7 UFC ml⁻¹ en la diversidad y abundancia de la comunidad microbiana en el agua e intestino del langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) cultivados con la tecnología de biofloc?

HIPÓTESIS

La adición del probiótico *Lactococcus lactis* a una concentración de 1×10^7 UFC ml⁻¹, aumentará la diversidad y abundancia de las clases bacterianas en agua e intestino del langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) cultivado en biofloc.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del probiótico *Lactococcus lactis* en la composición microbiana en agua e intestino del langostino (*Macrobrachium rosenbergii*), así como su supervivencia y crecimiento durante su cultivo con biofloc.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar las comunidades microbianas en el agua e intestino de *Macrobrachium rosenbergii* en cultivo biofloc al agregar el probiótico *Lactococcus lactis* a una concentración de 1×10^7 UFC ml⁻¹.
2. Comparar a las comunidades microbianas del agua e intestino de *Macrobrachium rosenbergii* en cultivo biofloc.
3. Evaluar la supervivencia y el crecimiento de *Macrobrachium rosenbergii* en los diferentes tratamientos a lo largo del experimento.
4. Evaluar la calidad del agua y sólidos sedimentables del agua en los tratamientos.

Capítulo III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Obtención de los langostinos para el estudio

Para el estudio se usaron 240 post larvas de langostinos (*M. rosenbergii*) en estadio VII (PLVII), que se produjeron en el Laboratorio de cultivos de crustáceos nativos del Instituto Tecnológico de Boca del Río Veracruz (ITBOCA), México.

Las PLVII fueron trasladadas en bolsas plásticas al Laboratorio de Análisis Químico de Alimento Vivo del Departamento del Hombre y su Ambiente en la UAM Xochimilco, México, en donde se mantuvieron durante 15 días en un sistema controlado de cultivo, bajo observación y aisladas de otros individuos para verificar su estado de salud, a partir de la observación de posibles signos o lesiones que indicaran algún proceso infeccioso (Figura 5).



Fig. 5 Postlarvas de langostinos (*Macrobrachium rosenbergii*)

Durante la aclimatación y el periodo experimental, las postlarvas fueron alimentadas dos veces al día (8 y 17 h), con un alimento comercial para camarón (El Pedregal, Silver Cup) con 40% de proteína cruda, 4% de fibra, 8% de lípidos y un tamaño de partícula de 1.4 mm. Al inicio del estudio, a los organismos se les proporcionó una ración equivalente al 7% de la biomasa y posteriormente se ajustó en relación con el incremento de la biomasa y el consumo, llegando al final a 3% del peso vivo.

III.2 Diseño de las unidades experimentales

Se utilizó un sistema experimental abierto de 12 contenedores rectangulares de plástico de 250 L de capacidad (61 cm x 41 cm x 100 cm) y aireación constante las 24 horas, mediante una bomba (Emerenciano *et al.*, 2012) para mantener una adecuada mezcla de la columna del agua para la floculación del biofloc y el oxígeno en intervalos adecuados para los organismos (2-5 ppm). En cada unidad experimental se colocaron 20 postlarvas por contenedor (PL's. / contenedor) y cinco secciones de tubo pvc de 15 cm de largo por seis cm de diámetro para que los langostinos lo usaran como protección y evitar canibalismo. Se mantuvo la temperatura constante del agua a 28°C, en las unidades experimentales mediante un calentador sumergible de 120 W con termostato (Lomas Thermo Jet) por unidad experimental, así mismo se mantuvo un fotoperiodo de 12 horas luz : 12 horas oscuridad (Seenivasan *et al.*, 2012).

III.3 Diseño experimental

Durante los 127 días que se llevó a cabo el estudio a partir de un diseño experimental completamente al azar con cuatro tratamientos que fueron: 1) tratamiento de cultivo con biofloc (**BFT**); 2) tratamiento con biofloc más la adición de dos dosis (dos tubos Eppendorf de 1 ml cada uno) de *Lactococcus lactis* a una concentración de 1×10^7 UFC ml^{-1} a través de un bioencapsulante (*Artemia*) (**BFTPROB**); 3) tratamiento con la adición de dos dosis del probiótico (dos tubos Eppendorf) *L. lactis* a la misma concentración mencionada (**PROB**) utilizando *Artemia* como bioencapsulante; 4) tratamiento control (agua clara) (**CONT**). Cada tratamiento se realizó con tres réplicas y 20 PL por réplica (Figura 6).

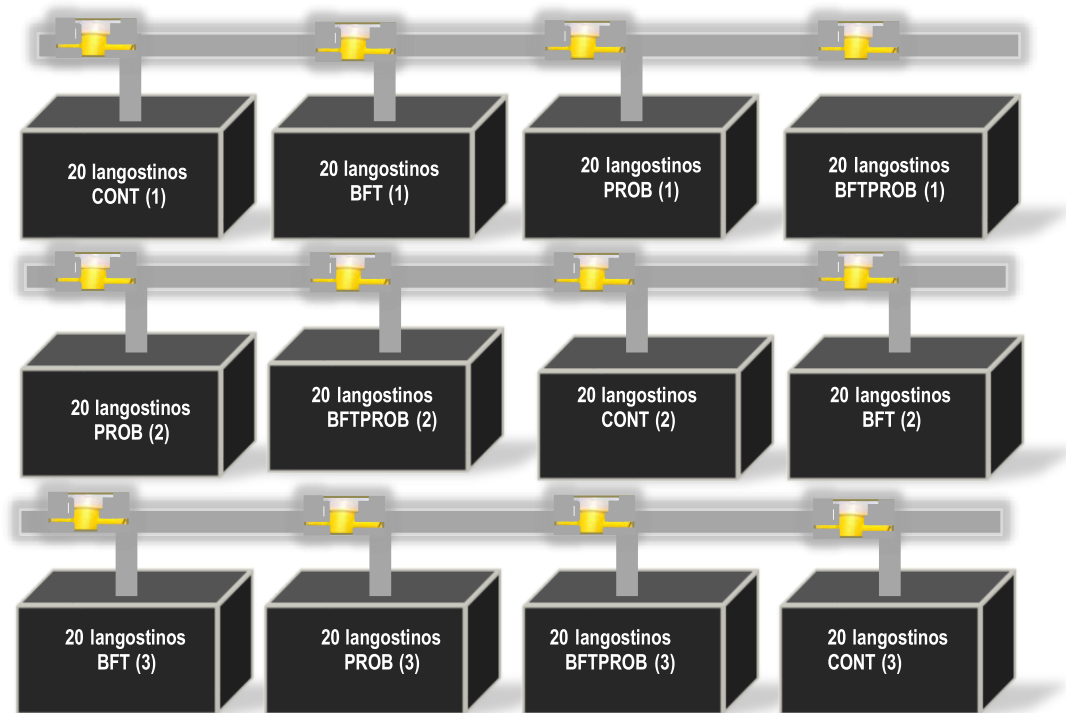


Fig. 6 Distribución de los cuatro tratamientos experimentales durante el estudio

III.4 Cepa probiótica y bioencapsulado

La cepa probiótica (*L. lactis*) que se usó durante la evaluación del crecimiento con las postlarvas de langostinos fue aislada del intestino de la trucha *Oncorhynchus mykiss* y por medio de varias pruebas como la actividad hemolítica, resistencia a pH ácido, prueba de adhesión, resistencia a sales biliares y la identificación mediante la secuenciación del gen 16S del ARNr. Posterior a las pruebas mencionadas, se clasificó con potencial probiótico y se almacenó en el cepario del Laboratorio de Análisis Químico de Alimento Vivo de la UAM Xochimilco.

Para obtener la concentración del probiótico requerido, se procedió a su cultivo a partir de su inoculación en 100 ml de caldo BHI y se incubó a 27°C hasta que alcanzó una concentración bacteriana de 1×10^8 UFC ml⁻¹, que fue determinada con el conteo en cámara de Neubauer improved bright-line LHABO® (Sánchez-Ortiz *et al.*, 2015). Previa la incorporación del probiótico *L. lactis* al sistema experimental (tratamiento BFTPROB y PROB) se bioencapsuló mediante su incorporación en agua de cultivo con *Artemia salina*, para lo cual se descapsularon 10 g de quistes de *A. salina*.

La *Artemia* se obtuvo al ser hidratada durante una hora con agua dulce y suministro de aire continuo. Transcurrido este tiempo, los quistes se tamizaron con una malla de 200 μm y se colocaron en una solución de 250 ml de Hipoclorito de Sodio (NaClO) mezclado con 250 ml de agua salina (200 g L^{-1}). Los quistes fueron pasando de una coloración café oscura a naranja.

Los embriones decapsulados se colectaron en un tamiz y se enjuagaron con agua dulce y 100 ml de una solución de Tiosulfato de Sodio ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$) (12 g L^{-1}) para eliminar el exceso de cloro. Para su eclosión, los embriones se colocaron en un embudo de 4 L de capacidad con 3 L de agua a 40 g L^{-1} de salinidad, a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, un pH de 8, aireación y luz continua durante 24 horas. Las larvas libres nadadoras llamadas nauplios se colectaron por sifoneo y se colocaron en un cilindro de plástico de 200 L de capacidad con 160 L de agua salada a 80 g L^{-1} de concentración. 48 horas después de la eclosión se llevó a cabo el procedimiento de bioencapsulación siguiendo el método propuesta por Gelabert (2001).

Considerando el 7% de la biomasa total de los langostinos por tratamiento, a la *Artemia* se le añadió dos tubos Eppendorf de 1 ml de la bacteria probiótica a una concentración de 1×10^7 UFC ml^{-1} por un lapso de 30 minutos en un agitador magnético para asegurar que las células y partículas se distribuyeran en 200 ml agua salina. Posterior a este tiempo se verificó que el tracto digestivo de *Artemia* estuviera lleno de la bacteria mediante la ayuda de un microscopio estereoscópico (Olympus-zx 12), para proceder a alimentar a los langostinos considerando 34 nauplios de *Artemia* para cada langostino y considerando la pérdida por el orden de magnitud la concentración final fue de 1×10^7 UFC ml^{-1} (Vázquez-Silva *et al.*, 2017).

III.5 Preparación de los sistemas de cultivo con biofloc y mantenimiento

Para promover la generación de bioflóculos directamente en los sistemas, se procedió a llenar las tinajas con agua potable y libre de cloro, al 50% de su capacidad y posteriormente se agregó melaza como fuente de carbono (3% respecto a la biomasa de los langostinos). Después de 15 días se observó la presencia de bioflóculos a simple vista y un cambio de coloración del agua, color marrón (Hernández-Mancipe *et al.* 2019), además se tomó una muestra de 1ml del agua para revisarla con microscopio óptico (40X) para corroborar la presencia de microorganismos como rotíferos, copépodos y cianobacterias; además se dio un seguimiento permanente *in situ* en los tratamientos con biofloc, para verificar el desarrollo de las comunidades microbianas en el sistema de cultivo en biofloc; para lo cual diariamente y durante el estudio, se agregó melaza como fuente de carbono a las unidades experimentales con biofloc, tratando de mantener una relación C:N 20:1 y una

concentración de sólidos sedimentables igual o menor a 15 mg/L (Avnimelech, 2012), lo anterior a partir del cálculo de la concentración de nitrógeno proveniente del alimento comercial y su aprovechamiento, además de los productos metabólicos derivados de la alimentación de los langostinos, para el presente trabajo se consideró el 0.1% de la biomasa del cultivo (Emerenciano *et al.*, 2011).

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

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

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

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

Durante el estudio se hicieron recambios de agua del 80% en el sistema convencional (CONT) cada tercer día, mientras que en el tratamiento con probiótico se recambió el agua en un 40% dos veces por semana para controlar las condiciones ambientales, mientras que en los tratamientos con biofloc y biofloc más probióticos solo se recuperó el agua que se evaporó (Avnimelech, 2012).

Cada 15 días se determinó el número total de individuos por tratamiento y réplica para determinar la supervivencia (Seenivasan *et al.*, 2015).

$$\% \text{ Supervivencia} = (\text{N}^\circ \text{ final de langostinos vivos} / \text{N}^\circ \text{ inicial de langostinos vivos}) \times 100$$

III.6 Biometrías y ajuste de la ración alimenticia

En la fase inicial, intermedia y final se pesaron y midieron los langostinos para determinar el crecimiento individual, para lo cual se sacaron a cinco organismos de cada unidad experimental y después de eliminar el exceso de humedad con una toalla de papel (King, 1994), se determinó el peso ganado individual (g) con una balanza Adventurer TM Pro OHAUS (precisión de 0.01g) (Hendrickx, 1995); y la longitud total, considerando la medida desde la punta del rostrum hasta la punta del telson con un vernier Scala con 0.1 cm de precisión y de acuerdo con el incremento de biomasa se ajustó la ración alimenticia proporcionada a los langostinos (Figura 7).



Figura 7. Ejemplar macho de langostino malayo, durante la biometría de seguimiento experimental.

Asimismo, se determinó la tasa de crecimiento específica (TCE) con la siguiente fórmula (Wee *et al.*, 2018):

$$\text{TCE (\%/día}^{-1}\text{)} = ((\ln \text{PF} - \ln \text{PI}) / t) \times 100$$

dónde: PI y PF son el peso húmedo y la longitud total al inicio (I) y al final (F) del período experimental, t es la duración en días, ln PI y ln PF son el logaritmo natural del peso y de la longitud total al inicio y al final de la fase de crecimiento.

III.7 Parámetros de calidad del agua y sólidos sedimentables

Durante el estudio se registraron semanalmente los siguientes parámetros de calidad de agua de las unidades experimentales: la temperatura del agua (°C), el pH y el oxígeno disuelto (OD, ppm) que se determinaron con una sonda multiparamétrica (HANNA HI 9829). La concentración de nitrito (N-Nitrito mg/L), nitrato (N-Nitrato mg/L) y Nitrógeno Amoniacal Total (TAN mg/L) se determinó con un autoanalizador HANNA Aquaculture Photometer (HI83203) de acuerdo con los métodos estándar de HANNA (HANNA Company, 2003) (Luis-Villaseñor *et al.*, 2016). Además de lo anterior, semanalmente se evaluó la densidad de flóculos o sólidos sedimentables en las unidades experimentales correspondientes, para lo cual se colectó 1L de agua proveniente de las unidades experimentales, la cual se agregó a un cono Imhoff y se dejó sedimentar durante 15 a 20 min, para posteriormente determinar el volumen de material sedimentado (mg/L), con lo que se estableció la concentración de sólidos sedimentables (Avnimelech, 2009; Avnimelech, 2012; Severiche, 2013).

III.8 Análisis estadístico

Al final del estudio con los resultados obtenidos se realizó estadística descriptiva y se obtuvo la media, desviación estándar y varianza, posteriormente los resultados de las variables (supervivencia, crecimiento y parámetros de calidad del agua) de los tratamientos (BFT, PROB, BFTPROB y CONT) se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía para un modelo completamente al azar multifactorial ($p < 0.05$) y las diferencias significativas se determinaron a partir de una prueba de comparación de medias de Tukey con el software de análisis de datos JMP® considerando un valor de $p < 0.05$.

III.9 Extracción de ADN de la comunidad bacteriana en biofloc

III.9.1 Extracción del ADN del agua

Con el propósito de conocer la diversidad biológica de las bacterias presentes en el biofloc, en la fase inicial, intermedia y final del estudio nutricional con los langostinos (día 1, 63 y 127), se tomó una muestra de 1L de agua de cada unidad experimental en frascos de 1L de capacidad previamente esterilizados. Las muestras se llevaron al Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular, donde se procedió a centrifugar las muestras individualmente en tubos cónicos de 50 ml para obtener pellets del material floculante concentrado. El pellet se colocó en un microtubo de 2 ml para posteriormente proceder a la extracción del ADN a través del Kit ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep ZYMO RESEARCH de la siguiente manera (Deng, 2022):

1. Se agregó la muestra al tubo de lisis ZR BashingBead™ (0.1 & 0.5 mm). Posteriormente se agregaron 750 μ l de solución de lisis ZymoBIOMICSTM al tubo.
2. Se colocó la muestra en un equipo mini Bead Beater-Plus™ a 2500 rpm durante un minuto, enfriando por 20 segundos en hielo, la homogenización se repitió cinco veces.
3. Se centrifugó el tubo de lisis ZR BashingBead™ (0.1 & 0.5 mm) en una microcentrífuga (Thermo Scientific Sorvall™ ST) a 10,000 x g durante un minuto.
4. Se transfirieron 400 μ l del supernadante al filtro Zymo-Spin™ III-F colocando un tubo de colección y posteriormente se centrifugó a 8,000 x g durante un minuto. Se descartó el filtro Zymo-Spin™ III-F.

5. Se agregaron 1,200 μl del Buffer ZymoBIOMICSTM DNA Binding al filtrado en el tubo de colección del paso 4 y se mezcló bien en un vortex (Turbo mixer marca UNICO).
6. Se transfirieron 800 μl de la mezcla del paso 5 a la columna Zymo-SpinTM IICR en un tubo de colección y se centrifugó a 10,000 x g durante un minuto.
7. Se descartó el contenido del tubo de colección y se repitió el paso 6.
8. Se agregaron 400 μl del Buffer 1 ZymoBIOMICSTM DNA Wash a la columna Zymo-SpinTM IICR con un tubo de colección nuevo y se centrifugó a 10,000 x g durante un minuto. Se descartó el contenido del tubo.
9. Se agregaron 700 μl del Buffer 2 ZymoBIOMICSTM DNA Wash a la columna Zymo-SpinTM IICR en un tubo de colección y centrifugar a 10,000 x g durante un minuto. Se descartó el contenido del tubo.
10. Se agregaron 200 μl del Buffer 2 ZymoBIOMICSTM DNA Wash a la columna Zymo-SpinTM IICR con un tubo de colección y se centrifugó a 10,000 x g durante un minuto.
11. Se transfirió la columna Zymo-SpinTM IICR a un tubo nuevo de microcentrífuga de 1.5 ml y se agregaron 100 μl de agua libre DNase/RNase ZymoBIOMICSTM, directamente a la columna matriz y se incubó durante un minuto para eluir el DNA.
12. Se colocó el filtro Zymo-SpinTM III-HRC en un nuevo tubo de colección y se agregaron 600 μl de la solución ZymoBIOMICSTM HRC, después se centrifugó a 8,000 x g durante tres minutos.
13. Se transfirió el ADN eluido (paso 11) en un filtro Zymo-SpinTM III-HRC en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se centrifugó a 8,000 x g durante tres minutos.

Una vez extraído el ADN, se determinó su concentración con un Bio-fotómetro marca Eppendorf modelo D30. La calidad de la extracción del ADN genómico se determinó en un gel de agarosa al 1% (Thakuria *et al.*, 2008).

III.9.2 Extracción del ADN del intestino de los langostinos

En la fase final (día 127) del estudio se procedió a sacrificar cinco langostinos por tratamiento para obtener el intestino y posteriormente hacer la extracción del ADN, para lo cual los langostinos fueron sacrificados mediante su inmersión en agua limpia con 400 ppm de eugenol (componentes activos del aceite de clavo) para propiciar su muerte sin sufrimiento; posteriormente en condiciones

estériles, se disectaron y se extrajo un cm del intestino posterior por individuo y tratamiento, los cuales se colocaron en un microtubo de 2 ml para la posterior extracción del ADN a través del Kit ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep, método descrito previamente (Deng, 2022). La concentración del ADN se determinó con un Bio-fotómetro Eppendorf, mientras que la calidad de la extracción del ADN genómico se detectó con un gel de agarosa al 1% (Thakuria *et al.*, 2008).

III.10 Secuenciación masiva por Illumina

Para realizar la secuenciación masiva del gen 16S ARNr de la región V3 y V4, las muestras de agua e intestino se colocaron en una hielera y se enviaron al Integrated Microbiome Resource (IMR) en Nueva Escocia, Canadá donde se analizaron 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 ARNr 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 realizó 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).

III.11 Análisis Bioinformático

Los análisis bioinformáticos se realizaron utilizando MOTHUR, versión 1.45.2, siguiendo el SOP de MiSeq (Schloss *et al.*, 2009). Las lecturas seleccionadas cumplieron 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) para evitar números de OTU's altos, 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- S.

Capítulo IV. RESULTADOS

IV.1 Supervivencia y crecimiento del langostino (*M. rosenbergii*) durante el estudio

La supervivencia de los langostinos fue significativamente ($p < 0.05$) mayor en los tratamientos BFT y BFTPROB, con 100%, mientras que los organismos cultivados en PROB fue de $93 \pm 1.3 \%$ y para el control fue de $80 \pm 4.1 \%$. El crecimiento fue significativamente mayor en los tratamientos PROB ($6.3 \pm 1.6 \text{ g}$) y BFTPROB ($6.8 \pm 1.3 \text{ g}$), en el tratamiento BFT hubo un peso final de ($5.6 \pm 1.5 \text{ g}$) en contraste con el control que tuvo el crecimiento más bajo ($4.1 \pm 1.5 \text{ g}$) (Tabla 9).

Tabla 9. Supervivencia y parámetros de crecimiento \pm Desviación Estándar de langostinos malayos (*M. rosenbergii*) durante 127 días en sistema biofloc y con probióticos añadidos

	CONT	BFT	PROB	BFTPROB
Supervivencia (%)	80 ± 4.1^c	100 ± 0^a	93 ± 1.3^b	100 ± 0^a
Peso promedio inicial (g)	0.1 ± 0	0.1 ± 0	0.1 ± 0	0.1 ± 0
Peso promedio intermedio (g)	0.5 ± 0.1^c	1.9 ± 0.2^b	1.5 ± 0^b	2.1 ± 0^a
Peso promedio final (g)	4.1 ± 1.5^c	5.6 ± 1.5^b	6.3 ± 1.6^a	6.8 ± 1.3^a
TCE (%/día)	2.8 ± 0.8^a	3.1 ± 0.8^b	3.2 ± 0.5^b	3.3 ± 0.7^c
Longitud inicial (cm)	1.4 ± 0.2	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.6 ± 0.2
Longitud intermedia (cm)	3.2 ± 0.2^b	4.5 ± 0.3^{ab}	4.1 ± 0.4^a	3.8 ± 0.1^{ab}
Longitud final (cm)	3.8 ± 0.6^b	6 ± 1^a	5.8 ± 0.7^a	6.5 ± 0.8^a

Dentro de las filas, las letras en superíndice indican diferencias significativas ($p < 0.05$).
TCE= Tasa de Crecimiento Específica

IV.2 Calidad del agua

La temperatura durante el periodo de cultivo de 127 días se mantuvo en $28 \pm 0.4 \text{ }^\circ\text{C}$ para todos los tratamientos sin diferencias estadísticas ($p > 0.05$). El OD fue significativamente ($p < 0.05$) superior en el CONT ($6.2 \pm 1.3 \text{ mg/L}$) respecto a los tratamientos BFT, PROB y BFTPROB ($5.9 \pm 1 \text{ mg/L}$). El pH para el tratamiento CONT fue superior estadísticamente ($p < 0.05$) con un valor de 8.5 ± 0.5 , respecto a BFT con 8.2 ± 0.5 , PROB con 8.3 ± 0.7 y BFTPROB con 8.3 ± 0.6 , sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$).

Para el nitrito, nitrato y TAN en los tratamientos BFT (0.1 ± 0 mg/L; 4 ± 1.0 mg/L y 0.3 ± 0.2 mg/L respectivamente), PROB (0.1 ± 0 mg/L; 7 ± 1.2 mg/L y 0.3 ± 0.1 mg/L respectivamente) y BIOFPROB (0.1 ± 0 mg/L; 2.2 ± 0.5 mg/L y 0.2 ± 0.0 mg/L) los valores fueron menores significativamente ($p > 0.05$) a excepción del tratamiento CONT (0.2 ± 0.1 mg/L; 12.5 ± 1.2 mg/L y 0.7 ± 0.1 mg/L), donde los compuestos nitrogenados siempre estuvieron en concentraciones mayores de los intervalos óptimos para los langostinos, por lo que se mantuvo el protocolo de recambios de agua parciales durante el estudio.

Por otro lado, los sólidos en suspensión en los tratamientos con biofloc, estuvieron dentro del intervalo adecuado BFT 13.5 ± 0.9^a mg/L y BFTPROB 14 ± 1.0^a mg/L y no tuvieron diferencias significativas ($p > 0.05$), lo cual indica que el biofloc se mantuvo estable debido a la adición periódica y adecuada de melaza y al control de otros parámetros de calidad del agua (Tabla 10).

Tabla 10. Parámetros de calidad de agua promedio \pm Desviación Estándar registrados en los diferentes tratamientos durante el cultivo experimental de langostino.

Parámetro	CONT	BFT	PROB	BFTPROB	VO para los langostinos
Temperatura (°C)	28 ± 0.4^a	28 ± 0.5^a	28 ± 0.4^a	28 ± 0.1^a	28-31
Oxígeno disuelto (ppm)	6.2 ± 1.3^a	5.9 ± 1.0^b	5.9 ± 1.0^b	5.9 ± 0.9^b	5
pH	8.5 ± 0.5^a	8.2 ± 0.5^b	8.3 ± 0.7^b	8.3 ± 0.6^b	7-8.5
Sólidos sedimentables mg/L	--	13.5 ± 0.9^a	--	14 ± 1.0^a	5-15
N-Nitrito (mg/L)	0.2 ± 0.1^a	0.1 ± 0^c	0.1 ± 0^c	0.1 ± 0^c	0.2
N-Nitrato (mg/L)	12.5 ± 1.2^a	4 ± 1.0^c	7 ± 1.2^b	2.2 ± 0.5^c	7.0
TAN (mg/L)	0.7 ± 0.1^a	0.3 ± 0.2^b	$0.3 \pm 0.^b$	0.2 ± 0.0^c	0.50

Dentro de las filas, los superíndices diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0.05$). VO= Valor óptimo (García-Guerrero et al., 2013)

IV.3 Análisis metagenómico

IV.3.1 Unidades Taxonómicas Operacionales

En las curvas de rarefacción de los tratamientos en las diferentes etapas del experimento se observa el número de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU's por sus siglas en inglés) respecto al número de secuencias por muestra de los diferentes tratamientos. El tratamiento con menor número de OTU's e índice de riqueza (Chao) fue CONT en la fase intermedia y final de las muestras de agua e intestino (224, 236 y 294 respectivamente) y los tratamientos con mayor número de OTU's y riqueza fueron BFT y BFTPROB en la fase final en agua e intestino (318, 338 y 316, 340 respectivamente) (Figura 8).

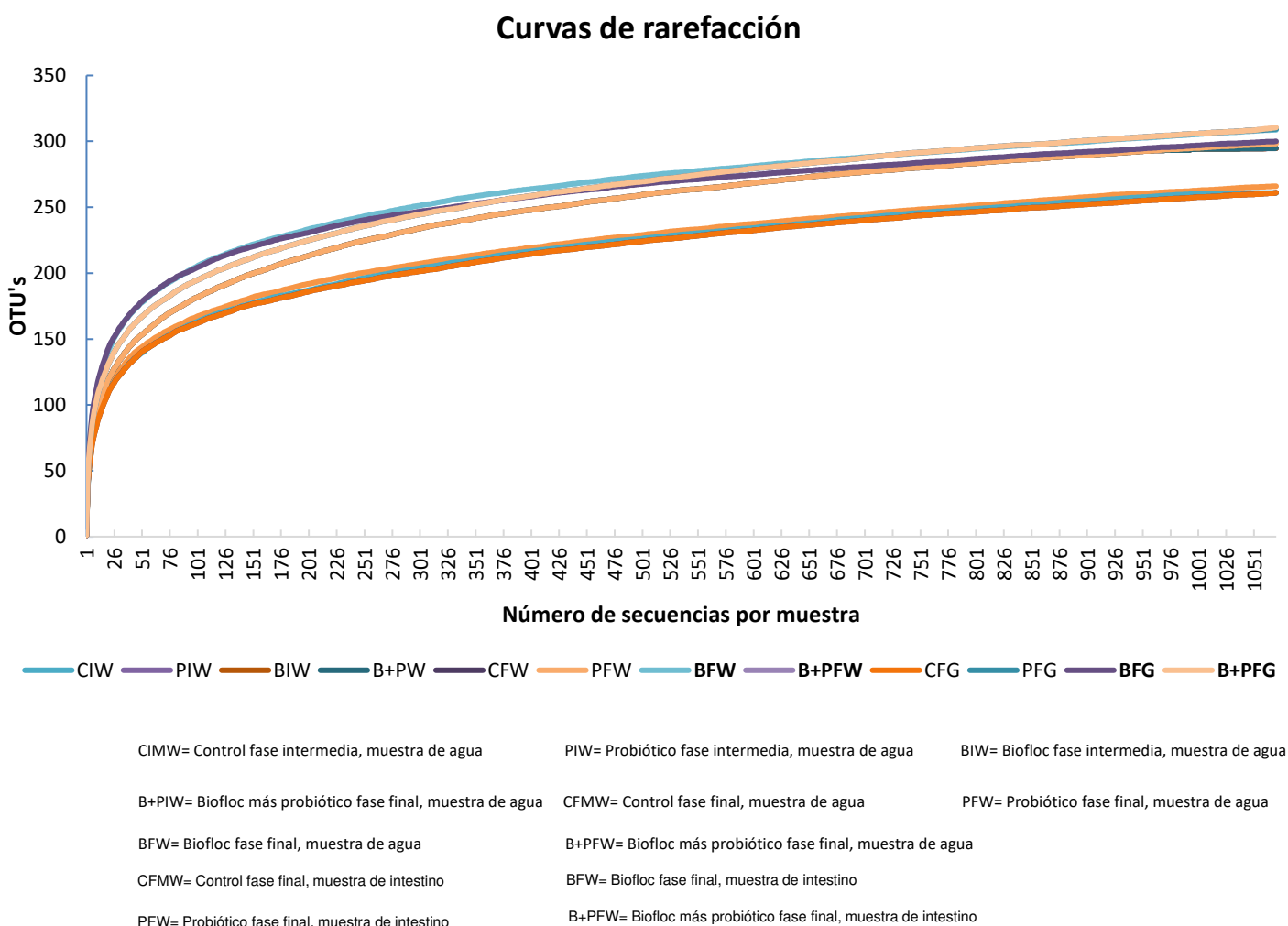


Figura 8. Curvas de rarefacción de las muestras de los tratamientos correspondientes en las diferentes etapas del experimento

IV.3.2 Índices de diversidad

El índice de diversidad de Shannon de las comunidades bacterianas con mayor porcentaje fueron los tratamientos con BFT y BFTPROB en la fase final en agua de cultivo (4.03 y 4.01) y en intestino para los mismos tratamientos (4.07 y 4.08 respectivamente). Sobre la mayor riqueza de Chao en la fase intermedia en las muestras de agua y de intestino de los tratamientos BFT 365.40, 387.00 y BFTPROB 389.14 respectivamente (Tabla 11).

Tabla 11. 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 ARNr amplificados por PCR

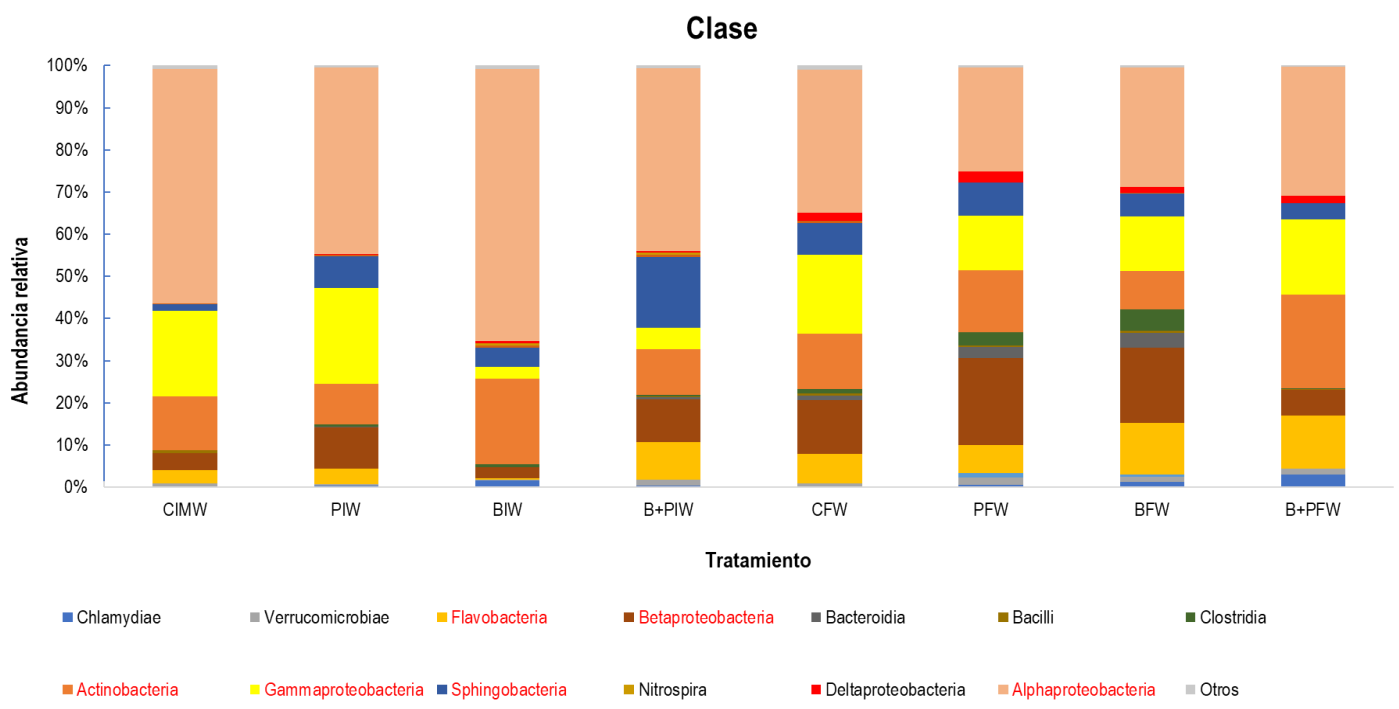
Muestras	nseqs	Cobertura	Riqueza de la comunidad		Diversidad de la comunidad
			Sobs (riqueza observada)	Chao (lci-hci) (riqueza estimada)	Shannon (lci-hci) (diversidad)
CIW	106952	0.9995	224	280.97 (268.57-316.25)	2.52 (2.50-2.52)
PIW	153962	0.9997	287	322.06 (306.30-373.39)	3.72 (3.71-3.73)
BIW	139234	0.9997	275	314.60 (293.84-358.25)	3.50 (3.48-3.50)
B+PIW	185604	0.9998	296	344.24 (327.90-402.22)	3.83 (3.82-3.83)
CFW	140404	0.9997	236	293.41 (300.76-376.55)	2.99 (2.96-2.99)
PFW	201218	0.9997	309	358.89 (343.09-412.06)	3.70 (3.69-3.70)
BFW	220600	0.9995	318	365.40 (356.90-412.20)	4.03 (4.02-4.03)
B+PFW	217409	0.9997	316	366.68 (357.32-415.96)	4.01 (4.00-4.03)
CFG	175885	0.9997	294	349.73 (331.33-407.97)	3.05 (3.05-3.06)
PFG	238060	0.9998	333	371.08 (351.13-402.98)	3.87 (3.86-3.87)
BFG	239682	0.9997	338	387.00 (362.08-417.72)	4.07 (4.07-4.08)
B+PFG	239876	0.9995	340	389.14 (374.88-426.04)	4.08 (4.07-4.08)

IV.3.3 Comunidad microbiana

Los resultados del análisis metagenómico indicaron que la comunidad microbiana de las muestras de agua en la fase intermedia para el tratamiento CONT fue de 12 clases, 48 familias; para PROB 13 clases, 49 familias; para BFT 14 clases, 50 familias y BFTPROB tuvo el mayor número de clases y familias, 16 y 52 respectivamente. En la fase final el tratamiento CONT estuvo representado por 12 clases, 49 familias; el PROB por 13 clases, 50 familias; el mayor número de clases y familias se presentó en los tratamientos BFT por 16 clases, 53 familias y BFTPROB por 16 clases y 53 familias.

La comunidad microbiana de las muestras de agua está representada por 16 clases taxonómicas con mayor abundancia relativa, las cuales fueron: Alphaproteobacteria (40%) Betaproteobacteria (11%), Gammaproteobacteria (13%), Actinobacteria (14%), Flavobacteria (6.9%), y Sphingobacteria (8%).

En los tratamientos de las muestras de agua hubo variaciones de abundancia relativa, las Alphaproteobacterias en la fase intermedia (41 y 53%) con relación a la etapa final (21 y 27%) en los tratamientos PROB y BFT. Por otra parte, se observó que las Betaproteobacterias aumentaron su porcentaje en la fase final (18 y 15%) respecto a la intermedia (9 y 2%) en los tratamientos PROB y BFT. Además, los tratamientos con mayor abundancia relativa para las Actinobacterias fueron BFT (17%) en la fase intermedia y BFTPROB en la fase final (20%). Mientras que las Flavobacterias se presentaron con mayor abundancia en todos los tratamientos de la fase final del experimento en comparación con la fase intermedia. Respecto a las Gammaproteobacterias la mayor abundancia relativa en la fase final se observó para el tratamiento BFT (16%) (Figura 9).



CIMW= Control fase intermedia, muestra de agua PIW= Probiótico fase intermedia, muestra de agua
 BIW= Biofloc fase intermedia, muestra de agua B+PIW= Biofloc más probiótico fase final, muestra de agua
 CFMW= Control fase final, muestra de agua PFW= Probiótico fase final, muestra de agua
 BFW= Biofloc fase final, muestra de agua B+PFW= Biofloc más probiótico fase final, muestra de agua

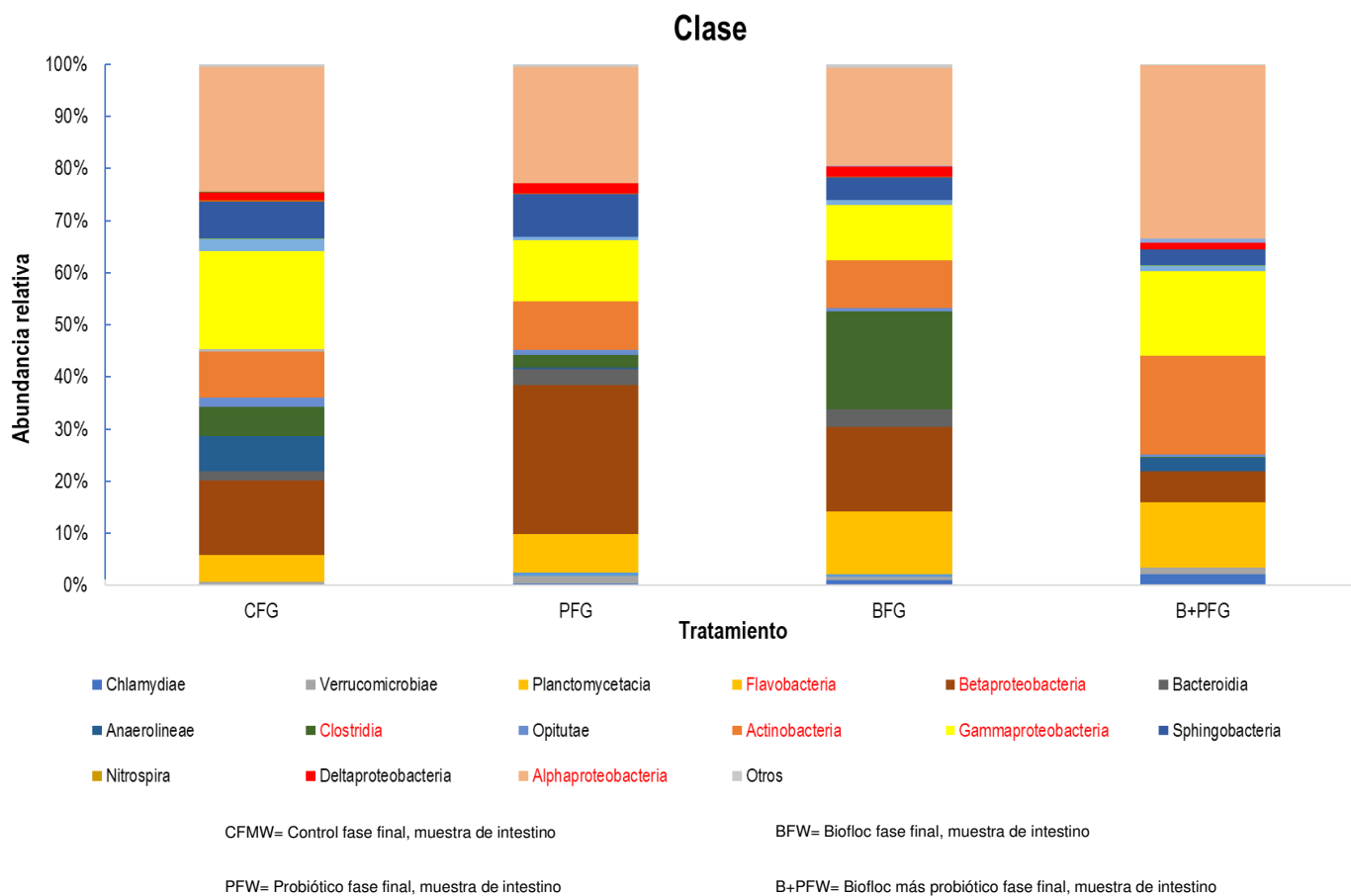
*Letras en color rojo resaltan a las clases con mayor abundancia relativa.

Figura 9. Abundancia relativa promedio (%) de las clases de bacterias presentes en las muestras de agua provenientes de los tratamientos experimentales

Respecto a las muestras de intestino de los langostinos en el tratamiento CONT se observaron 13 clases, 48 familias; en PROB 13 clases y 50 familias y el mayor número de clases y de familias se observaron en los tratamientos BFT con 16 clases y 53 familias y BFTPROB con 16 clases y 52 familias. Con estos resultados se observó que fueron muy similares en el número de clases y familias entre las muestras de agua e intestino de la fase final.

En las muestras de intestino de los langostinos se registraron un total de 16 clases de bacterias, de las cuales las que presentaron mayor abundancia relativa fueron: Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria, Flavobacteria, Actinobacteria y Clostridia. Los miembros de Alphaproteobacteria, Actinobacteria y Flavobacteria se observaron con mayor abundancia relativa en el tratamiento BFTPG (31%, 18%, 7% respectivamente), Clostridia, Betaproteobacterias y las Flavobacterias tuvieron mayor abundancia relativa en el tratamiento BFT (16, 14 y 10% respectivamente).

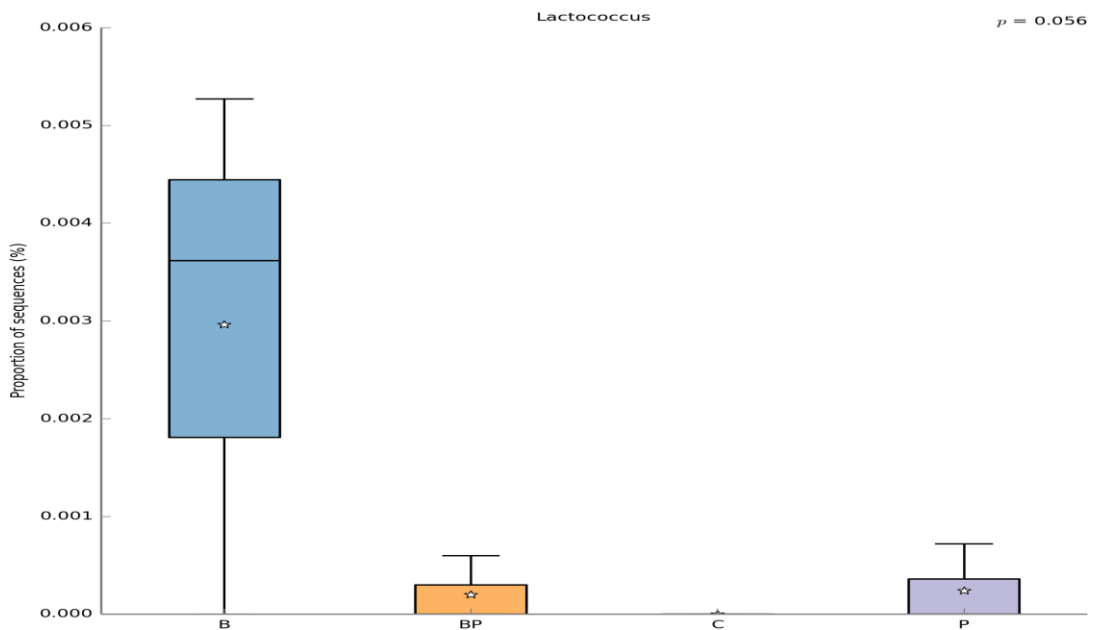
Respecto a la comparación de las comunidades microbianas en la fase final de la experimentación, la abundancia relativa de las Actinobacterias tuvieron un mayor porcentaje en el tratamiento BFTPROB en muestras de agua e intestino (20 y 18 % respectivamente), mientras que para las Flavobacterias su mayor abundancia se presentó en los tratamientos BFT en intestino (10%) y BFTPROB en agua e intestino (11 y 7 %), para las Alpha y Gammaproteobacterias se observó una mayor abundancia en las muestras de intestino del tratamiento BFTPROB (31 y 15 %) y las Betaproteobacterias en intestino en BFT con 14% (Figura 10).



*Letras en color rojo resaltan a las clases con mayor abundancia relativa.

Figura 10. Abundancia relativa promedio (%) de las clases de bacterias presentes en las muestras de intestino de los langostinos experimentales

Lactococcus lactis, que fue adicionado en los tratamientos con probiótico tuvo una proporción de secuencia baja (menor a 0.001%), lo que representa que no tuvo un efecto o dominancia bacteriana en muestras de intestino del langostino y en muestras de agua de cultivo. En la figura 14 se muestra una gráfica de la proporción de secuencias de los tratamientos de la fase intermedia y final (día 63 y 127) de las muestras de agua y en conjunto las muestras de intestino de la fase final (día 127), esta mezcla de datos se realizó porque no se contaba con más muestras de intestino para poder procesar en el software STAMP, sin embargo, lo que es relevante destacar es que no se tuvo una proporción de secuencia alta, se obtuvo como la más alta 0.005, que representa 1 secuencia del género *Lactococcus* en cada 20,000 secuencias (Figura 11).



B= biofloc

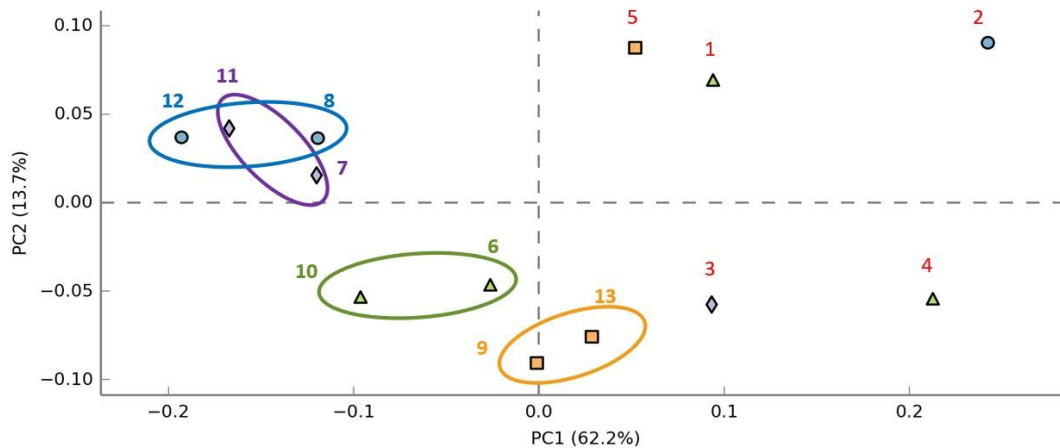
C= control

BP= biofloc + probiótico

P= probiótico

Fig. 11 Proporción de secuencias a nivel de género del probiótico añadido (*Lactococcus*) en los diferentes tratamientos con la mezcla de las muestras de intestino del langostino y las muestras de agua de cultivo

En el análisis de componentes principales de los diferentes tratamientos se muestra la cercanía de la relación de composición bacteriana en las muestras de agua e intestino del langostino, donde se observa la cercanía que hubo entre tratamientos de la fase intermedia y final de muestras de agua e intestino. (Figura 12).



1. IW	3. PIW	5. B+PIW	7. PFW	9. B+PFW	11. PFG	13. B+PFG
2. CIW	4. BIW	6. CFW	8. BFW	10. CFG	12. BFG	

CIMW= Control fase intermedia, muestra de agua

PIW= Probiótico fase intermedia, muestra de agua

BIW= Biofloc fase intermedia, muestra de agua

B+PIW= Biofloc más probiótico fase final, muestra de agua

CFMW= Control fase final, muestra de intestino

PFW= Probiótico fase final, muestra de intestino

CFMW= Control fase final, muestra de agua

PFW= Probiótico fase final, muestra de agua

BFW= Biofloc fase final, muestra de agua

B+PFW= Biofloc más probiótico fase final, muestra de agua

BFW= Biofloc fase final, muestra de intestino

B+PFW= Biofloc más probiótico fase final, muestra de intestino

*PC= Componente principal * Los círculos representan las agrupaciones entre tratamientos

Fig. 12 Análisis de componentes principales a nivel de clase por tratamiento de las muestras de agua e intestino del langostino

Los resultados muestran a los 3 principales Phylum, 7 Clases, 9 Órdenes y 10 Familias con mayor abundancia relativa de cada uno de los tratamientos. Se observó una mayor abundancia de la familia Rhodobacteraceae en todos los tratamientos de las muestras de agua, no obstante, en el intestino se obtuvo en menores concentraciones. La familia Comamonadaceae tuvo una mayor abundancia (12.37) en el tratamiento con probióticos en las muestras de intestino. Mientras que la familia Pseudomonadaceae tuvo una mayor abundancia (18.14) en el tratamiento con probióticos en la fase intermedia de las muestras de agua (Tabla 12).

Tabla. 12 Abundancia relativa (%) de las Familias de bacterias más representativas identificadas en cada tratamiento

Phylo	Clase (7)	Orden (9)	Familia (10)	CIMW	PIW	BIW	B+PIW	CFW	PFW	BFW	B+PF			B+PF G	
											W	CFG	PFG		
Alphaproteobacteria															
Proteobacteria		Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	30.24	20.33	44.77	23.64	12.18	13.86	15.29	14.43	8.55	11.14	8.69	17.48
		Caulobacterales	Caulobacteraceae	2.23	0.84	0.17	2.34	2.89	1.94	0.67	2.92	2.66	2.88	1.06	3.09
		Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	9.32	1.21	0.79	1.45	3.30	3.42	0.40	11.12	4.15	3.39	0.72	11.09
	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	6.60	18.14	0.37	2.16	6.18	6.81	9.49	3.89	6.96	6.36	7.49	3.42
		Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	1.19	2.76	0.24	1.56	1.74	5.49	4.85	2.49	2.36	8.39	4.57	2.69
	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	1.89	3.93	1.18	5.22	4.62	9.28	7.78	1.94	4.54	12.37	6.98	1.84
Bacteroidetes	Flavobacteria		Flavobacteriaceae	0.32	2.92	0.14	2.14	1.23	1.78	2.53	7.22	1.22	2.51	1.83	7.19
		Flavobacteriales		Cryomorphaceae	2.40	0.47	0.13	5.03	4.48	3.78	7.33	2.92	3.24	4.05	8.44
	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Chitinophagaceae	1.12	5.37	2.68	1.71	2.07	0.49	2.54	1.03	1.03	0.60	1.46	0.72
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Mycobacteriaceae	0.87	1.55	0.47	0.42	3.93	8.88	2.65	1.89	2.95	5.60	2.27	1.59

Capítulo V. DISCUSIÓN

V.1 Supervivencia y crecimiento

De acuerdo con los resultados obtenidos, los sistemas PROB, BFT y BFTPROB beneficiaron la supervivencia de los langostinos en comparación con el control, esto puede deberse a que en los tratamientos se tuvo la presencia de bacterias con potencial probiótico en el sistema, las cuales estimulan la respuesta inmune e inhibieron la proliferación de microorganismos patógenos (Balcázar *et al.*, 2006). No obstante, el probiótico agregado durante el estudio (*L. lactis*) no se estableció en el intestino de los langostinos ni en el agua de cultivo, pero se observaron otras bacterias con potencial probiótico (Actinobacterias como *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Micromonospora*, Gammaproteobacteria como *Pseudomonas* y Sphingobacteria como *Sphingomonas*) con alta abundancia relativa los cuales tienen capacidad bactericida debido a que producen sustancias antimicrobianas que impiden que las bacterias patógenas se adhieran al epitelio intestinal y por ende mejoran disminuyen el porcentaje de mortalidad (Sánchez-Ceja *et al.*, 2018).

Asimismo, las bacterias heterótrofas que se observaron en los tratamientos como las Pseudomonadaceae, Rhodobacteraceae, Flavobacteraceae, por mencionar algunas, se encargan del proceso de desnitrificación del amonio, lo que permite una transformación a otros compuestos como el nitrato, nitrito o gas nitrógeno, los cuales tienen un menor efecto negativo en los animales cultivados; además promueven mayor supervivencia (Balcázar *et al.*, 2006). En la investigación realizada por Kumar *et al.* (2016), observaron que la supervivencia de los langostinos fue superior en los tratamientos con probióticos atribuido al efecto de desnitrificación, los mantuvieron en los valores adecuados del amonio, nitritos y nitratos para su óptimo crecimiento, limitando el estrés que generan estos compuestos. En el presente estudio se observó una estabilización de los compuestos nitrogenados en los tratamientos con probióticos y biofloc y a su vez una supervivencia entre el 93 y 100%.

Respecto a la supervivencia, pero en los tratamientos con biofloc como BFT y BFTPROB de la presente investigación esta fue del 100%, lo que indica que los organismos tuvieron un buen estado de salud y condiciones de cultivo, otros investigadores reportan resultados similares en diversos estudios (Hapsari, 2016; Ferreira *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2017 y Miao *et al.*, 2017), donde se resalta la importancia de la aplicación de biofloc y probióticos en sistemas acuícolas, debido a

que disminuyen la susceptibilidad a enfermedades; al respecto Supriatna *et al.* (2019), obtuvieron el 100% de supervivencia en el camarón tigre (*Penaeus monodon*) en tratamientos con biofloc y probióticos, lo cual se atribuyó a que los organismos no estaban bajo estrés, ni susceptibles a adquirir alguna infección o enfermedad y obtuvieron altas tasas de asimilación de vitaminas y minerales lo cual se ve reflejado en bajas tasas de mortalidad, lo cual también pudo haber ocurrido en el presente estudio.

Respecto al crecimiento en los tratamientos con probióticos, los resultados muestran algunas clases de bacterias presentes con mayor abundancia como las Gammaproteobacteria (familia Pseudomonadaceae), Flavobacteria (Flavobacteraceae) y Actinobacterias (Micrococcaceae) que producen pigmentos carotenoides tal como las astaxantina, β -caroteno, zeaxantina, cantaxantina y licopeno que reducen el estrés oxidativo, son antioxidantes, antiinflamatorias e inmunomoduladoras (Ortega- Cabello *et al.*, 2017).

Respecto al uso de probióticos, Hai *et al.* (2009) demostraron que efectivamente la supervivencia puede mejorarse hasta en un 20% al añadir los probióticos *Pseudomonas synxantha* y *Pseudomonas aeruginosa* (cepa no patógena) en la dieta, atribuido a la mejora en la calidad del agua, la cual ayuda en la salud de los animales al minimizar los efectos patógenos provocados por virus o bacterias.

Los resultados del presente estudio se asemejan a los reportados por Xue *et al.* (2021) debido a que los langostinos tuvieron un mayor peso en los tratamientos con el probiótico *Pediococcus pentosaceus* (8.13 ± 0.039 g), en comparación con el grupo control (7.22 ± 0.072 g), relacionado con el efecto de la microbiota intestinal que fue caracterizada por medio del análisis de secuenciación masiva. Lo anterior concuerda con lo reportado con Adel *et al.*, 2017, donde en un cultivo de camarón blanco de Pacífico en etapa juvenil, al añadir *L. lactis* en una concentración de 10^8 CFU g L⁻¹ obtuvieron un mayor crecimiento comparado con el control y con otras concentraciones (10^6 CFU g L⁻¹ y 10^7 CFU g L⁻¹), atribuido al incremento significativo en la actividad específica de la proteasa, amilasa y lipasa, ya que incrementó la actividad digestiva y la absorción del alimento.

De acuerdo con Seenivasan *et al.* (2011) indicaron que el peso ganado del langostino malayo incrementó ($p > 0.05$) en comparación con el control, al agregar 2% de probióticos comerciales; lo anterior atribuido a la modulación y estimulación inmunológica, a la producción de vitaminas y

minerales originados por las bacterias probióticas, lo cual aumenta progresivamente el crecimiento de las especies cultivadas.

A su vez Seenivasan *et al.* (2015) reportaron que el peso ganado, la tasa de crecimiento específica y la supervivencia de los langostinos malayos fueron más eficientes cuando se agregó al alimento 4% de *Saccharomyces cerevisiae* comparado con el grupo control. Donde el análisis enzimático indicó una alta actividad para la proteasa y amilasa, lo que sugiere que al agregar este probiótico se incrementa la actividad de las enzimas digestivas. En el presente estudio *L. lactis* no tuvo una proporción de secuencia significativa, por lo cual no influyó en el crecimiento significativo que tuvo en comparación con el control, sin embargo, se puede atribuir a otros microorganismos con potencial probiótico (mencionados anteriormente) establecidos en los sistemas.

En la presente investigación se puede atribuir un mayor crecimiento de los langostinos, pero ahora en los tratamientos con biofloc (BFT y BFTPROB) debido a la contribución de microorganismos presentes en los flóculos como bacterias heterótrofas, fitoplancton, zooplancton, ciliados, rotíferos, nematodos y copépodos que además de ser una fuente de proteína lo son de lípidos, fibra y minerales como el K, Ca, Fe y Mg (Emerenciano *et al.*, 2013).

De acuerdo con Ekasari *et al.* (2021) quienes cultivaron langostinos en biofloc y observaron un mayor peso (1.69 ± 0.18 g) comparado con el grupo control (1.09 ± 0.09 g), lo cual se atribuye a la contribución nutricional de proteínas, carbohidratos y minerales provenientes de los microorganismos que se establecen y que forman parte de los flóculos, es decir, al alto aporte nutricional que se tiene por parte de los microorganismos y que está disponible en todo momento, conjuntamente un mejor peso y mejor longitud se pueden ver reflejados por la producción de enzimas, como amilasas, proteasas, celulasas y lipasas, que promueven la absorción de nutrientes y por ende hay un mayor crecimiento de los langostinos.

Debido a que los langostinos malayos son detritívoros y bentónicos estos consumen perfectamente los flóculos que están disponibles en todo momento para que sean consumidos por ellos, por lo cual se vio reflejado un mayor peso y longitud en los tratamientos con biofloc ya que las bacterias que se establecen en el biofloc y que tienen potencial probiótico promueven la actividad enzimática digestiva de *M. rosenbergii* en cultivo y esto mejora la asimilación de nutrientes.

Por otra parte, respecto a los resultados de tratamientos en sistemas con biofloc, destaca el estudio de Xu *et al.* (2013) quienes observaron que la actividad de proteasa, amilasa, celulasa y

lipasa se incrementan en camarones (*L. vannamei*) al cultivarlos en biofloc en comparación con un cultivo tradicional, además se observó una mejor calidad del agua, así como un aumento significativo en el peso ganado y la tasa de crecimiento específica, por lo que los autores concluyeron que al cultivar camarones con sistema biofloc no solo mejora la calidad del agua, sino que se activan las enzimas digestivas y por ende hay un mayor crecimiento.

En una investigación realizada por Miao *et al.* (2017) observaron en un cultivo de langostinos (*M. rosenbergii*) que, el tratamiento con biofloc tuvo resultados significativos de supervivencia con 10.62% superiores, una tasa de peso ganado mayor al 27.55% y un 7.13% de incremento en la TCE respecto al control ($p < 0.05$), lo anterior se atribuyó a la efectividad de la adición de la fuente de carbono para la proliferación de los microorganismos que son una fuente de carbohidratos, vitaminas y minerales aprovechados por los langostinos.

V.2 Parámetros de calidad del agua

Con relación a la temperatura, pH del agua y sólidos sedimentables (para los tratamientos BFT y BFTPROB) de los estanques se mantuvieron constantes y en valores similares entre tratamientos ($p < 0.0001$) ya que estuvieron en condiciones controladas, por lo que se considera que los parámetros de calidad del agua no influyeron en el desempeño de los langostinos (García-Guerrero *et al.*, 2013). Respecto al oxígeno disuelto en los tratamientos BFT, PROB y BFTPROB se puede observar en la Tabla 10 que estuvieron 0.9 ppm más alto del valor adecuado para los langostinos, lo cual puede deberse a la demanda de oxígeno que se requiere por la carga microbiana que contiene el agua y que en su mayoría se compone de microorganismos aerobios que requieren de una alta oxigenación, además de que en los tratamientos con biofloc debe haber una alta oxigenación para que los sólidos se mantengan en suspensión (Avnimelech, 2012). No obstante, en el tratamiento CONT se observó una concentración de oxígeno disuelto más alta significativamente ($p < 0.05$), esto puede deberse a los constantes recambios de agua.

Respecto a los sólidos sedimentables, se observaron dentro de los intervalos óptimos para los langostinos (< 15 mg/L), ya que se mantuvieron entre 13 y 14 mg/L, lo cual es muy importante porque esto permitió una adecuada calidad del agua y por ende una alta supervivencia (Gaona *et al.*, 2017), además de que puede haber un mayor crecimiento de los langostinos debido a que los animales se alimentan de los flóculos en suspensión (Azim y Little, 2008).

Por otra parte, la concentración de amonio (mg/L), nitritos (mg/L) y nitratos (mg/L) en el agua de los tratamientos BFT, PROB y BFTPROB siempre estuvieron en los valores adecuados para los langostinos, aunque en el tratamiento CONT tuvieron variaciones en cuanto a los valores aceptables para los langostinos aun tomando en cuenta que se hacían recambios de agua. Lo anterior puede atribuirse a lo que se menciona en diversos estudios (Ebeling *et al.*, 2006; Emerenciano *et al.*, 2017 y Llario *et al.*, 2020), debido a que en los sistemas de cultivo en biofloc se presenta una reducción y estabilización de los compuestos nitrogenados comparando con un sistema convencional en donde se hacen recambios constantes de agua. Asimismo, Ju y Zhang (2015), mencionan que en los sistemas biofloc, las bacterias aeróbicas o facultativas se encargan de transformar los compuestos nitrogenados, lo que contribuye a estabilizar la calidad del agua.

Por otro lado, Melgar *et al.* (2013) evaluaron los parámetros de calidad del agua durante un cultivo con camarón (*L. vannameii*), en el cual se adicionó un probiótico comercial compuesto por *Rhodopseudomonas palustris*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* y *Saccharomyces cerevisiae* (EMTM, Japan), con lo cual obtuvieron un crecimiento significativo en los camarones y una óptima calidad del agua por lo cual el uso de probióticos refleja ventajas en la producción de los organismos cultivados.

Además de lo anterior, Suita *et al.* (2015) evaluaron parámetros de calidad de agua con un cultivo de camarón en biofloc, teniendo como resultado que el amonio total, nitrito y nitrato estuvieron dentro del intervalo óptimo en los dos tratamientos con la adición de la fuente de carbono, sin tener que realizarse recambios de agua continuos como ocurre en sistemas tradicionales de producción.

Asimismo, Luis-Villaseñor *et al.* (2016) obtuvieron en un cultivo de camarón con biofloc, concentraciones de TAN y N-NO₂, más bajos ($p < 0.5$) comparados con el control, lo cual concuerda con los resultados del presente estudio. Por otro lado, de acuerdo con Emerenciano *et al.* (2017); asegura 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 desechos de los animales es nitrificado o asimilado por la comunidad microbiana, sin que exista la necesidad de hacer 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).

Por otra parte, Cai *et al.* (2019) observaron que efectivamente al adicionar los probióticos *Bacillus licheniformis* y *Bacillus flexus* en el agua de cultivo de camarón (*L. vannamei*) (menores a 1 mg/L) los niveles de nitrógeno amoniacal total en el agua fueron menores a los reportados en tratamientos tradicionales.

Por lo anterior, el efecto de obtener concentraciones óptimas de amonio, nitritos y nitratos en el agua, para el cultivo de los langostinos, en los grupos BFT, PROB y BFTPROB, se atribuyó a la presencia y actividad de las bacterias heterótrofas y autótrofas, debido a que se encargan del proceso de nitrificación y desnitrificación.

V.3 Comunidades microbianas

Las bacterias son fundamentales en las redes tróficas de ambientes acuáticos, debido a que contribuyen en la recirculación de nutrientes e interactúan con otros microorganismos (Cruz-Leyva *et al.*, 2015). Para poder comprender su función en los nichos ecológicos específicos, es importante identificar y además cuantificar a cada bacteria que forma parte de estas comunidades, por ello los estudios de metagenómica son una herramienta para estudiar comunidades de microorganismos (Vieites *et al.*, 2008). Durante la presente investigación se usaron herramientas de metagenómica para identificar las bacterias presentes en el biofloc e intestino de los langostinos, con lo que se obtuvieron 340 OTU's; Cardona *et al.* (2016) en un estudio con cultivo de camarón blanco del Pacífico, lograron identificar 277 ± 23.02 OTU's por lo que se considera que el número de OTU's obtenidos durante la presente investigación indica que la riqueza de especies de los tratamientos con biofloc en las dos etapas (fase intermedia y fase final) de presente estudio fue alto con cultivo de langostinos.

Por otro lado, se considera que el esfuerzo de secuenciación fue adecuado al tipo de muestras y número debido a que se obtuvieron valores de cobertura elevados y en promedio del 99%; al respecto Cardona *et al.* (2016) mencionan que tuvieron un esfuerzo de secuenciación del 97% para las muestras de agua con cultivo de camarón blanco del pacífico, por lo que se puede considerar que el esfuerzo de secuenciación para los resultados de esta investigación (99%) fueron más confiables debido a que Luo *et al.* (2017) mencionan que se tiene una cobertura alta cuando el valor es más cercano al 100%.

La comunidad microbiana de las muestras de agua e intestino con mayor número de clases y familias se presentaron en los tratamientos BFT y BFTPROB esto debido a que en los sistemas con biofloc las bacterias requieren de un sustrato (melaza o alguna otra fuente de carbono) o fuentes de nitrógeno para crecer y proliferar y es justo lo que se tiene en el biofloc al no haber recambios de agua, además de un ambiente rico en materia orgánica (Ossa *et al.*, 2010). Además del número de clases y familias fue muy similar en los tratamientos con biofloc debido a que existe una estrecha interacción entre las bacterias del agua de cultivo con las bacterias que se pueden observar en el intestino de los langostinos ya que los langostinos ingieren los micro flóculos y con ello, los microorganismos presentes en el agua de cultivo (Cardona *et al.*, 2016).

El phylum más abundante fue Proteobacteria, el cual participa en el ciclo de nutrientes y en la mineralización de compuestos orgánicos en sistemas acuáticos (Cardona *et al.*, 2016). Este phylum se encarga principalmente de la degradación del amonio y de la materia orgánica, por lo cual su presencia es normal en tratamientos con biofloc (Cardona *et al.*, 2016). Las Betaproteobacterias son una clase importante de bacterias debido a que principalmente transforman los compuestos nitrogenados en los ecosistemas acuáticos. Esta clase fue una de las más abundantes en este estudio debido a que están siendo desarrolladas en el sustrato de los sistemas y confirmamos que es normal el que se establezcan en el agua de cultivo, así como en el intestino de los langostinos (Penny *et al.*, 2015).

En estudios en los que se evaluó el efecto del uso de la harina de trigo en la composición microbiana presentes en un sistema de cultivo de camarón en biofloc, se reportó que los miembros de las Phyla con mayor abundancia relativa fueron las Proteobacterias, Bacteroidetes y Actinobacterias, principalmente (reportado por Addo *et al.*, 2021) y a su vez los reportados por Kim *et al.* (2021), lo cual se confirma con lo derivado de la presente investigación y lo cual indica que la presencia de estas bacterias derivan del biofloc.

Al igual que los autores anteriores, Hoang *et al.* (2020), reportaron la presencia de Proteobacterias (Alphaproteobacterias y Gammaproteobacterias) y Bacteroidetes en agua de cultivo de camarón en sistema biofloc las cuales destacan como phyla dominantes en sistemas biofloc y son los principales encargados de regular la calidad del agua de cultivo debido a que utilizan la materia orgánica y los compuestos nitrogenados como alimento. Cabe resaltar que las bacterias que pertenecen a este último phylum 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).

Deng *et al.* (2019), reportaron a los Phyla Actinobacteria (24.17%) y Proteobacteria como dominantes (15.05%) en las muestras de intestino de camarón (*L. vannamei*) en cultivo biofloc, lo que se observó en los resultados del presente estudio, debido a que se dio una mayor abundancia relativa de dichas bacterias en el intestino de los langostinos del tratamiento BFTPROB, mientras que se observó con mayor abundancia al Phylum Bacteroidetes en las muestras de agua (15.56%), estos Phyla de bacterias se reportan como los más abundantes en sistemas acuáticos (Cardona *et al.*, 2016), lo cual indica que la presencia de estas bacterias refleja un desarrollo normal de los tratamientos.

Respecto al alto porcentaje de abundancia en los resultados obtenidos en la presente investigación se atribuye a que los phyla antes mencionados son dominantes porque tienen alta capacidad degradativa, además de que producen sustancias como las bacteriocinas y biocinas con actividad antimicrobiana, por lo cual excluyen a otras bacterias y proliferan en el agua e intestino de los animales cultivados (Monroy *et al.*, 2009). Además, los Phyla más abundantes tuvieron la capacidad de desplazar a otras bacterias, probablemente debido a su variabilidad en morfología, fácil desplazamiento y adaptación (Angthong *et al.*, 2020). La mayor abundancia relativa se presentó en muestras de intestino para las Alphaproteobacterias, Gammaproteobacterias, Betaproteobacterias, Actinobacterias y Flavobacterias esto pudo deberse a que las bacterias en el intestino se localizan en un medio estable de humedad, temperatura y rico en nutrientes (Zhang *et al.*, 2012; Imaizumi *et al.*, 2021).

Las Clases como Gammaproteobacterias, Alphaproteobacterias, Bacteroidia y Flavobacteria se reportaron en muestras de intestino de camarón en la investigación realizada por Cardona *et al.*, (2016), donde observaron abundancias relativas similares a las registradas en la presente investigación en los tratamientos BFT y CONT, lo que se atribuye a que estas bacterias forman parte de la microbiota intestinal de los crustáceos de manera natural y contribuyen a la degradación de compuestos nitrogenados, además de participar en actividades antioxidantes y en la influencia de la respuesta inmune.

Respecto a las Familias con mayor abundancia relativa en este estudio han sido reportadas previamente en sistemas acuícolas y en cultivos biofloc; de manera particular destacaron las Pseudomonadaceae (Ndi y Barton, 2012), Caulobacteraceae (Guo *et al.*, 2011), Chitinophagaceae (Bartelme *et al.*, 2017) y Flavobacteraceae (Wei *et al.*, 2020), las cuales se consideran bacterias eficientes en la transformación de diversos compuestos dentro de la columna de agua como la celulosa, la quitina, el colágeno (presentes en el caparazón de los langostinos y presente en el

agua por los procesos de muda) y los compuestos nitrogenados generados durante el cultivo, lo que puede promover el consumo de materiales poco digeribles, pero gracias a la descomposición bacteriana son fáciles de aprovechar por los individuos en estudio y les proporciona una fuente adicional de nutrientes, lo que se refleja en el crecimiento de los langostinos, como fue el caso de la presente investigación.

Por otra parte, uno de los objetivos más importantes de este estudio fue evaluar el impacto de la adición del probiótico *L. lactis* sobre la composición de la comunidad microbiana durante el cultivo de los langostinos en biofloc. Los resultados del análisis de secuenciación masiva mostraron que no se obtuvo un incremento significativo respecto a la abundancia relativa del probiótico añadido perteneciente al género *Lactococcus* (menor al 0.1%), contrariamente a lo que se esperaba, debido a que es una de las especies más utilizadas como probiótico en acuicultura con resultados positivos en el crecimiento, la supervivencia, respuesta inmune y el control de enfermedades de crustáceos y peces, lo que habla de su capacidad de exclusión de microorganismos patógenos (Balcázar *et al.*, 2006) y que el Phyla al que pertenece (Firmicutes) ha sido reportado comúnmente en los sistemas biofloc.

La ausencia del probiótico *L. lactis* como parte de la microbiota dominante en los tratamientos PROB y BFTPROB, probablemente se deba a que fue desplazado por la comunidad bacteriana que se estableció y desarrollo en el biofloc, y probablemente en el tratamiento PROB algunas otras bacterias con potencial probiótico como las Actinobacterias (*Rhodococcus*, *Bifidobacterium*) o Gammaproteobacteria (*Pseudomonas* sp. RGM2144) se establecieron en el agua e intestino (Cardona *et al.*, 2016; Cienfuegos *et al.*, 2018; Deng *et al.*, 2019).

Además de lo anterior su baja proporción pudo deberse a que esta cepa probiótica fue aislada de la trucha y no del propio langostino. Henríquez, 2013 menciona que al aislar microorganismos propios de la especie favorece su uso, debido a que tiene un mayor potencial de la exclusión competitiva contra microorganismos patógenos, ya que tienen mayor capacidad de adaptación y afinidad por su mismo nicho ecológico, con lo cual hay una mayor probabilidad de que estos colonicen, se establezcan y puedan multiplicarse en el intestino del hospedero y puedan conferir los beneficios que los caracterizan (Quevedo, 2020). Así mismo su carencia puede atribuirse al bajo porcentaje del probiótico por lo cual se recomienda que en futuras investigaciones se comparen distintas y más altas concentraciones que la usada en el presente estudio.

A pesar de lo anterior, se observó que los tratamientos BFT, PROB y BFTPROB tuvieron una alta abundancia relativa a la familia Rhodobacteraceae en donde se pueden encontrar

microorganismos considerados como probióticos, los cuales pudieron tener una mayor capacidad de colonización en comparación con el probiótico probado durante la presente investigación o bien fue el sustrato para promover otros grupos que se instalaron mejor que ellos, lo que permitió que los langostinos del tratamiento BFT, PROB y BFTPROB tuvieran un mejor crecimiento, supervivencia además de estabilidad de los compuestos nitrogenados en el cultivo de langostinos a lo largo del periodo de experimentación en comparación de los langostinos en el tratamiento control (Wu *et al.*, 2012).

Por otro lado, cuando se habla de sistemas biofloc hay que tomar en cuenta que las condiciones de producción de organismos acuáticos difieren a los sistemas convencionales debido a que este tipo de sistemas promueve el crecimiento de una diversidad muy compleja de bacterias heterótrofas (*Enterobacter*, *Bacillus* y *Lactococcus*) a partir de una fuente de carbono añadida y alta oxigenación la cual influye junto con las especies cultivadas, sobre los grupos bacterianos que puedan resistir ciertas condiciones (Wilén *et al.*, 2008; Ray y Lotz, 2014).

En un estudio realizado por De Paiva *et al.* (2016), no se 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.

Respecto a los tratamientos con la combinación de probióticos y biofloc en las muestras de agua e intestino, en la fase final hubo una mayor abundancia relativa de bacterias como Alphaproteobacteria, Flavobacteria y Actinobacteria, la presencia de algunos grupos de bacterias en sistemas con biofloc se ha asociado a un mejor estado de salud de los organismos y sobre todo a un aprovechamiento más eficiente del alimento, al respecto Hoang *et al.* (2020) reportaron la presencia de Proteobacteria (Alphaproteobacteria) en el intestino de los langostinos en sistema biofloc, con lo que se observó la disminución de la prevalencia de patógenos en el agua de cultivo por lo cual tuvieron una supervivencia cercana al 100%.

Por su parte Penny *et al.* (2015) mencionan que la presencia de Bacteroidetes (Flavobacteria) en ecosistemas acuáticos promueve la transformación de compuestos nitrogenados lo que contribuye a una mejora de la calidad de agua y por tanto al bienestar de los organismos que viven en el sistema, como se considera pasó en los tratamientos PROB, BFT y BFTPROB de la presente investigación donde los compuestos nitrogenados mantuvieron valores óptimos durante el cultivo de los langostinos. Por otra parte, se sabe que las Actinobacterias tienen la

capacidad de degradar diversos polímeros, como la celulosa, la lignina y la quitina y por ello probablemente se obtuvo una mejor calidad del agua en los tratamientos con probióticos (Taniguchi y Eguchi, 2020). Por lo anterior, es común encontrar en mayor abundancia de estas bacterias en el sistema biofloc al añadir probióticos.

Capítulo VI. CONCLUSIONES

1.- La adición del probiótico *Lactococcus lactis* a una concentración de 1×10^7 UFC ml^{-1} no tuvo una influencia en la diversidad y abundancia de la comunidad microbiana en el agua e intestino del langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) cultivados con la tecnología de biofloc, posiblemente por el desplazamiento del microbioma del biofloc, por la concentración administrada o porque el probiótico utilizado fue aislado de la trucha y no del propio langostino malayo.

2.- El mayor número de clases y familias en muestras de agua de cultivo y en el intestino del langostino se observó en la fase final en los tratamientos BFT (16, 53 y 16, 52 respectivamente) y BFTPROB (16, 53 y 16, 52 respectivamente), sin embargo, en todos los tratamientos se reportaron las siguientes clases: Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria, Flavobacteria, Actinobacteria y Clostridia.

3.- La comunidad microbiana, respecto al número de clases y familias del intestino del langostino y en las muestras de agua de la fase final de experimentación fue similar entre tratamientos, control 12, 48 y 12, 49; tratamiento con probiótico 13, 50 y 13, 50 biofloc 16, 53 y 16, 53 y biofloc con probiótico 16, 52 y 16, 53 respectivamente, lo que indicó una interacción entre las bacterias presentes en los flóculos en el agua de cultivo y en el intestino, debido a que estos fueron ingeridos por los langostinos.

4.- Respecto a la comparación de la abundancia relativa en muestras de agua e intestino en la fase final del experimento, las Actinobacterias tuvieron un mayor porcentaje en el tratamiento biofloc con probiótico en muestras de agua e intestino (20 y 18% respectivamente), para las Flavobacterias se tuvo una mayor abundancia en los tratamientos biofloc en muestras de intestino (10%) y biofloc más probiótico en muestras de agua e intestino (11 y 7%), para las Alpha

y Gammaproteobacterias se observó una mayor abundancia en las muestras de intestino del tratamiento biofloc más probiótico (31 y 15 %) y las Betaproteobacterias en intestino en biofloc con 14%.

5.- La supervivencia fue significativamente mayor en los tratamientos con biofloc con el 100%, seguido por el tratamiento con probióticos con 93% lo cual reflejó una buena salud de los langostinos, esto debido a que los valores de los parámetros de calidad del agua siempre estuvieron en los valores óptimos probablemente por la acción de las bacterias nitrificantes y desnitrificantes, además de que algunas familias reportadas producen sustancias antimicrobianas con lo que excluyen a microorganismos patógenos.

6.- Los parámetros de crecimiento del langostino fueron significativamente mayores en sistemas, biofloc con probiótico, seguidos por sistemas con probiótico con un crecimiento en peso y talla de 6.8 ± 1.3 g, 6.5 ± 0.8 cm; 5.6 ± 1.5 g, 6 ± 1 cm; 6.3 ± 1.6 g, 5.8 ± 0.7 cm respectivamente. Esto puede deberse a la activación de enzimas digestivas, con lo que hay una mejor absorción de nutrientes además del aporte nutricional de los microorganismos presentes en los flóculos.

7.- Respecto a la calidad del agua, en el tratamiento control se obtuvieron valores fuera del intervalo óptimo para los langostinos, lo que puede repercutir en una supervivencia baja (80 ± 4.1 %) y un crecimiento menor (4.1 ± 1.5 g y 3.8 ± 0.6 cm), a pesar de hacer recambios constantes del agua, con lo cual se comprueba que en los tratamientos con biofloc se pueden evitar los recambios de este recurso y tener una alta supervivencia y un mejor crecimiento de los langostinos malayos.

8.- Los sólidos sedimentables del biofloc pudieran estar proporcionando un aporte importante como alimento con alto valor nutrimental principalmente de proteínas, lípidos y minerales, hacia los langostinos. Además de que en las cantidades observadas en el presente estudio (13-14 mg/L) permiten un control de los compuestos nitrogenados, principalmente del amoníaco.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adel, M., El-Sayed, A.F.M., Yeganeh, S., Dadar, M. & Giri, S. S. (2017). Effect of potential probiotic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* on growth performance, intestinal microbiota, digestive enzyme activities, and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 9(2), 150-156.
- Addo, F.G., Zhang, S., Manirakiza, B., Ohore, O. E. & Shudong, Y. (2021). The impacts of straw substrate on biofloc formation, bacterial community and nutrient removal in shrimp ponds. *Bioresource Technology*, 326, 124727.
- Aguilera-Rivera, D., Prieto-Davó, A., Escalante, K., Chávez, C., Cuzon, G. & Gaxiola, G. (2014). Probiotic effect of FLOC on *Vibriosis* in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 424, 215-219.
- Akter, R., Motiur, M.R., Rakibul, I.H.M., Islam, S. & Uddin, A. (2017). Role of different types of probiotics in pond ecosystem, in prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) health and production. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 5(3), 83-87.
- Aly, S.M., Mohamed, M.F. & John, G. (2008). Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*, 39(6), 647-656.
- Ajadi, A., Sabri, M.Y., Atata, J.A., Daodu, O.B. & Emikpe, B.O. (2019). Pathology and immunohistochemical evaluation of *Vibrio alginolyticus* infection in *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Clinical Pathology*, 28(2), 359-368.
- Andrade, O.S., Erosa, V.G. & Nevárez, M.G.V. (2015). Amonio-oxidasas bacterianas y arqueales involucradas en el ciclo del nitrógeno. *Terra Latinoamericana*, 33(3), 233-245.
- Angthong, P., Uengwetwanit, T., Arayamethakorn, S., Chaitongsakul, P., Karoonuthaisiri, N. & Rungrassamee, W. (2020). Bacterial analysis in the early developmental stages of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Scientific Reports*, 10, 1–12
- Araújo, C., Muñoz-Atienza, E., Pérez-Sánchez, T., Poeta, P., Igrejas, G., Hernández, P.E., Herranz, C., Ruiz-Zarzuola, I. & Cintas, L. M. (2015). Nisin Z production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* WA2-67 of aquatic origin as a defense mechanism to protect rainbow trout

- (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) against *Lactococcus garvieae*. *Marine Biotechnology*, 17(6), 820-830.
- 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(1-4), 127-136.
 - Avnimelech, Y. (2007). Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture*, 264(1-4), 140-147.
 - Avnimelech Y. (2009). *Biofloc Technology - A practical Guide Book*. Los Angeles: The World Aquaculture Society. Estados Unidos de América.
 - Avnimelech Y. (2012). *Biofloc Technology - A Pratical Guide Book*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, Estados Unidos de América. 2. Ed.
 - Azim, M.E. & Little, D.C. (2008). The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 283(1-4), 29-35.
 - Balcázar, J.L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D. & Múzquiz, J.L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114(3-4), 173-186.
 - Balcázar, J.L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, J.L. & Girones, O. (2008). Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture*, 278(1-4), 188-191.
 - Ballester, E.L.C., Abreu P.C., Cavalli, R.O., Emerenciano, M., Abreu, L. & Wasielesky Jr. W. (2010). Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system. *Aquaculture Nutrition*, 16(2), 163-172.
 - Ballester, E.L.C., Marzarotto, S.A., Silva de Castro, C., Frozza, A., Pastore, I. & Abreu, P.C. (2017). Productive performance of juvenile freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* in biofloc system. *Aquaculture Research*, 48(9), 4748-4755.
 - Bartelme, R.P., McLellan, S.L. & 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), 1-18.

- Bartie, K. L., Huys, G., Swings, J., Oanh, D. T. H., Phuong, N. T., Shariff, M., & Giacomini, M. (2005, February). The Asiasist Project: a study of antimicrobial resistance associated with Asian aqua-cultural environments. In *Workshop on Antibiotic Resistance in Asian Aquaculture Environments* (pp. 24-25).
- Bauer, R. (2011). Amphidromy and migrations of freshwater shrimps. I. Costs, benefits evolutionary origins and an unusual case of amphidromy. In: A. Asakura (ed.). *New frontiers in crustacean biology. Proceedings of The Crustacean Society summer meeting, Tokyo, 20-24 September 2009*, Brill, Leiden, 145-156.
- Beardsley, C., Moss, S., Malfatti, F. & Azam, F. (2011). Quantitative role of shrimp fecal bacteria in organic matter fluxes in a recirculating shrimp aquaculture system. *FEMS Microbiology Ecology*, 77(1), 134-145.
- Becerra, M.J., Martínez, L.R., Martínez, M., Hernández, J., López, J.A. & 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*, 5(45), 944-948.
- Bibiano. C.L., Garfias, S.J. & Llanos, A.H. (2005). Sistemas de ablandamiento del agua y su influencia en la respuesta fisiológica del langostino *Macrobrachium rosenbergii*. *Estudios del Museo de Ciencias Naturales de Álava*, (20), 5-18.
- Boada Mata, B. S. (2016). Substratos y bioflocs en el cultivo de *Macrobrachium rosenbergii* en altas densidades durante la etapa de engorde. [Tesis de maestría]. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Boyd, C., Zimmermann, S. (2000). Growout systems: water quality and soil management. In: New WM, Valenti W (eds). *Freshwater prawn culture: the farming of Macrobrachium rosenbergii*. London: Blackwell-Science. 221-238.
- Boonthai, T., Vuthiphandchai, V. & Nimrat, S. (2011). Probiotic bacteria effects on growth and bacterial composition of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture Nutrition*, 17(6), 634-644.
- 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.
- Burford, M.A., Thompson, P.J., McIntosh, R.P., Bauman, R.H. & Pearson, D.C. (2003).

Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture*, 219(1-4), 393-411.

- Buschmann, A. (2007). Impacto ambiental de la acuicultura el estado de la investigación en Chile y el mundo. 67p. Terram, Chile.
- Cai, Y., Yuan, W., Wang, S., Guo, W., Li, A., Wu, Y., Chen, X., Ren, Z. & Zhou, Y. (2019). In vitro screening of putative probiotics and their dual beneficial effects: To white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae and to the rearing water. *Aquaculture*, 498, 61-71.
- Cano-Lozano, J.A., Diaz, L.M.V., Bolivar, J.F.M., Hume, M.E. & Pardo, R.Y.R. (2021). Probiotics in tilapia (*Oreochromis niloticus*) culture: Potential probiotic *Lactococcus lactis* culture conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*.
- Cardona, E., Gueguen, Y., Magré, K., Lorgeoux, B., Piquemal, D., Pierrat, F. & Saulnier, D. (2016). Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. *BMC Microbiology*, 16(1), 2-9.
- Carranco, M.A., Calvo, M.C. & Pérez-Gil, F. (2011). Carotenoides y su función antioxidante. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 61, 233-241.
- Chen, C.Y., Chen, P.C., Weng, F.C.H., Shaw, G.T.W. & Wang, D. (2017). Habitat and indigenous gut microbes contribute to the plasticity of gut microbiome in oriental river prawn during rapid environmental change. *PLoS One*, 12(7), 1-20.
- Chumpol, S., Kantachote, D., Rattanachuy, P., Vuddhakul, V., Nitoda, T. & Kanzaki, H. (2016). In vitro and in vivo selection of probiotic purple nonsulphur bacteria with an ability to inhibit shrimp pathogens: acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus* and other vibrios. *Aquaculture Research*, 48(6), 3182-3197.
- 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*, 5(5), 120-125.
- Cienfuegos, M.K., Monroy, D.M.C., Hamdan, P.A., Castro, M.J., Aguirre, G.J.F. & Bustos, M.J.A. (2018). Effect of two probiotics on bacterial community composition from biofloc system and their impact on survival and growth of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 6(2), 525-533.
- Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P. & Verstraete, W. (2007). Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*, 270(1-4), 1-14.

- Crab, R., Kochva, M., Verstraete, W. & Avnimelech, Y. (2009). Bio-flocs technology application in over-wintering of tilapia. *Aquaculture Engineering* 40(3), 105-112.
- Crab, R., Lambert, A., Defoirdt, T., Bossier, P. & Verstraete, W. (2010). The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. *Journal Applied Microbiology*, 109(5), 1643-9.
- Crab, R., Defoirdt, T., Peter, B. & Verstraete, W. (2012). Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*, 356, 351-356.
- Cruz-Leyva, M.C., Zamudio-Maya, M., Corona-Cruz, A., González-de la Cruz, J.U. & Rojas-Herrera, R.A. (2015). Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 2(4), 99-115.
- Cuéllar-Lugo, M.B., Asiain-Hoyos, A., Juárez-Sánchez, J.P., Reta-Mendiola, J.L. & Gallardo-López, F. (2018). Evolución normativa e institucional de la acuicultura en México. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 15(4), 541-564.
- Das, S., Mondal, K. & Haque, S. (2017). A review on application of probiotic, prebiotic and symbiotic for sustainable development of aquaculture. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(2), 422-429.
- Dash, G., Raman, R.P., Prasad, K.P., Marappan, M., Pradeep, M.A. & Sen, S. (2016). Evaluation of *Lactobacillus plantarum* as a water additive on host associated microflora, growth, feed efficiency and immune response of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). *Aquaculture Research*, 47(3), 804-818.
- De Grave, S., Cai, Y. & Anker, A. (2008). Global diversity of shrimps (Crustacea: Decapoda: Caridea) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595, 287-293.
- De Paiva, E., Alves, G., Otavio, L., Olivera, A. & 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.
- De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N. & Verstraete, W. (2008). The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture*, 277(3-4), 125-137.
- Defoirdt, T., Halet, D., Vervaeren, H., Boon, N., Van de Wiele, T., Sorgeloos, P., Bossier, P. & Verstraete, W. (2007). The bacterial storage compound poly- β -hydroxybutyrate protects *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbelli*. *Environmental Microbiology*, 9(2), 445-452.

- Deng, M., Chen, J., Gou, J., Hou, J., Li, D. & He, X. (2018). The effect of different carbon sources on water quality, microbial community and structure of biofloc systems. *Aquaculture*, 482, 103-110.
- Deng, Y., Xu, X., Yin, X., Lu, H., Chen, G., Yu, J., & Ruan, Y. (2019). Effect of stock density on the microbial community in biofloc water and Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) gut microbiota. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 4241–4252.
- Deng, Y. (2022). The effect of induces changes in gut microbiota on fish performance. [Tesis Doctoral]. Universidad de Wageningen, Wageningen. Países bajos.
- Díaz, G. & Wachter, C. (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latina de Microbiología*, 45(1-2), 30-40.
- Ebeling, J., Timmons, M. & Bisogni, J. (2006). Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257(1-4), 346-358.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C. & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16), 2194-2200.
- Ekasari, J., Nugroho, U. A., Fatimah, N., Angela, D., Hastuti, Y. P., Pande, G. S. J., & Natrah, F. M. I. (2021). Improvement of biofloc quality and growth of *Macrobrachium rosenbergii* in biofloc systems by chlorella addition. *Aquaculture International*, 29, 2305–2317.
- Elsabagh, M., Mohamed, R., Moustafa, E.M., Hamza, A., Farrag, F., Decamp, O., Mahmoud A.O. & Eltholth, M. (2018). Assessing the impact of *Bacillus* strains mixture probiotic on water quality, growth performance, blood profile and intestinal morphology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Nutrition*, 24(6), 1613-1622.
- Emerenciano, M., Ballester, E., Cavalli, R. & Wasielesky W. (2011). Effect of biofloc technology (BFT) on the early postlarval stage of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*: growth performance, floc composition and salinity stress tolerance. *Aquaculture International*, 19(5), 891–901.
- Emerenciano, M., Ballester, E., Cavalli, R. & 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(3), 447–457.
- Emerenciano, M., Gaxiola, G. & Cuzon, G. (2013). Biofloc technology (BFT): a review for aquaculture application and animal food industry. In Biomass now-cultivation and utilization. InTech. Croacia.
- Emerenciano, M. G. C., Martínez-Córdova, L. R., Martínez-Porchas, M., & Miranda-Baeza, A.

- (2017). Biofloc technology (BFT): a tool for water quality management in aquaculture. *Water Quality*, 5, 92-109.
- Esparza-Leal, H.M., Xavier, J.A.A. & Wasielesky, W. (2016). Performance of *Litopenaeus vannamei* postlarvae reared in indoor nursery tanks under biofloc conditions at different salinities and zero-water exchange. *Aquaculture International*, 24(5), 1435-1447.
 - Espinosa-Chaurand, L.D., Vargas-Ceballos, M.A., Guzmán-Arroyo, M., Nolasco-Soria, H., Carrillo-Farnés, O., Chong-Carrillo, O. & Vega-Villasante, F. (2011). Biología y cultivo de *Macrobrachium tenellum*: estado del arte. *Hidrobiológica*, 21(2), 98-117.
 - Espinoza, C.L.D., Vega, V.F., Nolasco, S.H., Farnés, C.O., & López, L.S. (2013). Perfil de aminoácidos del músculo de *Macrobrachium tenellum* y cómputo químico de proteínas usadas en su alimentación. *Boletim do Instituto de Pesca*, 39(4), 369-378.
 - FAO. (2009). *Macrobrachium rosenbergii*. In Cultured aquatic species fact sheets. Text by New, M. B. FAO http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Macrobrachium_rosenbergii/es (Consultado el 05/10/2019).
 - FAO. (2016). El estado mundial de la pesca y la acuicultura contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. FAO. <http://www.fao.org/3/a-i5555s.pdf> (Consultado el 18/12/2018).
 - FAO. (2017). Programa de información de especies acuáticas *Macrobrachium rosenbergii*. (De Man, 1879). FAO. <http://www.fao.org/3/y4100e/y4100e00.htm#TOC> (Consultado el 22/07/2019).
 - FAO. (2018). El Estado Mundial de la pesca y la Acuicultura. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) <http://www.fao.org/3/I9540Es/i9540es.pdf> (Consultado el 04/08/2020).
 - FAO. (2022). The state of world fisheries and aquaculture. <https://www.fao.org/3/cc0461en/cc0461en.pdf>. (Consultado el 16/10/2022).
 - Fernández-Alonso, M., Rocha, A. & Coll, J.M. (2001). DNA vaccination by immersion and ultrasound to trout viral haemorrhagic septicaemia virus. *Vaccine*, 19(23-24), 3067-3075.
 - Ferreira, G.S., Bolivar, N.C., Pereira, S.A., Guertler, C., do Nascimento, V. F. & Mouriño, J.L.P. (2015). Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 448, 273-279.
 - Ferreira, M.G.P., Melo, F.P., Lima, J.P.V., Andrade, H.A., Severi, W. & Correia, E.S. (2017).

- Bioremediation and biocontrol of commercial probiotic in marine shrimp culture with biofloc. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45(1), 167-176.
- Fimbres, A.Y.E. (2015). Caracterización de los nutrientes de interés hidropónico contenidos en la fracción particulada residual de cultivo de tilapia (*Oreochromis* spp.). [Tesis de Maestría]. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C. La Paz, Baja California, Sur. México.
 - Frozza, A., Fiorini, A., Vendruscolo, E.C.G., Rosado, F.R., Konrad, D., Rodrigues, M.C.G. & Ballester, E.L.C. (2021). Probiotics in the rearing of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879) in a biofloc system. *Aquaculture Research*, 52(9), 4269-4277.
 - Gaona, C.A.P., Almeida, M.S., Viau, V., Poersch, L. & Wasielesky, W. (2017). Effect of different total suspended solids levels on a *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) BFT culture system during biofloc formation. *Aquaculture Research*, 48, 1070–1079.
 - García-Bernal, M., Medina-Marrero, R., Rodríguez-Jaramillo, C., Marrero-Chang, O., Campa-Córdova, Á.I., Medina-García, R. & Mazón-Suástegui, J.M. (2018). Probiotic effect of *Streptomyces* spp. on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Nutrition*, 24(2), 865-871.
 - García-Guerrero, M.U., Becerril-Morales, F., Vega-Villasante, F. & Espinosa-Chaurand, L.D. (2013). Los langostinos del género *Macrobrachium* con importancia económica y pesquera en América Latina: conocimiento actual, rol ecológico y conservación. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41(4), 651-675.
 - Gelabert, R. (2001). Bioencapsulación en Artemia y su efecto en la alimentación de postlarvas de camarón, *Litopenaeus vannamei* [Tesis de Doctorado]. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. (México)).
 - Gelabert, R., Brito, R., Gaxiola, M.G., Castro, T. & Rosas, C. (2008). Efecto de nauplios de *Artemia franciscana* enriquecidos sobre el crecimiento, supervivencia y resistencia al estrés de postlarvas (PL5-PL40) de *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931). *Universidad y Ciencia*, 24(1), 29-40.
 - Giannenas, I., Karamaligas, I., Margaroni, M., Pappas, I., Mayer, E., Encarnaçao, P. & Karagouni, E. (2015). Effect of dietary incorporation of a multi-strain probiotic on growth performance and health status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(1), 119-128.
 - Ghosh, A.K., Bir, J., Azad, M.A.K., Hasanuzzaman, A.F.M., Islam, M.S. & Huq, K.A. (2016). Impact of commercial probiotics application on growth and production of giant freshwater

- prawn (*Macrobrachium Rosenbergii* De Man, 1879). *Aquaculture Reports*, 4, 112-117.
- González-de la Cruz, J.U., Delfín-González, H., Cruz-Leyva, M.C., Rojas-Herrera, R.A. & Zamudio-Maya, M. (2011). Protocolo para la extracción de ADN metagenómico bacteriano del langostino *Macrobrachium carcinus* L. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14(3), 875-883.
 - Gueimonde, M., Jalonen, L., He, F., Hiramatsu, M. & Salminen, S. (2006). Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli. *Food Research International*, 39(4), 467-471.
 - Guo, F., Zhang, S.H., Yu, X. & 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(11), 6421-6428.
 - Gupta, A. & Dhawan, A. (2013). Probiotic based diets for freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Indian Journal of Fish*, 60(1), 103-109.
 - 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(1), 135-146.
 - Guzmán-Arroyo, M. 1987. Biología, ecología y pesca del langostino *Macrobrachium tenellum* (Smith, 1871), en lagunas costeras del estado de Guerrero, México. [Tesis de Doctorado] Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Colegio de Ciencias y Humanidades, UNAM. D.F., México.
 - Hai, N.V., Buller, N. & Fotedar, R. (2009). Effects of probiotics (*Pseudomonas synxantha* and *Pseudomonas aeruginosa*) on the growth, survival and immune parameters of juvenile western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896). *Aquaculture Research*, 40(5), 590-602.
 - Hapsari, F. (2016). The effect of fermented and non-fermented biofloc inoculated with bacterium *Bacillus cereus* for catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, 9(2), 334-339.
 - Hargreaves, J. A. (2013). *Biofloc production systems for aquaculture* (Vol. 4503, pp. 1-11). Stoneville, MS: Southern Regional Aquaculture Center.
 - Hasan, B., Guha, B. & Datta, S. (2012). Efficacy of Probiotics on Growth and Sustainable Production of Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius 1798 in Brackishwater Ponds of West Bengal, India. *Asian Fisheries Science*, 25(4), 303-316.
- Hendrickx, M.E. (1995). Camarones. En: W. Fischer, F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K.E. Carpenter y V.

- H. Niem (eds). Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico Centro-Oriental. Plantas e invertebrados 1. Roma, Italia: 417-422 pp.
- Henríquez, P. (2013). Caracterización de propiedades probióticas de microorganismos del tracto digestivo de salmónidos [Tesis de maestría]. Universidad de Chile, Santiago, Chile.
 - Hernández-Mancipe, L.E., Londoño-Velez, J.I., Hernández-García, K.A. & Torres Hernández, L.C. (2019). The biofloc systems: an efficient strategy in the aquaculture production. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 14(1), 70-99.
 - Hoang, M.N., Nguyen, P.N. & Bossier, P. (2020). Water quality, animal performance, nutrient budgets and microbial community in the biofloc-based polyculture system of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* and gray mullet, *Mugil cephalus*. *Aquaculture*, 515, 734610.
 - Hu. X., Cao, Y., Wen, G., Zhang, X., Xu. Y., Xu, W., et al. (2017). Effect of combined use of *Bacillus* and molasses on microbial communities in shrimp cultural enclosure systems. *Aquaculture Research*, 48(6), 2691-2705.
 - Hua, K., Cobcroft, J.M., Cole, A., Condon, K., Jerry, D.R., Mangott, A., Praeger, C., Vucko M.J., Zeng, C., Zenger & Strugnell, J.M. (2019). The Future of Aquatic Protein: Implications for Protein Sources in Aquaculture Diets. *One Earth*, 1(3), 316-329.
 - Ibrar, M., Zuberi, A., Amir, I., Imran, M. & Noor, Z. (2017). Effect of probiotic *Geotrichum candidum* on early rearing of *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 17(6), 1263-1270.
 - Imaizumi, K., Tinwongger, S., Kondo, H. y Hirono, I. (2021). Analysis of microbiota in the stomach and midgut of two penaeid shrimps during probiotic feeding. *Scientific Reports*. 11(9936), 1-14.
 - INAPESCA. (2018). Acuicultura Langostino Malayo. <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuicultura-langostino-malayo>. (Consultado el 13/10/2022).
 - Ismael, D. & New, M.B. (2000). Biology. In M.B. New & W.C. Valenti, eds. Freshwater prawn culture: the farming of *Macrobrachium rosenbergii*. Oxford, England, Blackwell, *Science*, 18-40.
 - Jakhar, V., Sihag, R.C. & Gahlawat, S.K. (2016). Effect of probiotics on immunological status of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man). *Indian Journal of Animal Research*, 50(6), 930-935.
 - John, G., Mohamed, R.R., Kolanchinathan, P. & Balasundaram, A. (2018). Nutritional Value of Two Bacterial Strains *Bacillus subtilis* RCMB21 and *Pseudomonas fluorescens* RCMB39 as

- Feed Supplement for Freshwater Prawn *Macrobrachium malcolmsonii*. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 13, 282-294.
- Johnson, S., & Bueno, S. (2000). Health management. In: New WM, Valenti W (eds). Freshwater prawn culture: the farming of *Macrobrachium rosenbergii*. London: Blackwell-Science. 239-253.
 - Ju, F. & Zhang, T. (2015). Bacterial assembly and temporal dynamics in activated sludge of a full-scale municipal wastewater treatment plant. *The ISME Journal*, 9(3), 683.
 - Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J. & Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274(1), 1-14.
 - Keysami, M.A., Saad, C.R., Sijam, K., Daud, H.M. & Alimon, A.R. (2007). Effect of *Bacillus subtilis* on growth development and survival of larvae *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Nutrition*, 13(2), 131-136.
 - Kim, M.S., Min, E., Kim, J.H., Koo, J.K. & Kang, J.C. (2015). Growth performance and immunological and antioxidant status of Chinese shrimp, *Fennerpenaeus chinensis* reared in bio-floc culture system using probiotics. *Fish & Shellfish Immunology*, 47(1), 141-146.
 - Kim, Y. S., Kim, S. E., Kim, S. J., Jung, H. K., Park, J., Jeon, Y. J., ... & Kim, K. H. (2021). Effects of wheat flour and culture period on bacterial community composition in digestive tracts of *Litopenaeus vannamei* and rearing water in biofloc aquaculture system. *Aquaculture*, 531, 735908.
 - Kimoto, H., Kurisaki, J., Tsuji, N.M., Ohmomo, S. & Okamoto, T. (1999). *Lactococci* as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. *Letters in Applied Microbiology*, 29(5), 313-316.
 - King, R.C. (1994). Growth and survival of red claw crayfish hatchlings (*Cherax quadricarinatus*, Von Martens) on the relative suitability of *Cherax quadricarinatus* and *Cherax destructor* for culture in Queensland. *Aquaculture*, 122(1), 77-80.
 - Kumar, N.R., Raman, R.P., Jadhao, S.B., Brahmchari, R.K., Kumar, K. & Dash, G. (2013). Effect of dietary supplementation of *Bacillus licheniformis* on gut microbiota, growth, and immune response in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). *Aquaculture International*, 21(2), 387-403.
 - Kumar, A.G., Bir, J., Azad, M.A.K., Hasanuzzaman, A.F.M., Islam, M.S. & Huq, K.A. (2016). Impact of commercial probiotics application on growth and production of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* De Man, 1879). *Aquaculture Reports*, 4, 112-117.

- Le, T.H., Hoa, N.V., Sorgeloos, P. & Van Stappen, G. (2019). *Artemia* feeds: a review of brine shrimp production in the Mekong Delta, Vietnam. *Reviews in Aquaculture*, 11(4), 1169-1175.
- Lee, C., Kim, S., Lim, S. J. & Lee, K. J. (2017). Supplemental effects of biofloc powder on growth performance, innate immunity, and disease resistance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 20(1), 1-7.
- Lima, J.D.F., Garcia, J.D.S. & Silva, T.C.D. (2014). Natural diet and feeding habits of a freshwater prawn (*Macrobrachium carcinus*: Crustacea, Decapoda) in the estuary of the Amazon River. *Acta Amazonica*, 44(2), 235-244.
- Liu, G., Zhu, S., Liu, D., Guo, X. & Ye, Z. (2017). Effects of stocking density of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) on immunities, antioxidant status, and resistance against *Vibrio harveyi* in a biofloc system. *Fish & Shellfish Immunology*, 67, 19-26.
- Llario, F., Romano, L.A., Rodilla, M., Sebastiá-Frasquet, M.T. & Poersch, L. H. (2020). Application of *Bacillus amyloliquefaciens* as probiotic for *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) cultivated in a biofloc system. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 19(2), 904-920.
- López, J.B., Quintero, G., Guevara, A.L., Jaimes, D.C., Gutiérrez, S.M. & García, J.M. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Revista Nova*, 4(5), 5-6.
- Luis-Villaseñor, I.E., Voltolina, D., Audelo-Naranjo, J.M., Pacheco-Marges, M.R., Herrera-Espericueta, V.E. & Romero-Beltrán, 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(3), 3726.
- Luo, G., Gao, Q., Wang, C., Liu, W., Sun, D., Li, L. & 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. & Liu, Z. Nitrogen dynamics, bacterial community composition and biofloc quality in biofloc-based systems cultured *Oreochromis niloticus* with poly- β -hydroxybutyric and polycaprolactone as external carbohydrates. *Aquaculture*. 2017(479), 732-741.
- Mansour, A.T. & Esteban M.A. (2017). Effect of carbon sources and plant protein levels in a biofloc system on growth performance, and the immune and antioxidant status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*. 64, 202-209.

- Martins, P., Cleary, D.F. Pires, A.C. Rodrigues, A.M., Quintino, V., Calado, R. & Gomes, N.C. (2013). Molecular analysis of bacterial communities and detection of potential pathogens in a recirculating aquaculture system for *Scophthalmus maximus* and *Solea senegalensis*. *Plos One*, 8(11), 1-17.
- Maya, S.G., Monroy, M.C.D., Hamdan, A.P., Castro, J.M., Rodríguez, G.A. & Rodríguez, G.A.M. (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*, 4(3), 421-427.
- McDowall, R. (2007). On amphidromy, a distinct form of diadromy in aquatic organisms. *Fish Fish*, 8(1), 1-13.
- Melgar Valdes, C.E., Barba Macías, E., Álvarez-González, C.A., Tovilla Hernández, C. & Sánchez, A.J. (2013). Efecto de microorganismos con potencial probiótico en la calidad del agua y el crecimiento de camarón *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae) en cultivo intensivo. *Revista de Biología Tropical*, 61(3), 1215-1228.
- Méndez, Y. (2017). Requerimientos de proteína y energía en juveniles de langostino de río *Macrobrachium americanum* (Bate, 1868). [Tesis de Doctorado]. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste.
- Mendoza, R., Aguilera, C. & Montemayor, J. (2000). Utilización de subproductos avícolas en las dietas para organismos acuáticos. 398-439 En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México.
- Miao, S., Zhu, J., Zhao, C., Sun, L., Zhang, X. & Chen, G. (2017). Effects of C/N ratio control combined with probiotics on the immune response, disease resistance, intestinal microbiota and morphology of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Aquaculture*, 476, 125-133.
- Miranda, B.A., Mariscal, L.M.A., López, E.J.A., Rivas, V.M.E., Emerenciano, M. & Sánchez, R.A. (2017). Effect of inoculation of the cyanobacteria *Oscillatoria* sp. on tilapia biofloc culture. *Aquacuaculture Research*, 48(9), 4725– 4734.
- Mohammadian, T., Nasirpour, M., Tabandeh, M. R., Heidary, A.A., Ghanei-Motlagh, R. & Hosseini, S.S. (2019). Administrations of autochthonous probiotics altered juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* health status, growth performance and resistance to

- Lactococcus garvieae*, an experimental infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 86, 269-279.
- Monroy M.C., De Lara R., Castro J., Castro G. & Emerenciano M. (2013). Microbiology community composition and abundance associated to biofloc in tilapia aquaculture. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 48(3), 511-520.
 - Monroy, M.C., Rodríguez, G., Castro, J. & Becerril, D. (2015). Importance and function of microbial communities in aquaculture systems with no water exchange. *Scientific Journal of Animal Science*, 4(9), 103-110.
 - Mujeeb, R.K.M., Jesmi, Y., Hatha, M.A.A. & Thomas, A. (2017). Bacterial Diversity of Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii* and Screening for Probiotic Potential Bacteria. *Journal of Aquatic and Marine Sciences*, 1(1), 101.
 - Murphy, N. & C. Austin. (2005). Phylogenetic relationships of the globally distributed freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae): biogeography, taxonomy, and the convergent evolution of abbreviated larval development. *Zoologica Scripta*, 34(2), 187-197.
 - Najdegerami, E.H., Bakhshi, F. & Lakani, F.B. (2016). Effects of biofloc on growth performance, digestive enzyme activities and liver histology of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings in zero-water exchange system. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(2), 457-65.
 - Ndi, O.L. & Barton, M.D. (2012). Resistance determinants of *Pseudomonas* species from aquaculture in Australia. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 3(1), 1-6.
 - Negrini, C., Castro, C.S.D., Bittencourt-Guimarães, A.T., Frozza, A., Ortiz-Kracizy, R. & Cupertino-Ballester, E.L. (2017). Stocking density for freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda, Palaemonidae) in biofloc system. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45(5), 891-899.
 - NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-061-ZOO-1999, ESPECIFICACIONES ZOOSANITARIAS DE LOS PRODUCTOS ALIMENTICIOS PARA CONSUMO ANIMAL
http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=2061633&fecha=31/12/1969 (Consultado el 10/10/2020).
 - Ortega-Cabello, L., Perez-Méndez, H. I., Manjarrez-Alvarez, N., Solís-Oba, A. & López-Luna, A. (2017). Efecto de las sales de hierro en *Rhodococcus* sp. y *Gordonia* sp. en la producción de carotenoides. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16(1), 1-10.
 - Padmavathi, P., Sunitha. K. & Veeraiah K. (2012). Efficacy of probiotics in improving water

- quality and bacterial flora in fish ponds. *African Journal of Microbiology Research*, 6(49), 7471-7478.
- Ossa, J.A., Venegas, M.C., Badillo, A.M. (2010). Evaluación de la melaza de caña como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus platarum*. *Actualidad & Divulgación Científica*. 13(1), 97-104.
 - Pandiyan, P., Balaraman, D., Thirunavukkarasu, R., George, E., Subaramaniyan, K., Manikkam, S. & Sadayappan, B. (2013). Probiotics in aquaculture. *Drug Invention Today*, 5(1), 55-59.
 - Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., Hirono, I., Kobayashi, T., Sugita, H., Puangkaew, J. & Aoki, T. (2007). Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Developmental & Comparative Immunology*, 31(4), 372-382.
 - Penny, C., Gruffaz, C., Nadalig, T., Cauchie, H.M., Vuilleumier, S. & Bringel, F. (2015). Tetrachloromethanedegrading bacterial enrichment cultures and isolates from a contaminated aquifer. *Microorganisms*, 3(3), 327– 343.
 - Pérez-Chabela, M.L., Alvarez-Cisneros, Y.M., Soriano-Santos, J., & Pérez-Hernández, M. A. (2020). The probiotics and their metabolites in aquaculture. A review. *Hidrobiologica*, 30(1), 93-105.
 - Pieters, N., Brunt, J., Austin, B. & Lyndon, A. R. (2008). Efficacy of in-feed probiotics against *Aeromonas bestiarum* and *Ichthyophthirius multifiliis* skin infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, 105(3), 723-732.
 - Poleo, G., Aranbarrio, J.V., Mendoza, L. & Romero, O. (2011). Cultivo de cachama blanca en altas densidades y en dos sistemas cerrados. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 46(4), 429-437.
 - Poljaroen, J., Tinikul, Y., Tinikul, R., Anurucpreeda, P. & Sobhon, P. (2017). Leptin-like immunoreactivity in the central nervous system, digestive organs, and gonads of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Acta Histochemica*, 119(5), 569-581.
 - Ponce-Palafox J.T., García-Ulloa, G.M., Arredondo-Figueroa, J.L., Hernández-Ocampo, D. Díaz-Álvarez, Aldama-Rojas J.G. & Esparza-Leal, H. (2006). El cultivo del camarón de agua dulce *Macrobrachium tenellum* en estanques rústicos, en Comunicación Científica, IV Congreso Iberoamericano. *Virtual de Acuicultura*, 655-660.
 - Prabu, E., Rajagopalsamy, C.B., Ahilan, B., Jeevagan, I.J. & 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(8), 3426-3434.

- Quevedo, O.K.G. (2020). Aislamiento y caracterización de *Lactobacillus* sp. con potencial probiótico *in vitro* frente a patógenos de trucha arcoíris. [Tesis de Maestría]. Universidad Peruana Cayetano Heredia. [Tesis de Maestría]. Lima, Perú.
- Ramírez-Torrez, J.A., Monroy-Dosta, M.D.C., Hernández Hernández, L.H., Bustos-Martínez, J., Hamdan-Partida, A., Castro-Mejía, J., & Orozco-Rojas, D.I. (2019). Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth and digestive enzymes activity fed with autochthonous probiotics. *Hidrobiológica*, 29(2), 73-81.
- 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.
- Ren, P., Xu, L., Yang, Y., He, S., Liu, W., Ringø, E. & Zhou, Z. (2013). *Lactobacillus planarum* subsp. *plantarum* JCM 1149 vs. *Aeromonas hydrophila* NJ-1 in the anterior intestine and posterior intestine of hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* *Oreochromis aureus*: An ex vivo study. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(1), 146-153.
- Ridha, M.T. & Azad, I.S. (2012). Preliminary evaluation of growth performance and immune response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* supplemented with two putative probiotic bacteria. *Aquaculture Research*, 43(6), 843-852.
- Rivas-Vega, M.E., Goytortúa-Bores, E., Ezquerro-Brauer, J.M, Salazar-García, M.G., Cruz-Suárez, L.E., Nolasco-Soria, H. y Civera-Cerecedo, R. (2006). Nutritional value of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) meals as ingredients in diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). *J. Food Chemistry*, 97(1), 41-49.
- Rodríguez, L.E.C., Liano, R.S., Montes, P.J.G., Mascena, Í.F.B. & de Souza, E.D.C. (2018). Culture of Nile tilapia in a biofloc system with different sources of carbon. *Revista Ciencia Agronomica*, 49(3), 458-466.
- Román-Contreras, R. (1979). Contribución al conocimiento de la biología y ecología de *Macrobrachium tenellum* (Smith)(Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). *In Anales del Centro de Ciencias del Mar y limnología*, 6, (2), 137-160).
- Safari, R., Adel, M., Lazado, C.C., Caipang, C.M. & Dadar, M. (2016). Host-derived probiotics *Enterococcus casseliflavus* improves resistance against *Streptococcus iniae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) via immunomodulation. *Fish & Shellfish Immunology*,

52, 198-205.

- Samocha, T.M., Patnaik, S., Speed, M., Ali, A.M., Burger, J.M., Almeida, R.V., Ayub, Z., Harisanto, M., Horowitz, A. & Brock, D.L. (2007). Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. *Aquacultural Engineering*, 36(2),184–191.
- Sánchez-Ceja, M., Arceo-Martinez, T., Sandoval-Flores, G., Alva-Murillo, N., Jimenez-Mejia, R. & Loeza-Lara, D. (2018). Use of nisin and chitosan for the inhibition of antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* bovine mastitis-associated. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 9(4), 792-810.
- Sánchez-Ortiz, A.C., Angulo, C., Luna-González, A., Álvarez-Ruiz, P., Mazón-Suástegui, J.M. & Campa-Córdova, Á. I. (2015). Effect of mixed-*Bacillus* spp isolated from pustulose ark *Anadara tuberculosa* on growth, survival, viral prevalence and immune-related gene expression in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 59, 95-102.
- Sanz, Y., Collado, C. & Dalmau, J. (2003). Probióticos: Criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta Pediátrica Española*, 61(9), 476-482.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., *et al.* (2009). Introducing Mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), 7537–7541.
- Seenivasan, C., Bhavan, P.S. & Radhakrishnan, S. (2011). Effect of probiotics (Binifit™) on survival, growth, biochemical constituents, and energy budget of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* post larvae. *Elixir Aquaculture*, 41, 5919-5927.
- Seenivasan, C., Bhavan, P. S., Radhakrishnan, S. & Muralisankar, T. (2012). Effects of probiotics on survival, growth and biochemical constituents of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* post larvae. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12(2), 331-338.
- Seenivasan, C., Radhakrishnan, S., Shanthi, R., Muralisankar, T.Y, & Bhavan, P.S. (2015). Influence of probiotics on survival, growth, biochemical changes and energy utilization performance of *Macrobrachium rosenbergii* post-larvae. In *Proceedings of the Zoological Society*, 68(1), 74-83.
- Severiche, C., Castillo, M. & Acevedo, B. (2013). Manual de métodos analíticos para la Determinación de Parámetros Físicoquímicos Básicos en Aguas. 1a ed. Fundación Universitaria Andaluza Inca Garcilaso. Cartagena de Indias, Colombia, 95.

- Silvera, D. G. (2018). Efectos del consumo de pienso comercial excedente con el perfil de ácidos grasos de la fauna marina agregada a piscifactorías. *Revista AquaTIC*, (48), 8-10.
- Sriket, C., Benjakul, S. & Visessanguan, W. (2011). Characterization of proteolytic enzymes from muscle and hepatopancreas of freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(1), 52-59.
- Song, A.A.L., In, L.L., Lim, S.H.E. & Rahim, R.A. (2017). A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 55.
- Souza, B., Stringuetta, L., Bordignon, A., Bohnenberger, L., Boscolo, W. & Feiden, A. (2009). Polyculture of freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) with Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) feeding with ration pelleted and mashed. *Ciencias Agrarias*, 30(1), 225-232.
- Suita, S.M., Ballester, E.L.C., Abreu, P.C.O.V.D. & Wasielesky Junior, W. (2015). Dextrose as carbon source in the culture of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a zero exchange system. *Latin American Journal and Aquatic Research*, 43(3), 526-533.
- Sumon, M.S., Ahmmed, F., Khushi, S.S., Ahmmed, M.K., Rouf, M.A., Chisty, M.A.H. & Sarower, M.G. (2018). Growth performance, digestive enzyme activity and immune response of *Macrobrachium rosenbergii* fed with probiotic *Clostridium butyricum* incorporated diets. *Journal of King Saud University-Science*, 30(1), 21-28.
- Supriatna, A., Nurhatijah, N., Sarong, M.A. & Muchlisin, Z.A. (2019). Effect of biofloc density and crude protein level in the diet on the growth performance, survival rate, and feed conversion ratio of Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon*). In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 348, No. 1, p. 012131). IOP Publishing.
- Tacon, A.G.J. y Metian M. (2015). Feed Matters: Satisfying the Feed Demand of Aquaculture, Reviews. *Fisheries Science & Aquaculture*. 23(1), 1-10.
- Taniguchi, A. & Eguchi, M. (2020). Community structure of actively growing bacteria in a coastal fish-farming area. *PLoS One*, 15, 1–12.
- Tendencia E.A., De la Peña L.D. (2001). Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture*, 195, 193–204.
- Thakuria, D., Schmidt, O., Siúrtáin, M.M., Egan, D. & Doohan, F.M. (2008). Importance of DNA quality in comparative soil microbial community structure analyses. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(6), 1390–1403.
- Thurlow, C.M., Williams, M.A., Carrias, A., Ran, C., Newman, M., Tweedie, J. & Liles, M.R. (2019). *Bacillus velezensis* AP193 exerts probiotic effects in channel catfish (*Ictalurus*

- punctatus*) and reduces aquaculture pond eutrophication. *Aquaculture*, 503, 347-356.
- Tzeng, T.D., Pao, Y.Y., Chen, P.C., Weng, F.C.H., Jean, W.D. & Wang, D. (2015). Effects of host phylogeny and habitats on gut microbiomes of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*). *PLoS One*, 10(7).
 - Valencia, D. y Campos, M. (2007). Freshwater prawns of the genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) of Colombia. *Zootaxa*, 1456, 1-44.
 - Valverde, O.V., Avalos, W.R., Espinoza, S.M. & Barrera, C.Y. (2016). Hemocitos y oxihemocianina en hembras de *Cryphiops caementarius* Molina 1782 (Crustacea: Palaemonidae) criadas a diferentes salinidades. *Revista AquaTIC*, (40), 11-20.
 - Valverde, J. (2021). Una contribución al entendimiento sobre el cultivo en fases del langostino *Macrobrachium rosenbergii* en Costa Rica. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(4).
 - Vaseeharan, B.A.R.P. & Ramasamy, P. (2003). Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology*, 36(2), 83-87.
 - Vázquez-Silva, G., Ramírez-Saad, H.C., Aguirre-Garrido, J.F., Mayorga-Reyes, L., Azaola-Espinosa, A. & Morales-Jiménez, J. (2017). Effect of bacterial probiotics bio-encapsulated into *Artemia franciscana* on weight and length of the shortfin silverside (*Chirostoma humboldtianum*), and PCR-DGGE characterization of its intestinal bacterial community. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45(5), 1031-1043.
 - Vega-Villasante, F., Martínez-López, E., Espinosa Chaurand, L., Cortés-Lara M. & Nolasco-Soria, H. (2011). Crecimiento y supervivencia del langostino (*Macrobrachium tenellum*) en cultivos experimentales de verano y otoño en la costa tropical del Pacífico mexicano. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14(2), 581-588.
 - Vega-Villasante, F., García-Guerrero, M.U., Cortés-Jacinto, E., Yamasaki-Granados, S., Montoya-Martínez, C.E., Vargas-Ceballos, M.A. & Nolasco-Soria, H.G. (2014). Los camarones de agua dulce del género *Macrobrachium*: biología, ecología y explotación. Temas sobre investigaciones costeras. Universidad de Guadalajara, Jalisco, 273-315.
 - Vieites, J.M., Guazzaroni, M.E., Beloqui, A., Golyshin, P.N., Ferrer, M. (2008). Metagenomics approaches in systems microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(1), 236-255.
 - Villamil, L. & Martínez, M. (2009). Probióticos como herramienta biotecnológica en el cultivo de camarón: reseña. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras* 38(2), 165-187.

- Wang, Y. & Gu, Q. (2010). Effect of probiotics on white shrimp (*Penaeus vannamei*) growth performance and immune response. *Marine Biology Research*, 6(3), 327-332.
- Wang, Y.C., Hu, S.Y., Chiu, C.S. & Liu, C.H. (2019). Multiple-strain probiotics appear to be more effective in improving the growth performance and health status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, than single probiotic strains. *Fish & shellfish immunology*, 84, 1050-1058.
- Wu, L., Peng, C., Peng, Y. & Ma, Y. (2012). Effect of Wastewater COD/N Ratio on Aerobic Nitrifying Sludge Granulation and Microbial Population Shift. *Journal of Environmental Sciences*, 234-241.
- Wasielesky Jr., W., Atwood, H., Stokes, A. & Browdy, C.L. (2006). Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 258(1-4), 396-403.
- Wee, W.C., Mok, C.H., Romano, N., Ebrahimi, M. & Natrah, I. (2018). Dietary supplementation use of *Bacillus cereus* as quorum sensing degrader and their effects on growth performance and response of Malaysian giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii* juvenile towards *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Nutrition*, 24(6), 1804-1812.
- Wei, Y.F., Liao, S.A. & Wang, A.L. (2016). The effect of different carbon sources on the nutritional composition, microbial community and structure of bioflocs. *Aquaculture*, 465, 88-93.
- Wei, G., Shan, D., Li, G., Li, X., Tian, R., He, J., & Shao, Z. (2020). Prokaryotic communities vary with floc size in a biofloc-technology based aquaculture system. *Aquaculture*, 529, 735632.
- Widanarn, E.J. & Maryam, S. (2012). Evaluation of biofloc technology application on water quality and production performance of red tilapia *Oreochromis* sp. Cultured at different stocking densities. *HAYATI Journal of Biosciences*, 19(2), 73-80.
- Wilén, B. M., Onuki, M., Hermansson, M., Lumley, D. & 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.
- Xu, W.J., Pan, L.Q., Sun, X.H. & Huang, J. (2013). Effects of bioflocs on water quality, and survival, growth and digestive enzyme activities of *Litopenaeus vannamei* (Boone) in zero-water exchange culture tanks. *Aquaculture Research*, 44(7), 1093-1102.
- Xue, H. B., Liu, C., Liu, Y., Wang, W. N., & Xu, B. (2021). Roles of surface layer proteins in the

regulation of *Pediococcus pentosaceus* on growth performance, intestinal microbiota, and resistance to *Aeromonas hydrophila* in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture International*, 29(3), 1373-1391.

- Yamashita. T., Emoto. T., Sasaki. N. & Hirata. K.I. (2016). Gut microbiota and coronary artery disease. *International Heart Journal*, 57, 663-671.

- Yao, M., Luo, G., Tan, H., Fan, L. & Meng, H. (2018). Performance of feeding *Artemia* with bioflocs derived from two types of fish solid waste. *Aquaculture and Fisheries*, 3(6), 246-253.
- Yilmaz, P., Parfrey, L.W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W. & Glöckner, F.O. (2014). The SILVA and “all-species living tree project (LTP)” taxonomic frame-works. *Nucleic Acids Research*, 42(1), 643–648.
- Zhai, Q., Yu, L., Li, T., Zhu, J., Zhang, C., Zhao, J., Zhang, H. & Chen, W. (2017). Effect of dietary probiotic supplementation on intestinal microbiota and physiological conditions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under waterborne cadmium exposure. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 110(4), 501-513.
- Zhang, J., Liu, Y., Tian, L., Yang, H., Liang, G. y Xu, D. (2012). Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth performance, gut morphology and stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 33(4), 1027-1032.
- Zhao, C., Zhu, J., Hu, J., Dong, X., Sun, L., Zhang, X. & Miao, S. (2019). Effects of dietary *Bacillus pumilus* on growth performance, innate immunity and digestive enzymes of giant freshwater prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). *Aquaculture Nutrition*, 25(3), 712-720.
- Zhou, X.X., Wang, Y.B. & Li, W.F. (2009). Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 287(3-4), 349-353.
- Zhou, Q., Chen, T. & Han, S. (2017). Characteristics of Bacterial Communities in Cyanobacteria-Blooming Aquaculture Wastewater Influenced by the Phytoremediation with Water Hyacinth. *Water*, 9(12), 1-11.

ANEXOS

Effect of the probiotic *Lactococcus lactis* on the microbial composition in the water and the gut of freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) cultivate in biofloc

Kathia Cienfuegos-Martínez¹ | María del Carmen Monroy-Dosta²

Aida Hamdan-Partida³ | Martha Patricia Hernández-Vergara⁴

José Felix Aguirre-Garrido⁵ | Jaime Bustos-Martínez³



¹Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico

²Departamento del Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco, Mexico City, Mexico

³Departamento de Atención a la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Xochimilco, Mexico City, Mexico

⁴Laboratorio de Cultivo y Nutrición de Crustáceos, Instituto Tecnológico de Boca del Río, Boca del Río, Mexico

⁵Grupo de Biotecnología, Bioinformática y Microbiología Ambiental, Departamento de Ciencias Ambientales, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico

Correspondence

María del Carmen Monroy-Dosta,
Departamento del Hombre y su Ambiente,
Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad
Xochimilco, Villa Quietud, Coyoacan 04960,
Mexico City, Mexico.
Email: monroydosta@hotmail.com

Funding information

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología,
Grant/Award Number: # CVU 763372;
Universidad Autónoma Metropolitana

Abstract

The prawns fed with *Lactococcus lactis* obtained 100% survival in the BFT and BFTPROB treatments compared to the CONT (80%). Regarding growth, it was observed in PROB and BFTPROB treatments, the organisms got greater weight (6.3 ± 1.6 , 6.8 ± 1.3 respectively) compared to the other treatments. The effect of *L. lactis* in the bacterial community of *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae (PL's) with initial mean weight of 0.1 g, and length 1.4 cm in biofloc, was evaluated. A randomized experimental design was used: T1:BFT: biofloc; T2:BFTPROB:biofloc+probiotic; T3:PROB:probiotic; T4:CONT:control; all in triplicate with 60 PL's/treatment. On days 64 and 127, the weight and length of prawns were determined. 15 guts/treatment were extracted and water samples to obtain bacterial DNA. Massive sequencing of 16S rRNA gene of the samples was performed. Metagenomic analysis identified 17 bacteria classes in gut and water samples. The most abundant were Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria, Flavobacteria, Actinobacteria, and Clostridia with different benefits in the prawns' health. The bacterial community in the intermediate phase was different to the final, maybe for the colonization capacity of certain bacteria that developed in each treatment. However, *L. lactis* did not affect the microbial community in prawns' gut and culture water, it attributed to the displacement of the microbial community in biofloc and other probiotics, however it was observed a better prawns' growth and survival with biofloc and probiotic treatments.

KEYWORDS

bacteria, flocs, massive sequencing, microbiome

1 | INTRODUCTION

Bacteria have a very important role in aquaculture because they develop naturally and contribute to organic matter degradation, nutrient cycling, and productivity (Martínez-Porchas et al., 2014). Some bacteria can be added to culture systems with the purpose of improving water quality, controlling diseases, improving nutrition of

cultured animals, and reducing the environmental impact of aquaculture effluents (De Schryver et al., 2008).

The application of bacteria in aquaculture systems is a production strategy aimed at sustainability, reducing the use of resources such as water and soil and limiting the use of antibiotics and chemotherapeutics in aquaculture. In this sense, one of the most used technologies in aquaculture for the manipulation of the microbiota is the

application of probiotics (Pandiyan et al., 2013), which has demonstrated benefits for the health of aquatic species and the quality of culture water, through different mechanisms of action such as stimulation of the immune response, secretion of substances that inhibit the proliferation of pathogenic microorganisms, in addition to the production of enzymes that induce the absorption of nutrients, which leads to improved growth of fish and crustaceans. Likewise, the incorporation of probiotics in aquaculture systems contributes to the reduction of nitrogenous compounds through transformation by the bacteria (Das et al., 2017; Yamashita et al., 2016). Due to this, the importance to study the intestinal microbiota of the prawns, it contributes to the knowledge of the resident bacteria with probiotic capacities that can be applied in aquaculture, because the isolated bacteria from the fish are always used and instead of bacteria from the prawns. For this reason, the study of the prawns' microbial composition is essential to know more deeply the symbiotic relationships between the microbiota and the host that influence their welfare, but also for future applications in aquaculture. In recent years, the search for new sustainable aquaculture technologies has allowed the development of biofloc culture systems, in which microbial oxide reduction processes are carried out through the addition of a carbon source (Ferreira et al., 2015). The latter allows the production of phytoplankton and zooplankton communities, which can serve as complementary food for cultured species, improve water quality, and control pathogens, in addition to decreasing environmental impact by limiting water, and waste replacements in the form of effluents (Avnimelech, 2007; Azim and Little, 2008).

Although the use of biofloc and probiotics are common practices in aquaculture, they are generally applied separately, so their effect together or separately on the intestinal microbiota and culture water of prawns (*Macrobrachium rosenbergii*) is unknown, so it is important to perform massive sequencing analysis and apply bioinformatics to identify the composition of the microbial community during their culture in biofloc, in the presence of a specific probiotic. Therefore, during the present study, the diversity and abundance of the microbial community in the culture water and the gut of the prawns cultured in biofloc and with the addition of the probiotic *Lactococcus lactis* were evaluated by determining the microbiome in the system.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Obtaining the prawns for the study

For the study, 240 post-larvae (PL's) of prawns (*Macrobrachium rosenbergii*) in stage 7 (PL7) were used, the prawns were produced in the Laboratory of Native Crustacean Cultures of the *Instituto Tecnológico de Boca del Río Veracruz* (ITBOCA), Veracruz Mexico, and were donated for the study. The PL7 were transferred to the Laboratory of Chemical Analysis of Live Food of the Department of the Man and his Environment at the UAM in Mexico City, Mexico, where they remained until they reached stage PL20.

During acclimatization and the experimental period, the post-larvae were fed twice a day (8 and 17 h), with a 1.4 mm commercial prawn feed pellet (El Pedregal, Silver Cup, Toluca, Edo Mex, MEX) with 40% crude protein and 8% lipids. At the beginning of the study, the organisms were given a ration equivalent to 7% of the biomass that was adjusted subsequently according to the increase in biomass and consumption.

2.2 | Experimental system

For the study, an experimental system of 12 rectangular plastic containers of 250 L capacity and constant aeration by hoses and diffuser stones (Emerenciano et al., 2012) was used to maintain a correct floc distribution and oxygen between 2 and 5 ± 1 mg/L. In each experimental unit, five sections of PVC tube of 15 cm length by 6 cm in diameter were placed for the prawns to use as protection and to avoid cannibalism.

During the study, water temperature was maintained at $28 \pm 0.4^\circ\text{C}$ in the experimental units by means of 120 W submersible heaters with thermostat (Lomas Thermo Jet, Mexico City, MEX) and a photoperiod of 12 h light/12 h dark (Seenivasan et al., 2012).

2.3 | Biofloc system preparation and maintenance

Before culturing the prawns in the experimental units, biofloc generation was promoted in the corresponding treatments, for which molasses was added daily as a carbon source to the experimental units with biofloc, trying to maintain a C:N ratio of 20:1 (Avnimelech, 2012), based on the calculation of the concentration of nitrogen from the commercial feed and metabolites derived from the feed, in this work it was 0.1% of the culture's biomass (Emerenciano et al., 2011). During the study, the sedimentable solids concentration was maintained at a mean of 15 mg/L. After 15 days, the composition of the biofloc was verified through optical microscopy and the presence of copepods and microorganisms such as rotifers and cyanobacteria; to maintain their formation in situ in the biofloc treatments, as well as the development of microbial communities in the culture system, molasses was added daily.

To maintain water quality during the study, in the control treatment, water was changed every third day (80%); in the probiotic treatments, 50% of the water was changed once a week; and in the biofloc and biofloc with probiotic treatments, only the water that evaporated was recovered (Avnimelech, 2012).

2.4 | Experimental design

During 127 days of culture, a completely randomized experimental design was carried out with four treatments with three replicates (Emerenciano et al., 2012) and 20 PL's/used for each replicate. Treatments: T1 consisted of prawns cultured in biofloc (BFT); T2

prawns cultured with biofloc with the addition of two doses of *L. lactis* at a concentration of 1×10^7 CFU ml⁻¹ incorporated through its bioencapsulation in *Artemia* (BFTPROB); T3 corresponded to the addition of two doses of the probiotic *L. lactis* at a concentration of 1×10^7 CFU ml⁻¹ through *Artemia*, and without biofloc (PROB); T4 cultured in clear water (CONT).

2.5 | Probiotic strains and bioencapsulation

The probiotic strains of *L. lactis* used during the evaluation were obtained from the ceparium of the Laboratory of Chemical Analysis of Live Food of the Department of Man and his Environment of the UAM in Mexico City, Mexico, from a culture in 100 ml of BHI broth incubated at 35°C until a bacterial concentration of 1×10^7 CFU ml⁻¹ was obtained, after counting in the Neubauer Improved BRAND® chamber (Sánchez-Ortiz et al., 2015). To ensure the probiotic reached the digestive tract of the prawns alive in the BFTPROB and PROB treatments, *Artemia salina* was bioencapsulated. Forty-eight hours after hatching, the bioencapsulation procedure was carried out following the methodology proposed by Gelabert et al. (2008). The content of two microcentrifuge tubes of 1 ml each with *L. lactis* at a concentration of 1×10^7 CFU ml⁻¹/each were added to the water with the *Artemia* and kept for 30 min with magnetic agitation to ensure that the cells and particles were distributed in the water and the *Artemia* consumed it. Subsequently, it was verified that the digestive tract of the *Artemia* was full by checking with a stereoscopic microscope (Olympus-zx 12), then the prawns were fed, and it happened during all the experiment one time per day (34 *Artemia* per prawn) (Vázquez-Silva et al., 2017). It is important to mention and consider that *Artemia* for PROB and BFTPROB treatments was used only as a vehicle for the addition of the probiotic.

2.6 | Biometrics and feed ration adjustment

Every 15 days, survival of the experimental prawns was determined (Seenivasan et al., 2015). In the initial, intermediate, and final phase, the prawns were weighed and measured to determine individual growth, for which the organisms were removed from their experimental unit and after removing excess moisture (King, 1994), weight gain (g) was determined with an Adventurer TM Pro OHAUS scale (Hendrickx, 1995) with a precision of 0.01, and total length, considering the measurement from the tip of the rostrum to the tip of the telson with a Scala (Dettingen, Teck) Vernier calliper with 0.1 cm of precision; according to the increase in biomass, the feed ration was adjusted to 7% of the average weight of the prawns. At the end of the experiment, the average final weight and specific growth rate (SGR) were obtained (Wee et al., 2018).

$$\text{SGR } \% \text{ day}^{-1} = \frac{\ln \text{PF} - \ln \text{PI}}{t} \times 100$$

where PI and PF are the wet weight and total length at the beginning (I) and end (F) of the experimental period, *t* is the duration in days, $\ln \text{PI}$ and $\ln \text{PF}$ are the natural logarithm of the weight and total length at the beginning and end of the growth phase.

Furthermore, the Feed Conversion Ratio (FCR) was evaluated, $\text{FCR} = \text{Total feed consumed} / \text{Total weight of product produced}$, where: $\text{Total weight of product produced} = \text{final weight of the product} - \text{starting weight of the product}$ (Emerenciano et al., 2012).

2.7 | Evaluation of water quality parameters

During the study, a weekly recording was kept of the following water quality parameters per experimental unit: water temperature (°C), pH and dissolved oxygen (DO, ppm) that were determined with a multiparameter probe (HANNA HI 9829). Nitrite (N-NO⁻ mg/L), nitrate (N-NO⁻ mg/L), and total ammonia nitrogen (TAN mg/L) concentration were determined with a HANNA Aquaculture Photometer autoanalyser (HI83203) according to HANNA standard methods (Luis-Villaseñor et al., 2016).

The concentration of sedimentable solids was determined weekly in triplicate, for which 1 L of water from the experimental units with biofloc was collected, added to Imhoff cones, and allowed to sediment for 15 to 20 min, subsequently, the volume of sedimentable material (ml/L) was determined (Avnimelech, 2012).

2.8 | Statistical analysis

At the end of the study, descriptive statistics of the results on the survival and growth (weight and length) of the prawns were performed and the normality of the data (mean, standard deviation and variance) was observed to subsequently perform an ANOVA of two ways completely randomized model to determine significant differences ($p < 0.05$) between the variables (survival, growth, and water quality parameters) and the treatments (BFT, PROB, BFTPROB and CONT). Subsequently, Tukey's multiple mean comparison test was performed with the Data analysis software JMP®, considering the p value > 0.05 .

2.9 | Extraction of DNA from the bacterial community in biofloc

2.9.1 | Extraction of DNA from the water

To determine the bacterial diversity present in the water during the intermediate and final phases of the nutritional study with the prawns (days 63 and 127), a sample of 1 L of water was taken from each experimental unit and placed in previously sterilized bottles of 1 L capacity. The samples were taken to the Microbiology and Molecular Biology laboratory, where the samples were centrifuged individually in Falcon™ tubes to obtain the concentrated flocculent material. This material was

	CONT	BFT	PROB	BFTPROB
Survival (%)	80 ± 4.1 ^c	100 ± 0 ^a	93 ± 1.3 ^b	100 ± 0 ^a
Initial average weight (g)	0.1 ± 0	0.1 ± 0	0.1 ± 0	0.1 ± 0
Intermediate average weight (g)	0.5 ± 0.1 ^c	1.9 ± 0.2 ^b	1.5 ± 0 ^b	2.1 ± 0 ^a
Final average weight (g)	4.1 ± 1.5 ^c	5.6 ± 1.5 ^b	6.3 ± 1.6 ^a	6.8 ± 1.3 ^a
SGR (%/day)	2.8 ± 0.8 ^a	3.1 ± 0.8 ^b	3.2 ± 0.5 ^b	3.3 ± 0.7 ^c
FCR	1.8 ± 0.07 ^a	1.3 ± 0.04 ^b	1.5 ± 0.03 ^c	1.3 ± 0.03 ^b
Initial length (cm)	1.4 ± 0.2	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.6 ± 0.2
Intermediate length (cm)	3.2 ± 0.2 ^b	4.5 ± 0.3 ^{ab}	4.1 ± 0.4 ^a	3.8 ± 0.1 ^{ab}
Final length (cm)	3.8 ± 0.6 ^b	6 ± 1 ^a	5.8 ± 0.7 ^a	6.5 ± 0.8 ^a

TABLE 1 Average response parameters observed during the initial, intermediate, and final time in the study with Malaysian prawns

Note: In rows, different superscript letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

Abbreviations: FCR, feed conversion ratio; SGR, specific growth rate.

placed in a 2 ml microcentrifuge tube to subsequently proceed to DNA extraction using the ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit.

2.92 | DNA extraction from the prawn's gut

In the intermediate and final phase (days 63 and 127) of the study, five prawns per treatment were euthanized without suffering by immersion in water with 400 ppm eugenol, then 3 cm of gut were dissected and extracted under aseptic conditions and placed individually in 2 ml microcentrifuge tubes and used for DNA extraction using the ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit. DNA concentrations were determined with an Eppendorf Bio-photometer (USA). The quality of the genomic DNA extraction was assessed with a 1% agarose gel (Thakuria et al., 2008).

2.10 | Massive sequencing by Illumina

Water and gut samples were placed in an ice chest and sent to the Integrated Microbiome Resource in Dalhousie University in Halifax, Nova Scotia, Canada, for massive sequencing of the 16S rRNA gene of the V4 and V5 region with Illumina MiSeq with the 300 + 300 v3 chemistry kit. PCR amplification products of the V4–V5 variable regions of the 16S rRNA gene were obtained using universal primers 515 F (Illumina adapters +5'GTGYCAGCMGCCGCGTAA3') and 926 R (Illumina adapters +5'CCGYCAATYMTTTRAGTTT3'). Multiplexing and sequencing of amplicons was performed with a double-label indexing design using 8 bp barcodes with the Nextera XT Index v2 kit (Illumina).

2.11 | Bioinformatic analysis

Bioinformatic analyses were performed using MOTHUR, version 1.39.5, following the MiSeq SOP (Schloss et al., 2009). The selected reads met the following criteria: no ambiguous bases, a minimum length of 400 bp, no homopolymers of 8 bp and above. Demultiplexing was performed with a barcode mismatch tolerance

of one base for eight-base molecular identifier tags. Operational taxonomic units (OTU's) were assigned to qualified reads with 3% dissimilarity using an average -neighbour algorithm, chimeric reads were identified and excluded using UCHIME (Edgar et al., 2011) to avoid numbers of high OTU's, using the recommended MOTHUR commands. Species diversity and richness, as well as rarefaction curves, were calculated at 97% similarity, as part of the MOTHUR alpha diversity portfolio, with the Silva bacterial reference alignment database (Yilmaz et al., 2014). Five metrics were calculated to assess bacterial communities, including the number of observed OTU's, Shannon diversity index, and Inv-S estimators.

3 | RESULTS

3.1 | Survival and growth of the prawns

The survival and the final weight of the prawns in the treatments BFT (100 ± 0), BFTPROB (100 ± 0) and PROB (93 ± 1.3) was significantly higher than that observed in the prawns in the CONT (80 ± 4.1) treatment (Table 1).

The highest weight gained (g) and SGR were obtained in the prawns subjected to the BFTPROB (3.3 ± 0.7) treatment, which was significantly higher than that observed in BFT (3.1 ± 0.8) and PROB (3.2 ± 0.5), while the lowest results were obtained with the CONT (2.8 ± 0.8) treatment, indicating a higher efficiency when incorporating biofloc and probiotics in the culture systems. According to FCR, the highest value was for the CONT treatment (1.8 ± 0.07) and the lowest were BFT and BFTPROB (1.3 ± 0.04 and 1.3 ± 0.03 respectively). The prawns in the BFTPROB (6.5 ± 0.8), BFT (6 ± 1), and PROB (5.8 ± 0.7) treatments showed significant differences with respect to the length of the final phase, compared to that observed in the CONT (3.8 ± 0.6) prawns (Table 1).

3.2 | Water quality

Water quality parameters during the study were generally within tolerance ranges to maintain efficient growth rates in the prawns,

thus, they did not affect the performance of the organisms during the study. The pH for the CONT 8.5 ± 0.5 , BFT 8.2 ± 0.5 , PROB 8.3 ± 0.7 and BFTPROB 8.3 ± 0.6 , temperature in $28 \pm 0.4^\circ\text{C}$ for all the treatments, and dissolved oxygen CONT (6.2 ± 1.3) BFT, PROB, and BFTPROB (5.9 ± 1) remained constant and controlled during the study, the sedimentable solids in the biofloc treatments remained within the acceptable values for the species BFT (13.5 ± 0.9), and BFTPROB (14 ± 1.0 ; Avnimelech, 2012; Table 2).

3.3 | Metagenomic analysis

3.3.1 | Operational taxonomic units

In the rarefaction curves of the treatments at the different phases of the experiment, the number of OTU's was assessed with respect to the number of sequences per sample of the different treatments. The treatment with the lowest number of OTU's and richness index (Chao) was PROB in the intermediate phase of the water samples (240 and 280.94 respectively) and the treatments with the highest number of OTU's and richness were BFT in the intestine (300 and 357.36 respectively) and PROB in water in the final phase (300 and 358.89 respectively; Figure 1).

3.3.2 | Diversity indices of taxonomic groups of bacteria in the intestine of prawns and culture water

The diversity of the bacterial communities' indices per experimental stages were similar in values, except for the CONT 17.70 (17.86–17.53) for the InvSimpson index and BFT 7.40 (7.48–7.33) for the InvSimpson index and 2.99 (2.98–3.00) for the Shannon index, in the intermediate phase treatments in water. About the richness (Chao) in the intermediate phase of the treatments in water samples BFT 305.93 (280.89–359.07) and BFTPROB 305.75 (284.34–354.46) were similar and in the final phase in PROB and BFT 358.89 (333.09–412.06) and 355.40 (326.90–412.20) respectively. In the final phase the highest richness and diversity were found in the PROB (309 for Sobs and 358.89 for Chao) and 35.21 (InvSimpson) and 4.07 (Shannon) treatment in prawns' gut (Table 3).

TABLE 2 Average water quality parameters recorded in the different treatments during the prawns' culture

Parameter	CONT	BFT	PROB	BFTPROB	OV for prawns
Temperature ($^\circ\text{C}$)	28 ± 0.4^a	28 ± 0.5^a	28 ± 0.4^a	28 ± 0.1^a	28–31
Dissolved oxygen (ppm)	6.2 ± 1.3^a	5.9 ± 1.0^b	5.9 ± 1.0^b	5.9 ± 0.9^b	2–5
pH	8.5 ± 0.5^a	8.2 ± 0.5^b	8.3 ± 0.7^b	8.3 ± 0.6^b	6.5–8.5
Sedimentable solids mg/L	–	13.5 ± 0.9^a	–	14 ± 1.0^a	5–15
N-Nitrite (mg/L)	0.2 ± 0.1^a	0.1 ± 0^c	0.1 ± 0^c	0.1 ± 0^c	0.2
N-Nitrate (mg/L)	12.5 ± 1.2^a	4 ± 1.0^c	7 ± 1.2^b	2.2 ± 0.5^c	7.0
TAN (mg/L)	0.7 ± 0.1^a	0.3 ± 0.2^b	0.3 ± 0.1^b	0.2 ± 0.0^c	0.50

Note: In rows, different superscripts denote significant differences ($p < 0.0001$).

OV, Optimal value (García-Guerrero et al., 2013).

3.3.3 | Microbial community

The results of the metagenomic analysis indicate that the microbial community of the water in the biofloc/probiotic treatments samples were represented by 17 populations of taxonomic classes, of which those with the highest relative abundance were: Alphaproteobacteria (40%) Betaproteobacteria (11%), Gammaproteobacteria (13%), Actinobacteria (14%), Flavobacteria (6.9%), and Sphingobacteria (8%). These classes were present in the water samples, from all treatments however, in the intermediate phase, Alphaproteobacteria were observed with higher relative abundance (50%), with respect to the final (30%). Betaproteobacteria increased their percentage in the final stage (30%) with respect to the intermediate stage (10%), whereas in the intermediate stage, the lowest percentage was for the BFT (2%) treatment and in the final stage it was for BFTPROB (5%) in the intermediate phase in the water samples. The treatments with the highest relative abundance for Actinobacteria were BFT (20%) (intermediate phase) in water samples, whereas Flavobacteria occurred more abundantly in the treatments BFT (12%) and BFTPROB (15%) at the final stage of the experiment (Figure 2).

Seventeen classes of bacteria were recorded in the gut samples, of which those with the highest relative abundance were: Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria, Flavobacteria, Actinobacteria, and Clostridia. Alphaproteobacteria, Actinobacteria and Flavobacteria members were observed with higher relative abundance in the BFTPROB treatment in the final phase (35%, 20%, 15% respectively) Betaproteobacteria were observed with a higher abundance (30%) for the PROB treatment (final phase) and finally Clostridia had higher abundance in the BFT (final phase) treatment (20%; Figure 3).

Table 4 shows the three main Phyla, seven Classes, nine Orders, and 10 Families with the highest relative frequency in each of the treatments. A higher frequency of the Rhodobacteraceae family was observed in all treated water samples, however, in the gut it appeared in lower concentrations. The Comamonadaceae family had a higher frequency (12.37) in the probiotic treatment in the gut samples, whereas the Pseudomonadaceae family had a higher frequency (18.14) in the probiotic treatment in the intermediate phase of the water samples.

Rarefaction curves

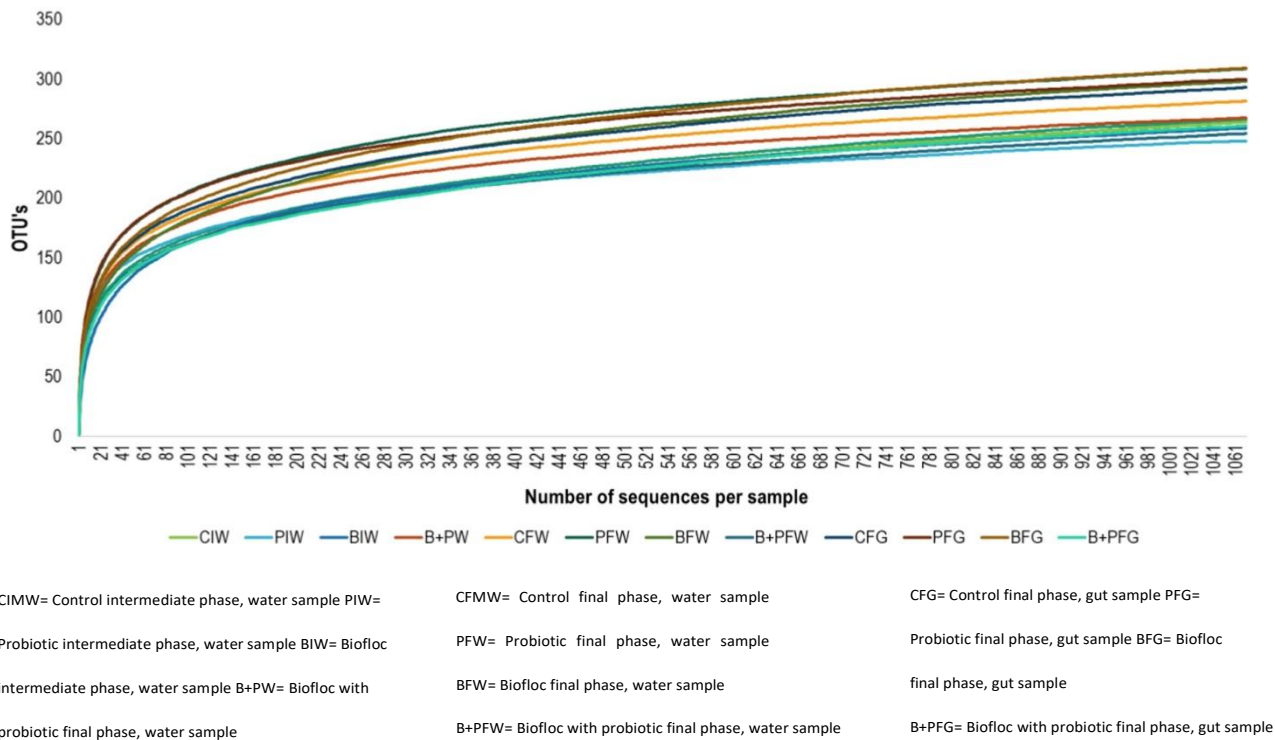


FIGURE 1 Rarefaction curves of the samples of the corresponding treatments in the different phases of the experiment

4 | DISCUSSION

4.1 | Survival and growth

According to the results, the survival and growth of the prawns of the BFTPROB treatment were significantly higher compared to the CONT prawns; this can be attributed to the action of the microorganisms (heterotrophic bacteria, phytoplankton, zooplankton, ciliates, rotifers, nematodes, and copepods) present in the biofloc as a source of natural protein in situ and available 24 h a day (Emerenciano et al., 2013). It was observed at the end of the experiment, the group of Betaproteobacteria increased, which represent a wide variety of metabolic strategies, among which its capacity for the degradation of nitrogenous compounds in ecosystems can be stand out and, in the case of biofloc, contribute to the production of microbial protein in the system. These microorganisms are considered food with high nutrient supply that promotes greater growth and survival in less culture time, compared to a conventional system, likewise they decrease diseases caused by pathogenic microorganisms (Emerenciano et al., 2013). Some authors (Ferreira et al., 2017; Hapsari, 2016; Hu et al., 2017; Miao et al., 2017) underline the importance of biofloc in aquaculture systems, because they decrease susceptibility to diseases and increase digestive efficiency. Supriatna et al. (2019) obtained 100% survival of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in treatments with biofloc, associated with less stress and efficient use of nutrients. Ekasari et al. (2021) cultured prawns in biofloc and observed a higher weight (36%) compared to the control group, which was attributed to the nutritional contribution of the biofloc.

About the FCR, the lowest values were in the two treatments with BFT, it indicates a positive effect regarding the feed administered with the biofloc system, it has already been reported for *Macrobrachium rosenbergii* (Asaduzzaman et al., 2010) and *Litopenaeus vannamei* (Xu et al., 2012).

On the other hand, Miao et al. (2017) observed in a culture of *M. rosenbergii* prawns that the treatment with biofloc yields survival results of 10.62% higher compared to the control, in addition to a 27.55% higher rate of weight gain and 7.13% of SGR compared to the control ($p < 0.05$). The latter is attributed to the effectiveness of the addition of carbon from the biofloc for the proliferation of microorganisms that are a source of carbohydrates, vitamins, and minerals used by the prawns, which coincides with the present investigation.

Regarding the probiotic treatments, the results show some orders present with higher frequency such as Actinomycetales and Rhodobacterales where other probiotic bacteria are found that may be benefiting the shrimp cultivated in the PROB and BFTPROB treatments, due to the properties of the carotenoid pigments like the astaxanthin (Ortega-Cabello et al., 2017).

4.2 | Water quality parameters

According to the analysis of water quality during the study and, particularly, of nitrogen products, for the control treatment it was necessary to perform continuous water changes to maintain values below those reported as toxic for prawns (TAN > 0.50,

TABLE 3 Number of sequences obtained, sample coverage, richness and diversity of the bacterial community observed during the experiment in water and gut of the PL's measured by Illumina MiSeq analysis of 16S rRNA gene fragments amplified by PCR

Treatments	Sequences number	Coverage	Community richness		Community diversity	
			Sobs (observed richness)	Chao (lci-hci; estimated richness)	InvSimpson (lci-hci; richness)	Shannon (lci-hci; diversity)
CIW	106,952	0.9995	264	337.97 (300.57–413.25)	17.70 (17.86–17.53)	3.52 (3.51–3.52)
PIW	106,952	0.9997	248	280.94 (262.23–323.98)	20.16 (20.36–19.96)	3.72 (3.71–3.73)
BIW	106,952	0.9997	259	305.93 (280.89–359.07)	7.40 (7.48–7.33)	2.99 (2.98–3.00)
B + PIW	106,952	0.9998	267	305.75 (284.34–354.46)	24.85 (25.04–24.66)	3.83 (3.82–3.83)
CFW	106,952	0.9997	281	335.41 (306.76–396.55)	35.12 (35.38–34.87)	3.99 (3.99–4.00)
PFW	106,952	0.9997	309	358.89 (333.09–412.06)	32.74 (33.01–32.47)	4.03 (4.02–4.03)
BFW	106,952	0.9995	298	355.40 (326.90–412.20)	21.70 (21.92–21.48)	3.70 (3.69–3.70)
B + PFW	106,952	0.9997	254	310.68 (280.32–375.96)	26.55 (26.74–26.36)	3.75 (3.74–3.76)
CFG	106,952	0.9997	294	349.73 (321.33–407.97)	32.17 (38.39–37.95)	4.05 (4.05–4.06)
PFG	106,952	0.9998	299	344.45 (320.30–395.94)	35.21 (35.44–34.99)	4.07 (4.07–4.08)
BFG	106,952	0.9997	309	357.36 (333.06–406.59)	26.77 (26.96–26.57)	3.87 (3.86–3.87)
B + PFG	106,952	0.9995	261	329.14 (294.88–398.04)	25.98 (26.20–25.77)	3.71 (3.70–3.72)

N-Nitrite > 0.2 and N-Nitrate > 7; García-Guerrero et al., 2013), unlike the biofloc systems, where aerobic or facultative bacteria are responsible for transforming nitrogen compounds to non-toxic forms (Ju and Zhang, 2015). In this regard, Cai et al. (2019) report that by adding the probiotics *Bacillus licheniformis* and *Bacillus flexus* (less than 1 mg/L) to shrimp (*L. vannamei*) culture water, the levels of total ammonia were significantly lower than those reported in traditional treatments; therefore, the effect of maintaining optimal concentrations of total ammonia nitrogen, nitrite, and nitrate in the animals grown in this study in the BFT, PROB, and BFTPROB treatments is attributed to the presence and activity of heterotrophic and autotrophic bacteria responsible for the nitrification and denitrification process (López et al., 2006).

In addition, the bacteria in the biofloc had advantage of the molasses supplied in the treatments and allowed maintaining a C:N of 20:1 ratio which leads bacteria to use the prawns' metabolites as a source of nutrients (proteins, lipids, and carbohydrates) and prevents the accumulation of ammonium in the system which may be harmful to prawns (Asaduzzaman et al., 2010), avoiding the high concentration of ammonium, as observed during the present investigation and in contrast with the concentration of total ammonia nitrogen in the CONT treatment, where the highest values were found. Hence, periodic water changes had to be maintained during the study, every third day (80%), which in commercial productions, increases production the costs and use of the water resource. Based on the above, it is possible to consider that an ecologically efficient way to maintain water quality in general and, particularly, the concentration of nitrogenous metabolites during a commercial culture is the use of bacterial bioflocs, which contribute to maintain the concentration at values lower than those toxic to the prawns. In addition, this methodology promotes the efficient and sustainable use of water, which is a resource that currently must be taken care of due to its scarcity worldwide.

4.3 | Microbial communities

Bacteria are fundamental in the trophic networks of aquatic environments because they contribute to the recirculation of nutrients and interact with other microorganisms (Cruz-Leyva et al., 2015). To understand their role in specific ecological niches, it is important to identify and quantify each bacterium that is part of these communities, which is why metagenomic studies are a tool to study communities of microorganisms (Vieites et al., 2008). The number of OTU's that was obtained during the metagenomic analysis in our research, was similar with those reported by Cardona et al. (2016), in a study with Pacific white shrimp culture. The number of OTU's obtained was between 277 ± 23.02 and 435 ± 55.81 , which indicates that the species richness of the treatments in the two experimental stages was normal for the shrimp culture. In general, the sequencing effort was adequate with high coverage values, since all samples obtained the value of 99%, Cardona et al. (2016) mention that they had a sequencing effort of 97% for the Pacific white shrimp, revealing a better sequencing effort for the results reported in this study. According to Luo et al. (2017), high coverage is present when the value is closer to 100%.

The results of this study indicate that the microbial community associated with the treatments was represented by 17 classes in water and gut samples, of which those with the highest relative abundance were: Alphaproteobacteria (Phylum Proteobacteria), Betaproteobacteria (Phylum Proteobacteria), Gammaproteobacteria (Phylum Proteobacteria), Actinobacteria (Phylum Actinobacteria), Flavobacteria (Phylum Bacteroidetes) and Sphingobacteria, but the Class Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria were those with the highest relative abundance in all treatments, which coincides with a study carried out with shrimp culture in biofloc, reported by Addo et al. (2021). These results agree with those reported by Kim et al. (2021), who evaluated the effect of wheat flour on the



FIGURE 2 Average relative abundance (%) of the classes of bacteria present in the water samples from the experimental treatments

microbial composition in the water of a biofloc system with shrimp (*L. vannamei*) culture and found that the members of the phyla with the highest relative abundance were Proteobacteria, Bacteroidetes, and Actinobacteria, which coincides with the results of this study.

Huang et al. (2020) also reported the presence of Proteobacteria (Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria) and Bacteroidetes in shrimp culture water in a biofloc system. It is worth noting that bacteria belonging to this phylum have been reported in several studies as ubiquitous in aquatic environments and aquaculture production systems (Guo et al., 2011; Wei et al., 2016; Zhou et al., 2017). Deng et al. (2019) reported phyla Actinobacteria (24.17%) and Proteobacteria as dominant (15.05%) in shrimp (*L. vannamei*) gut samples in biofloc culture; in the present study, a higher relative abundance was observed in the BFTPROB treatment in the final phase (gut samples), whereas Bacteroidetes was observed with higher abundance in water samples (15.56%), these phyla of bacteria have been reported as the main ones in aquatic systems (Cardona et al., 2016). Hence, their high abundance percentage was attributed to the fact that it was dominant in the water use for the culture and, therefore, in the gut from the first life stages of the prawns; in addition to the fact that these had the ability to displace other bacteria due to their variability in morphology, easy displacement, and adaptation (Angthong et al., 2020).

The results indicate that there is a direct relationship between the bacteria present in the water and those found in the gut samples, it is known that Proteobacteria are a microbial group that is responsible for the nutrient recycling process and mineralization of organic components in aquatic systems (Cardona et al., 2016). Martins et al. (2013) indicate that Proteobacteria comprise several phototrophic and heterotrophic genera with high degradative capacity of compounds such as methane and methanol in aquatic environments. Penny et al. (2015) mention that Betaproteobacteria are a group of aerobic or facultative bacteria whose ecological function is to transform nitrogenous compounds in aquatic ecosystems, and one of the most important genera of this group is Nitrosomonas, which oxidizes ammonia, which coincides with the results obtained in the treatments with concentrations in the appropriate values in the experimental treatments.

Classes such as Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, as well as Bacteroidia and Flavobacteria were reported in shrimp gut samples by Cardona et al. (2016), they observed relative abundances like those recorded in the present study in the treatment with biofloc and in the control, which is attributed to the fact that they are bacteria constituting the gut microbiota of crustaceans in a natural way.

The families with the highest relative abundance in this study have been reported in aquaculture systems and in biofloc cultures, such

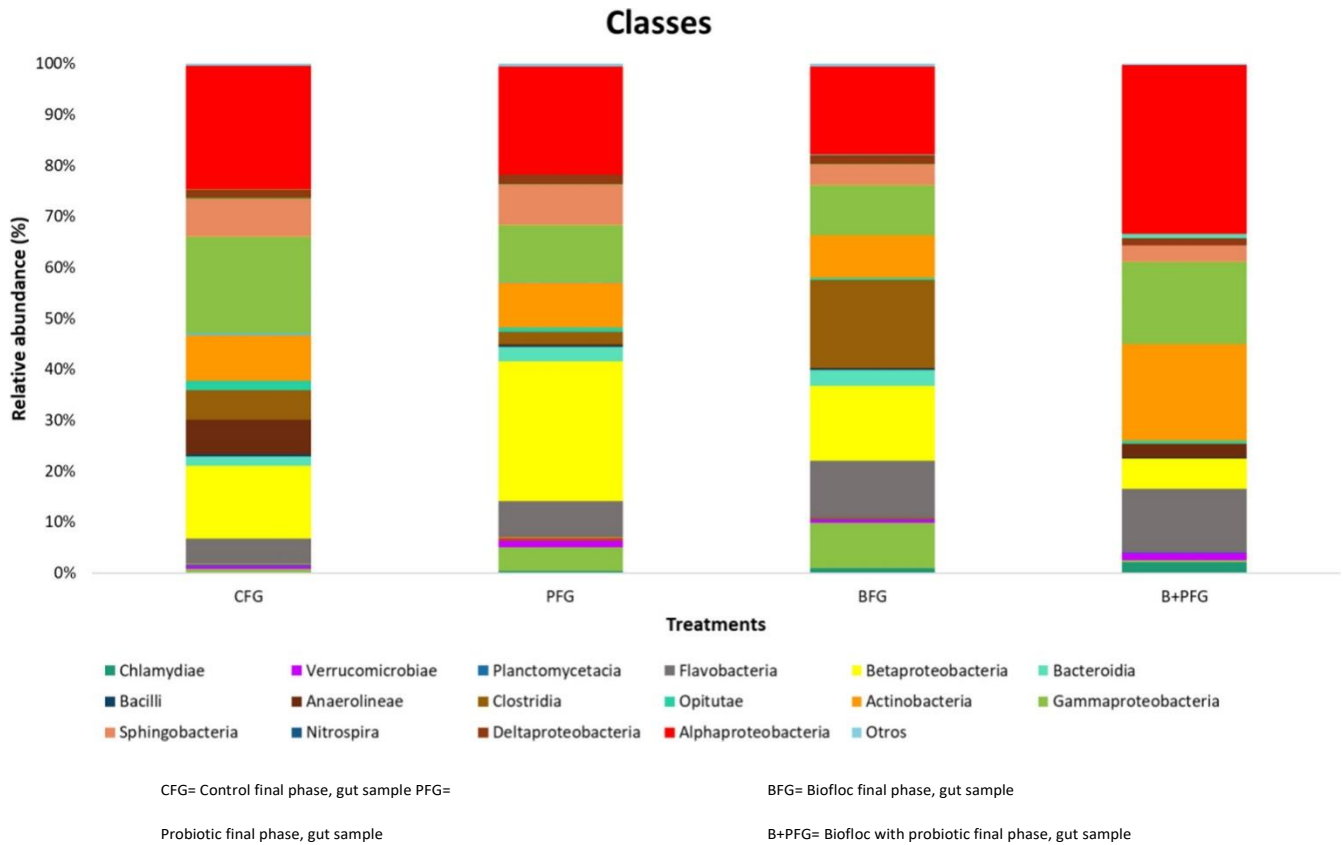


FIGURE 3 Average relative abundance (%) of the classes of bacteria in the gut samples of the experimental prawns

as *Pseudomonadaceae* (Ndi and Barton, 2012), *Caulobacteraceae* (Guo et al., 2011), *Chitinophagaceae* (Bartelme et al., 2017), *Flavobacteraceae* (Wei et al., 2020), which are efficient bacteria in transforming various compounds within the water column such as cellulose, chitin, collagen, and nitrogenous compounds generated during culture.

On the other hand, one of the most important aims of this study was to evaluate the impact of the addition of the probiotic *L. lactis* on the composition of the microbial community in a prawn's culture in biofloc. The results of this analysis showed that there was no effect of the probiotic because its concentration was low (less than 0.1%), it is in contrast to what was expected, because it is one of the most used species as a probiotic in aquaculture with positive results on growth, survival, immune response, and disease control in crustaceans and fish, which speaks of its ability to exclude pathogenic microorganisms (Balcázar et al., 2006), and the phylum to which it belongs (Firmicutes) has been commonly reported in biofloc systems. The absence of the probiotic *L. lactis* as part of the dominant microbiota in the PROB and BFTPROB treatments is probably due to it was displaced by the biofloc bacterial community (Cardona et al., 2016; Cienfuegos et al., 2018; Deng et al., 2019).

However, when talking about biofloc systems it must be considered that the conditions to produce aquatic organisms differ significantly to conventional systems, because this type

of systems promotes the growth of a very complex diversity of heterotrophic bacteria (*Enterobacter*, *Bacillus*, and *Lactococcus*) from an added carbon source and high oxygenation, which together with the cultured species influences, the bacterial groups that can resist certain conditions (Ray and Lotz, 2014; Wilén et al., 2008). In a study directed by De Paiva et al. (2016), no positive effects were observed when adding a commercial probiotic, composed of *Bacillus* spp. and *Lactobacillus* sp. to the biofloc system for shrimp culture. The authors indicate it could be due to the anaerobic processes that may occur at the bottom of the pond or to the concentration at which the probiotic is added. Cienfuegos et al. (2018) mention that there might not be a probiotic dominance in the culture water because bacteria isolated from the animal's own intestinal tract do not support the environmental conditions of the culture system or may be displaced by the dominant phylum of the biofloc.

Regarding the treatments with the combination of probiotics and biofloc in the water and gut samples in the final phase, there was a greater relative abundance of bacteria such as Alphaproteobacteria, Flavobacteria, and Actinobacteria, according with Hoang et al. (2020) reported the presence of Proteobacteria (Alphaproteobacteria) in shrimp gut in biofloc system, and they decrease in the prevalence of pathogens in the culture water for this reason the survival can be up to 100%. Penny et al. (2015), mention that Bacteroidetes (Flavobacteria) transform nitrogenous compounds in aquatic

TABLE 4 Relative frequencies of the most representative bacterial families identified in each treatment

Phylum	Classes	Order	Family	IW	CIMW	PTIW	BIW	B + PIWCFW	PFW	BFW	B + PFW	CFG	PFG	BFG	B + PFG	
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacteriales	Caulobacteraceae	1.91	3.23	0.84	0.17	2.34	3.89	1.94	0.67	2.92	3.66	2.88	1.06	3.09
			Rhodobacteriales	25.19	30.24	20.33	44.77	23.64	12.18	13.86	15.29	14.43	8.55	11.14	8.69	17.48
	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	1.37	9.32	1.21	0.79	1.45	5.30	3.42	0.40	11.12	4.15	3.39	0.72	11.09
Pseudomonadales			1.49	6.60	18.14	0.37	2.16	6.18	6.81	9.49	3.89	7.96	6.36	7.49	3.42	
Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	2.48	1.19	2.76	0.24	1.56	1.74	5.49	4.85	2.49	2.36	8.39	4.57	2.69	
		Burkholderiales	4.61	1.89	3.93	1.18	5.22	4.62	9.28	7.78	1.94	4.54	12.37	6.98	1.84	
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	1.27	0.32	2.92	0.14	2.14	1.23	1.78	2.53	7.22	1.22	2.51	1.83	7.19
			Bacteroidia	0.86	2.40	0.47	0.13	5.03	4.48	3.78	7.33	2.92	3.24	4.05	8.44	3.93
Actinobacteria	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriales	1.77	1.12	5.37	2.68	1.71	2.07	0.49	2.54	1.03	2.03	0.60	1.46	0.72
			Actinomycetales	4.35	1.87	1.55	0.47	0.42	3.93	8.88	2.65	1.89	2.95	5.60	2.27	1.59

ecosystems. It agrees with the present study, because the nitrogenous compounds were obtained in optimal values for the prawns. Finally, Actinobacteria have the capacity to degrade diverse polymers, such as cellulose, lignin and chitin (this last one is in the shell of the prawns) and for this reason it was obtained a better water quality in the probiotic treatments (Taniguchi & Eguchi, 2020).

5 | CONCLUSIONS

This study expanded the knowledge about the diverse bacteria that develop in the biofloc and when probiotics are added, because in most of the investigations only phyla Firmicutes, Proteobacteria and Actinobacteria have been reported as dominant; with the results of this research 17 classes were identified within which Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria, Flavobacteria, and Clostridia were considered the most abundant.

The probiotic *L. lactis* was not observed as part of the dominant microbiota in the treatments where it was added, this is probably because it was displaced by the microbial community of the biofloc. Despite this, significant differences were observed in the growth and weight of the prawns; survival was higher in the treatments with respect to the control.

In addition, the water quality parameters, especially nitrogen compounds, were maintained within the levels required for prawn culture, resulting in a lower environmental impact due to the use of less water resources.

ACKNOWLEDGEMENTS

The first author acknowledges the Graduate Studies program in *Ciencias Biológicas y de la Salud*, of the *Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco*, for the support granted and to the *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* (CONACYT) for the scholarship (# CVU 763372) to successfully conclude the curriculum in the allotted time.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.


AUTHOR CONTRIBUTION

M.C. Kathia Cienfuegos Martínez (experimental design, DNA extraction, massive sequencing analysis). María del Carmen Monroy Dosta (the guide in the experiment, develop the biofloc system, and provide probiotics). Aida Hamdan Partida (DNA extraction in water and gut). Martha Patricia Hernández Vergara (prawns donation, guide in measures of weight and length, and biofloc development). José Felix Aguirre Garrido (massive sequencing analysis to get richness, diversity index and graphics). Jaime Bustos Martínez (DNA extraction, and massive sequencing analysis to get rarefaction curves, OTU's, and graphics).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The authors declare the absence of shared data.

ORCID

María del Carmen Monroy-Dosta  <https://orcid.org/0000-0002-1856-0511>

Martha Patricia Hernández-Vergara  <https://orcid.org/0000-0002-1589-1913>

REFERENCES

- Addo, F. G., Zhang, S., Manirakiza, B., Ohore, O. E., & Shudong, Y. (2021). The impacts of straw substrate on biofloc formation, bacterial community and nutrient removal in shrimp ponds. *Bioresource Technology*, *326*, 124727. doi:10.1016/j.biortech.2021.124727
- Anghong, P., Uengwetwanit, T., Arayamethakorn, S., Chaitongsakul, P., Karoonuthaisiri, N., & Rungrassamee, W. (2020). Bacterial analysis in the early developmental stages of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Scientific Reports*, *10*, 1–12.
- 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. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.05.035
- Avnimelech, Y. (2007). Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture*, *264*, 140–147. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.11.025
- Avnimelech, Y. (2012). *Biofloc technology. A practical guidebook*. Baton Rouge.
- Azim, M. E., & 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., & Múzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary microbiology*, *114*, 173–186. doi:10.1016/j.vetmic.2006.01.009
- Bartelme, R. P., McLellan, S. L., & 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*, 1–18. doi:10.3389/fmicb.2017.00101
- Cai, Y., Yuan, W., Wang, S., Guo, W., Li, A., Wu, Y., Chen, X., Ren, Z., & Zhou, Y. (2019). In vitro screening of putative probiotics and their dual beneficial effects: To white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae and to the rearing water. *Aquaculture*, *498*, 61–71. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.08.024
- Cardona, E., Gueguen, Y., Magré, K., Lorgeoux, B., Piquemal, D., Pierrat, F., & Saulnier, D. (2016). Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. *BMC Microbiology*, *16*, 2–9. doi:10.1186/s12866-016-0770-z
- Cienfuegos, M. K., Monroy, D. M. C., Hamdan, P. A., Castro, M. J., Aguirre, G. F., & Bustos, M. J. A. (2018). Effect of two probiotics on bacterial community composition from biofloc system and their impact on survival and growth of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, *6*, 525–533.
- Cruz-Leyva, M. C., Zamudio-Maya, M., Corona-Cruz, A. I., González-de la Cruz, J. U., & 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.
- Das, S., Mondal, K., & Haque, S. (2017). A review on application of probiotic, prebiotic and symbiotic for sustainable development of aquaculture. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, *5*, 422–429.
- De Paiva, E., Alves, G., Otavio, L., Olivera, A., & 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. doi:10.4067/S0718-19572016000100006
- Deng, Y., Xu, X., Yin, X., Lu, H., Chen, G., Yu, J., & Ruan, Y. (2019). Effect of stock density on the microbial community in biofloc water and Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) gut microbiota. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*, 4241–4252.
- De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., & Verstraete, W. (2008). The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture*, *277*, 125–137. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.02.019
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, *27*, 2194–2200. doi:10.1093/bioinformatics/btr381
- Ekasari, J., Nugroho, U. A., Fatimah, N., Angela, D., Hastuti, Y. P., Pande, G. S. J., & Natrah, F. M. I. (2021). Improvement of biofloc quality and growth of *Macrobrachium rosenbergii* in biofloc systems by *Chlorella* addition. *Aquaculture International*, *29*, 2305–2317.
- Emerenciano, M., Ballester, E., Cavalli, R., & 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., & 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., Gaxiola, G., & Cuzon, G. (2013). Biofloc technology (BFT): A review for aquaculture application and animal food industry. In M. Darko Matovic (Ed.), *Biomass now-cultivation and utilization*. InTech. Ariza Fabián and Mujica Edinson.
- Ferreira, G. S., Bolívar, N. C., Pereira, S. A., Guertler, C., do Nascimento, V. F., & Mourão, J. L. P. (2015). Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, *448*, 273–279.
- Ferreira, M. G. P., Melo, F. P., Lima, J. P. V., Andrade, H. A., Severi, W., & Correia, E. S. (2017). Bioremediation and biocontrol of commercial probiotic in marine shrimp culture with biofloc. *Latin American Journal of Aquatic Research*, *45*, 167–176.
- García-Guerrero, M. U., Becerril-Morales, F., Vega-Villasante, F., & Espinosa-Chaurand, L. D. (2013). Los langostinos del género *Macrobrachium* con importancia económica y pesquera en América Latina: conocimiento actual, rol ecológico y conservación. *Latin American Journal of Aquatic Research*, *41*, 651–675.
- Gelabert, R., Brito, R., Gaxiola, M. G., Castro, T., & Rosas, C. (2008). Efecto de nauplios de *Artemia franciscana* enriquecidos sobre el crecimiento, supervivencia y resistencia al estrés de postlarvas (PL5-PL40) de *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) (Vol. 24, pp. 29–40). Universidad y Ciencia.
- Guo, F., Zhang, S. H., Yu, X., & 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. doi:10.1016/j.biortech.2011.03.046
- Hapsari, F. (2016). The effect of fermented and non-fermented biofloc inoculated with bacterium *Bacillus cereus* for catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, *9*, 334–339.
- Hendrickx, M. E. (1995). Camarones. In W. Fischer, F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K. E. Carpenter, & V. H. Niem (Eds.). *Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico Centro-Oriental. Plantas e invertebrados 1*. Rome, Italy (pp. 417–422). FAO.
- Hoang, M. N., Nguyen, P. N., & Bossier, P. (2020). Water quality, animal performance, nutrient budgets and microbial community in the biofloc-based polyculture system of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* and gray mullet, *Mugil cephalus*. *Aquaculture*, *515*, 734610.
- Huang, L., Guo, H., Chen, C., Huang, X., Chen, W., Bao, F., & Zhang, D. (2020). The bacteria from large-sized bioflocs are more associated

- with the shrimp gut microbiota in culture system. *Aquaculture*, 523, 735159. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.735159
- Hu, X., Cao, Y., Wen, G., Zhang, X., Xu, Y., & Xu, W. (2017). Effect of combined use of *Bacillus* and molasses on microbial communities in shrimp cultural enclosure systems. *Aquaculture Research*, 48, 2691–2705. doi:10.1111/are.13101
- Ju, F., & Zhang, T. (2015). Bacterial assembly and temporal dynamics in activated sludge of a full-scale municipal wastewater treatment plant. *The ISME Journal*, 9, 683–695. doi:10.1038/ismej.2014.162
- Kim, Y. S., Kim, S. E., Kim, S. J., Jung, H. K., Park, J., Jeon, Y. J., & Kim, K. H. (2021). Effects of wheat flour and culture period on bacterial community composition in digestive tracts of *Litopenaeus vannamei* and rearing water in biofloc aquaculture system. *Aquaculture*, 531, 735908. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735908
- King, R. C. (1994). Growth and survival of red claw crayfish hatchlings (*Cherax quadricarinatus*, Von Martens) on the relative suitability of *Cherax quadricarinatus* and *Cherax destructor* for culture in Queensland. *Aquaculture*, 122, 77–80.
- López, J. B., Quintero, G., Guevara, A. L., Jaimés, D. C., Gutiérrez, S. M., & García, J. M. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Revista Nova*, 4, 5–6.
- Luis-Villaseñor, I. E., Voltolina, D., Audelo-Naranjo, J. M., Pacheco-Marges, M. R., Herrera-Espéricueta, V. E., & Romero-Beltrán, 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, 3726. doi:10.4081/ijas.2015.3726
- Luo, G., Zhang, N., Cai, S., Tan, H., & Liu, Z. (2017). Nitrogen dynamics, bacterial community composition and biofloc quality in biofloc-based systems cultured *Oreochromis niloticus* with poly- β -hydroxybutyric and polycaprolactone as external carbohydrates. *Aquaculture*, 479, 732–741. doi:10.1016/j.aquaculture.2017.07.017
- Martinez-Porchas, M., Martinez-Cordova, L. R., Lopez-Elias, J. A., & Porchas-Cornejó, M. A. (2014). Bioremediation of aquaculture effluents. In Q. Zhou (Ed.), *Microbial biodegradation and bioremediation* (pp. 539–553). Surajit Das. doi:10.1016/B978-0-12-800021-2.00024-8
- Martins, P., Cleary, D. F., Pires, A. C., Rodrigues, A. M., Quintino, V., Calado, R., & 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. doi:10.1371/journal.pone.0080847
- Miao, S., Zhu, J., Zhao, C., Sun, L., Zhang, X., & Chen, G. (2017). Effects of C/N ratio control combined with probiotics on the immune response, disease resistance, intestinal microbiota and morphology of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Aquaculture*, 476, 125–133. doi:10.1016/j.aquaculture.2017.04.027
- Ndi, O. L., & Barton, M. D. (2012). Resistance determinants of pseudomonas species from aquaculture in Australia. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 3, 1–6. doi:10.4172/2155-9546.1000119
- Ortega-Cabello, L., Pérez-Méndez, H. I., Manjarrez-Alvarez, N., Solís-Oba, A., & López-Luna, A. (2017). Effect of iron salts on *Rhodococcus* sp. and *Gordonia* sp. on carotenoid production. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16, 1–10.
- Pandiyani, P., Balaraman, D., Thirunavukkarasu, R., George, E., Subaramaniyan, K., Manikkam, S., & Sadayappan, B. (2013). Probiotics in aquaculture. *Drug Invention Today*, 5, 55–59.
- Penny, C., Gruffaz, C., Nadalig, T., Cauchie, H. M., Vuilleumier, S., & Bringel, F. (2015). Tetrachloromethane-degrading bacterial enrichment cultures and isolates from a contaminated aquifer. *Microorganisms*, 3, 327–343. doi:10.3390/microorganisms3030327
- 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. doi:10.1016/j.aquaeng.2014.10.001
- Sánchez-Ortiz, A. C., Luna-González, A., Campa-Córdova, A. S., Escamilla-Montes, R., Flores-Miranda, M. C., & Mazón-Suástegui, J. M. (2015). Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from pustulose ark (*Anadara tuberculosa*) suitable for shrimp farming. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43, 123–136. doi:10.3856/vol43-issue1-fulltext-11
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., & Hollister, E. B. (2009). Introducing Mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 7537–7541.
- Seenivasan, C., Bhavan, P. S., Radhakrishnan, S., & Muralisankar, T. (2012). Effects of probiotics on survival, growth and biochemical constituents of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* post larvae. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12, 331–338. Seenivasan, C., Radhakrishnan, S., Shanthi, R., Muralisankar, T. Y., & Bhavan, P. S. (2015). Influence of probiotics on survival, growth, biochemical changes and energy utilization performance of *Macrobrachium rosenbergii* post-larvae. *Proceedings of the Zoological Society*, 68, 74–83. doi:10.1007/s12595-014-0097-4
- Supriatna, A., Nurhatijah, N., Sarong, M.A., Muchlisin, Z.A. 2019. Effect of biofloc density and crude protein level in the diet on the growth performance, survival rate, and feed conversion ratio of black Tiger prawn (*Penaeus monodon*). In A. Supriatna (Ed.), *IOP conference series: Earth and environmental science* (vol. 348, no. 1, p. 012131). IOP Publishing.
- Taniguchi, A., & Eguchi, M. (2020). Community structure of actively growing bacteria in a coastal fish-farming area. *PLoS One*, 15, 1–12. Thakuria, D., Schmidt, O., Siúrtáin, M. M., Egan, D., & Doohan, F. M. (2008). Importance of DNA quality in comparative soil microbial community structure analyses. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 1390–1403. doi:10.1016/j.soilbio.2007.12.027
- Vázquez-Silva, G., Ramírez-Saad, H. C., Aguirre-Garrido, J. F., Mayorga-Reyes, L., Azaola-Espinosa, A., & Morales-Jiménez, J. (2017). Effect of bacterial probiotics bio-encapsulated into *Artemia franciscana* on weight and length of the shortfin silverside (*Chirostoma humboldtianum*), and PCR-DGGE characterization of its intestinal bacterial community. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45, 1031–1043. doi:10.3856/vol45-issue5-fulltext-18
- Vieites, J. M., Guazzaroni, M. E., Beloqui, A., Golyshin, P. N., & Ferrer, M. (2008). Metagenomics approaches in systems microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 33, 236–255. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00152.x
- Wee, W. C., Mok, C. H., Romano, N., Ebrahimi, M., & Natrah, I. (2018). Dietary supplementation use of *Bacillus cereus* as quorum sensing degrader and their effects on growth performance and response of Malaysian giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii* juvenile towards *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Nutrition*, 24, 1804–1812. https://doi.org/10.1111/anu.12819
- Wei, Y. F., Liao, S. A., & Wang, A. L. (2016). The effect of different carbon sources on the nutritional composition, microbial community, and structure of bioflocs. *Aquaculture*, 465, 88–93. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.08.040
- Wei, G., Shan, D., Li, G., Li, X., Tian, R., He, J., & Shao, Z. (2020). Prokaryotic communities vary with floc size in a biofloc-technology based aquaculture system. *Aquaculture*, 529, 735632. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.735632
- Wilén, B. M., Onuki, M., Hermansson, M., Lumley, D., & 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. doi:10.1016/j.watres.2007.12.013
- Xu, W. J., Pan, L. Q., Sun, X. H., & Huang, J. (2012). Effects of bioflocs on water quality, and survival, growth and digestive enzyme activities of *Litopenaeus vannamei* (Boone) in zero-water exchange culture tanks. *Aquaculture Research*, 44, 1093–1102.

- Yamashita, T., Emoto, T., Sasaki, N., & Hirata, K. I. (2016). Gut microbiota and coronary artery disease. *International Heart Journal*, *57*, 663–671. <https://doi.org/10.1536/ihj.16-414>
- Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Priesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., & Glöckner, F. O. (2014). The SILVA and “all-species living tree project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research*, *42*, 643–648. [doi:10.1093/nar/gkt1209](https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209)
- Zhou, Q., Chen, T., & Han, S. (2017). Characteristics of bacterial communities in cyanobacteria-blooming aquaculture wastewater influenced by the phytoremediation with water hyacinth. *Water*, *9*, 1–11. [doi:10.3390/w9120956](https://doi.org/10.3390/w9120956)

How to cite this article: Cienfuegos-Martinez, K., Monroy-Dosta, M.C., Hamdam-Partida, A., Vergara-Hernandez, M.P., Aguirre-Garrido, J.F., & Bustos-Martinez, J. (2022). Effect of the probiotic *Lactococcus lactis* on the microbial composition in the water and the gut of freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) cultivate in biofloc. *Aquaculture Research*, *00*, 1–13. <https://doi.org/10.1111/are.15889>