



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN DE UN CONSORCIO DE *Bacillus* sp.
SOBRE LA FERMENTACIÓN DE SALVADO DE
ARROZ Y SU EFECTO EN EL CULTIVO DE
CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*.**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Acuicultura)

P r e s e n t a

María Alejandra Liñán Vidriales

La Paz, Baja California Sur, octubre de 2019

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 14 del Mes de Octubre del 2019, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Evaluación de un consorcio de *Bacillus* sp sobre la fermentación de salvado de arroz y su efecto en el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*"

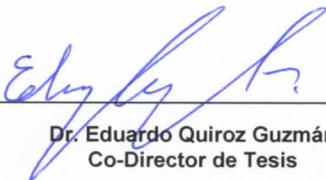
Presentada por el alumno:

María Alejandra Liñán Vidriales

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN ACUÍCULTURA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

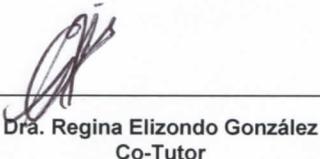
LA COMISIÓN REVISORA



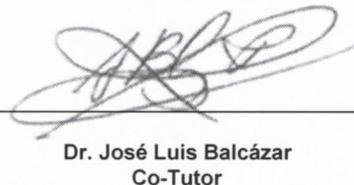
Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Co-Director de Tesis



Dr. Dariel Tovar Ramírez
Co-Director de Tesis



Dra. Regina Elizondo González
Co-Tutor



Dr. José Luis Balcázar
Co-Tutor



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Encargada del despacho de la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos

Comité Tutorial

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán (Co-Director de Tesis, CIBNOR)

Dr. Dariel Tovar Ramírez (Co-Director de Tesis, CIBNOR)

Dr. José Luis Balcázar Rojas (Co-Tutor, ICRA)

Dra. Regina Elizondo González (Co-Tutora, CIBNOR)

Comité Revisor de Tesis

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Dr. José Luis Balcázar

Dra. Regina Elizondo González

Jurado de examen

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Dr. José Luis Balcázar

Suplente

Dra. Regina Elizondo González

Resumen

La acumulación de desechos nitrogenados en los sistemas de producción acuícola afecta la salud y supervivencia de los organismos cultivados. Una de las alternativas para mitigar sus efectos es introducir o promover el crecimiento de organismos capaces de utilizar, transformar y/o eliminar los compuestos nocivos. En la producción de camarón comúnmente se introducen diversas fuentes de carbono, con la finalidad de modular la relación Carbono:Nitrógeno (C:N) y promover la fermentación vía microbiana de los compuestos nitrogenados tóxicos; es por esto que ha sido necesario desarrollar buenas prácticas para el manejo de la calidad del agua. Con este propósito, el uso de fermento de salvado de arroz se ha convertido en una tecnología innovadora con buenos resultados, la cual se basa en la adición de carbohidratos para promover el crecimiento bacteriano y, en consecuencia, hacer el proceso de bioremediación más eficiente que otras tecnologías. El objetivo del presente estudio fue evaluar el uso de bacterianas en la fermentación de salvado de arroz y su efecto en el cultivo de camarón blanco. Para lograr esto se aislaron 27 cepas bacterianas del tracto digestivo de camarones, de las cuales se determinó la actividad antagónica entre ellas, la capacidad hemolítica y su perfil enzimático. Las cepas bacterianas fueron identificadas mediante 16S ARN e incorporadas al salvado de arroz predigerido con hidróxido de sodio y a concentración de 2×10^7 . Finalmente, el fermento fue evaluado en un cultivo experimental de camarón d 1 mes. Durante este periodo se realizaron análisis zootécnicos de los organismos, calidad del agua de cultivo, toma de muestras para determinar el efecto del fermento sobre la microbiota del agua de cultivo y tracto digestivo de los organismos mediante un análisis de secuenciación masiva del gen 16S ARN ribosomal; por último, se llevaron a cabo cortes histológicos del hepatopáncreas de los organismos sometidos a los diferentes tratamientos para determinar las diferencias entre las células epiteliales. De las pruebas bioquímicas para la selección de las cepas del consorcio, se obtuvieron 8 cepas presentaron hemólisis alfa, que se traduce en una lisis parcial de los eritrocitos. Las cuales presentaron actividad de las enzimas esterasa, lipasa, valina arilamidasa, cistina arilamidasa, fosfatasa ácida, Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa y α -galactosidasa. Al finalizar el experimento, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el crecimiento de los organismos entre los tratamientos; siendo el salvado fermentado por un probiótico comercial el que presentó un mayor crecimiento; sin embargo, los resultados de secuenciación masiva demostraron que el tratamiento con mayor diversidad y riqueza fue el del salvado fermentado por el consorcio de bacterias del género *Bacillus*. En relación al análisis histológico, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el área de cobertura lipídica, siendo este el tratamiento con mayor condición nutricional en relación a la cantidad de lípidos almacenados en hepatopáncreas.

Palabras clave: Bacterias del género *Bacillus*, salvado de arroz, acuicultura, camarón



Vo.Bo. Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Co-Director

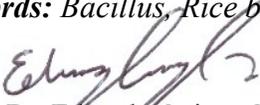


Vo. Bo. Dr. Daríel Tovar Ramírez
Co-Director

Summary

The accumulation of nitrogen waste in aquaculture production systems affects the health and survival of cultivated organisms. One of the alternatives to mitigate its effects is to introduce or promote the growth of organisms capable of using, transforming and / or eliminating harmful compounds. Various sources of carbon are commonly introduced into shrimp production, with the purpose of modulating the Carbon: Nitrogen (C: N) ratio and promoting the microbial fermentation of toxic nitrogen compounds; This is why it has been necessary to develop good practices for water quality management. For this purpose, the use of fermented rice bran has become an innovative technology with good results, which is based on the addition of carbohydrates to promote bacterial growth and, consequently, make the bioremediation process more efficient than other technologies and reduce operating costs. The objective of the present study was to evaluate the use of bacterial strains in the fermentation of rice bran and its effect on the cultivation of white shrimp. To achieve this, 27 bacterial strains were isolated from the digestive tract of shrimp, of which the antagonistic activity between them, the hemolytic capacity and their enzymatic profile was determined. The bacterial strains were identified by amplification of the 16S RNA ribosomal gene and incorporated into the bran of rice predigested with sodium hydroxide to increase its solubility in the water column and have a greater availability of nutrients. It was subsequently inoculated in saline solution at a bacterial concentration of 2×10^7 . Finally, the ferment was evaluated in an experimental shrimp culture for 1 month. During this period zootechnical analyzes of the organisms and the evaluation of quality parameters of the culture water were performed, samples were also taken to determine the effect of the ferment on the microbiota of the culture water and digestive tract of the organisms by massive sequencing analysis of the 16S ribosomal RNA gene; finally, histological sections of the hepatopancreas of the organisms subjected to the different treatments were carried out to determine the differences between the epithelial cells. From the biochemical tests for the selection of consortium strains, 19 strains with beta-type hemolytic capacity were obtained which is characterized by generating a transparent halo around the colonies, indicating that they have high capacity for red cell lysis, while the remaining 8 presented alpha hemolysis, which results in a partial lysis of the erythrocytes. The 8 strains showed activity of the enzymes esterase, lipase, valine arylamidase, cystine arylamidase, acid phosphatase, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase and α -galactosidase. At the end of the experiment, significant differences ($p < 0.05$) were observed in the growth of organisms between treatments; the bran being fermented by a commercial probiotic showed the highest growth; however, the results of massive sequencing showed that the treatment with the greatest diversity and richness was the one fermented by the *Bacillus* consortium. In relation to the histological analysis, significant differences ($p < 0.05$) were observed in the lipid coverage area, being this the treatment with the highest nutritional condition in relation to the amount of lipids stored in hepatopancreas.

Keywords: *Bacillus, Rice bran, Aquaculture, Shrimp*


Vo.Bo. Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Co-Director


Vo. Bo. Dr. Daríel Tovar Ramírez
Co-Director

Dedicatoria

*“Equipado con sus cinco sentidos, el hombre explora el universo que
lo rodea y a sus aventuras las llama ciencia”
Edwin Powell Hubble*

A mis padres porque esta aventura no sólo fue mía, sino de nosotros.

El presente trabajo fue desarrollado en los laboratorios de aclimatación y mantenimiento de organismos acuáticos, Bioquímica y fisiología, Histología, Análisis químico proximal, Diagnóstico Microbiológico y Laboratorio de Genómica del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. con el financiamiento de los proyectos:

“Sistema súper-intensivo para la producción de camarón basado en regímenes continuos de reactivación microbiana”, Proyecto CONACYT 231864 del Programa de estímulos a la innovación, Modalidad PROINNOVA y cuyo responsable técnico es el Dr. Eduardo Quiroz Guzmán

"Desarrollo y validación de alimentos funcionales para el control de enfermedades en el camarón *Penaeus vannamei*" con clave 01-887 dentro la Convocatoria para Atender Problemas Nacionales 2015 y cuyo responsable técnico es el Dr. Alberto Peña Rodríguez.

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR) por ser la institución receptora para mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (#635021). A mis co-directores Dr. Eduardo Quiroz Guzmán y Dr. Dariel Tovar Ramírez, así como a mis co-tutores Dr. José Luis Balcázar y Dra. Regina Elizondo por formar parte de mi comité y su apoyo incondicional a lo largo de mi trabajo de tesis.

A Granjas Marinas de Sinaloa S.A de C.V en especial a Samuel Echeverría Eguiarte y Omar Camorlinga Rebolledo.

Al laboratorio de Histología e Histoquímica en especial a Carmen Jaramillo Rodríguez y a María Eulalia Meza Chávez.

Al laboratorio de Aclimatación y Mantenimiento de Organismos Acuáticos en especial a Pablo Monsalvo Spencer y Gabriel Robles Villegas.

Al laboratorio de Bioquímica Fisiológica en especial a Roberto Herrera Hernández.

Al laboratorio de Análisis Químico Proximal en especial a María Dolores Rondero Astorga.

Al Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Salas del Centro de Investigación en Alimento y Desarrollo (CIAD) Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental.

Al laboratorio de Diagnóstico Microbiológico en especial a Norma Angélica Ochoa Álvarez.

Al laboratorio de Microbiología Ambiental en especial a Manuel Moreno Legorreta.

A Horacio Sandoval Gómez y a Tania Verónica Núñez Valdez por el apoyo brindado tanto en el área de computo como de posgrado, además de siempre hacerlo del mejor humor.

A mis compañeros y amigos de maestría, por haber sido el grupo tan unido que fuimos y por haber hecho de esta etapa de mi vida más divertida.

A mis amigos de toda la vida, porque en la distancia siempre han estado presentes y siempre me han apoyado.

A mis hermanitos por ser ese rayito de luz en mi vida que trata de iluminar mis días grises y por ayudarme a ejercitar mi paciencia.

Pero, sobre todo, a mis padres Juan Carlos y Deyanira porque sin su apoyo jamás hubiera llegado hasta donde me encuentro en este momento, a ustedes les debo todo. Gracias por siempre darme las palabras de aliento para poder continuar.

Contenido

Resumen.....	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	v
Contenido.....	vi
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 <i>Comunidades microbianas en el ciclo del nitrógeno en acuicultura</i>	<i>4</i>
2.2 <i>Control de los niveles de nitrógeno tóxico en el cultivo de camarón.....</i>	<i>7</i>
2.3 <i>Carbono en la asimilación microbiana del amonio</i>	<i>8</i>
2.4 <i>Salvado de arroz en los sistemas de producción de acuícola.....</i>	<i>9</i>
3. JUSTIFICACIÓN.....	11
4. HIPOTESIS.....	12
5. OBJETIVOS	12
5.1. <i>Objetivo general</i>	<i>12</i>
5.2. <i>Objetivos particulares</i>	<i>12</i>
6. MATERIALES Y MÉTODOS	13
6.1. <i>Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas de organismos silvestres de Litopenaeus vannamei.</i>	<i>13</i>
6.2. <i>Generación del consorcio</i>	<i>15</i>
6.3. <i>Determinar la composición del salvado de arroz antes y después de la fermentación, así como la afinidad de las bacterias ácido lácticas.</i>	<i>16</i>
6.4. <i>Evaluación del fermento de salvado de arroz producido por Bacillus como base para mejorar la calidad de agua y salud de los organismos</i>	<i>18</i>
6.5. <i>Evaluación de las comunidades bacterianas del agua de cultivo y tracto digestivo mediante secuenciación masiva del 16S ARN ribosomal y análisis bioinformático.</i>	<i>22</i>
6.6. <i>Análisis estadísticos.....</i>	<i>24</i>
7. RESULTADOS	25
7.1. <i>Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas de hepatopáncreas y tracto digestivo de organismos silvestres de Litopenaeus vannamei.</i>	<i>25</i>

7.2. <i>Generación del consorcio</i>	28
7.3. <i>Composición</i>	30
7.4. <i>Evaluación del fermento del salvado producido por bacterias ácido lácticas como base para mejorar la calidad en un modelo acuícola</i>	30
7.5. <i>Evaluación de las comunidades bacterianas</i>	38
8. DISCUSIÓN	43
8.1. <i>Aislamiento y caracterización de bacterias beneficiosas de la microbiota de camarón</i>	43
8.2. <i>Generación del consorcio</i>	44
8.3. <i>Fuentes de carbono</i>	45
8.4. <i>Evaluación de fermentos por bacterias probióticas en un modelo acuícola</i>	47
8.5. <i>Histología</i>	48
8.6. <i>Evaluación de las comunidades bacterianas</i>	49
9. CONCLUSIONES	52
10. RECOMENDACIONES	53
11. LITERATURA CITADA	54

Lista de figuras

Figura 1. Tanques de 250 L empleados para el bioensayo de camarones con Fermento de salvado de arroz (Salv), Fermento de salvado de arroz con probiótico comercial (Salv + Com), Fermento de salvado de arroz con el consorcio (Salv + Bact) y el control sin fermento (Control).

Figura 2. Curva de crecimiento de las cepas utilizadas en el consorcio, volumen de 10 μ L del inóculo a una D.O.₆₀₀= 1.0, con una concentración inicial de 2×10^7 , n=3.

Figura 3. Curva de crecimiento de las cepas utilizadas en el consorcio, volumen de 100 μ L del inóculo a una D.O.₆₀₀= 1.0, con una concentración inicial de 2×10^7 , n=3.

Figura 4. Gráfica de ganancia de peso entre tratamientos. Promedio de 4 réplicas por tratamiento, n=12.

Figura 5. Contenido de amonio en el agua de cultivo a lo largo de 15 días del experimento, por método colorimétrico a una D.O. de 680 nm. (a) Tratamiento control, (b) Tratamiento con salvado, (c) Tratamiento salvado más consorcio de *Bacillus* y (d) Tratamiento con salvado más probiótico comercial.

Figura 6. Área lipídica de células epiteliales de hepatopáncreas (media \pm error estándar) μ m², utilizando ANOVA de una vía donde la variable dependiente fue el área de cobertura lipídica y la variable categórica el tratamiento, n=10.

Figura 7. Células epiteliales de túbulos de hepatopáncreas. 1. Muestra inicial, 2. Control, 3. Salv + Comercial, 4. Salv + Bacterias y 5. Salvado. Señalando células HpB (b), HpF (f) y HpR (r).

Figura 8. Filamento branquial de muestras obtenidas a partir de organismos tratados con salvado más bacterias. Se señalan las 3 mediciones hechas del ancho del filamento branquial.

Figura 9. Altura branquial (media \pm error estándar), utilizando ANOVA de una vía donde la variable dependiente fue la altura de las branquias y la variable categórica el tratamiento, n=10.

Figura 10. Abundancia relativa de grupos bacterianos del tracto digestivo de *Litopenaeus vannamei*.

Figura 11. Abundancia relativa de la muestra inicial de agua comparada con las muestras finales de los diferentes tratamientos.

Lista de tablas

Tabla I. Morfología de las colonias aisladas de MRS provenientes del tracto digestivo de camarón silvestre. Donde 26 de las 27 tuvieron morfología de Bacilos.

Tabla II. Producción de enzimas de las 8 cepas seleccionadas.

Tabla III. Identificación molecular de las cepas aisladas del medio de cultivo MRS, resultados obtenidos de la secuenciación parcial del gen 16S.

Tabla IV. Evaluación de la composición química proximal del salvado de arroz antes y después del tratamiento con NaOH.

Tabla V. Concentración y calidad de ADN de muestras de agua.

Tabla VI. Concentración y calidad de ADN de muestras de agua.

Tabla VII. Índice de diversidad de Shannon y riqueza Chao1 en el agua de cultivo.

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura ha experimentado un gran desarrollo en los últimos años debido a la intensificación de los métodos de cultivo (intensivo y superintensivo), donde uno de los principales problemas de este tipo de sistemas, es la acumulación de las diferentes formas de nitrógeno inorgánico (NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^-) en el agua (Avnimelech, 1999); la cual es generada por diversos factores como la lixiviación de alimento no consumido y residuos del metabolismo de los organismos en cultivo, afectando su crecimiento y supervivencia (Thompson *et al.*, 2002). Es por esto que, para mantener la salud de los organismos cultivados, se han empleado estrategias que se consideran viables como la utilización de bacterias beneficiosas (probióticos), para el cultivo de organismos acuáticos, tanto dulceacuícolas (Irianto y Austin, 2002; Irianto *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2006) como marinos (Dopazo *et al.*, 1988; Gatesoupe, 1999; Verschuere *et al.*, 2000). Esta estrategia consiste en aprovechar la actividad de algunos microorganismos que tienen efectos positivos sobre los organismos en cultivo; tales como la descomposición de materia orgánica, reducción de las concentraciones de nitrógeno y fósforo, mejorar el crecimiento de las algas, controlar amonio y nitrito, disminuir la incidencia de enfermedades y aumentar la supervivencia (Boyd y Massaut, 1999). Sin embargo, esta diversidad de usos, ha creado confusión en la definición original y en el uso del término control biológico, utilizándose en varias ocasiones, con referencia a bacterias o algas mejoradoras de la calidad de agua de cultivo, y dejando de lado el concepto inicial que engloba el control de la microbiota en el portador. De acuerdo con Karunasagar *et al.* (2007) el término más apropiado para estos casos sería el de "bioremediadores", para referirse exclusivamente a las células microbianas que permanecen vivas dentro del portador y que son capaces de mejorar su salud por recuperación del equilibrio interno microbiano. Se han realizado algunos estudios en busca de alternativas en los que resalta la importancia de las bacterias como agentes de control biológico mediante actividad antagónica (Sugita *et al.*, 1996). Por ello es necesario establecer buenas prácticas para el manejo de la calidad del agua, mediante el control biológico el cual consiste en la transformación de los compuestos amoniacales a formas menos tóxicas como el nitrato,

mediante la participación de poblaciones de microorganismos especializados, este compuesto es el más simple de asimilar en el ambiente además de que los organismos lo resisten en mayor cantidad que el nitrito. Esto se logra mediante la instalación de filtros biológicos tales como los sistemas de recirculación o por la formación de agregados microbianos en forma de tapetes o bien en suspensión en la columna de agua como flóculos, que de igual manera incorporan los nutrientes disueltos generando una mejora en las condiciones de cultivo, y una mayor disponibilidad y calidad de alimento natural, disminuyendo así el impacto negativo de las descargas sobre la calidad ambiental de los cuerpos de agua receptores (Azim *et al.*, 2008; Ray *et al.*, 2010).

En los últimos años, se ha puesto énfasis en el uso de fuentes de carbono adicionadas al agua de cultivo como forma más efectiva de bioremediación de los desechos nitrogenados (Hargreaves, 2006). De acuerdo con Crab *et al.*, (2012), cuando se genera un balance adecuado entre las proporciones de carbono (C) y nitrógeno (N) en el sistema de cultivo, los desechos nitrogenados generados por los organismos y en especial el amonio, son convertidos en biomasa microbiana, que posteriormente servirá como alimento natural. Un ejemplo, es el uso de salvado de arroz que ha sido considerado una fuente de carbono para la tecnología de biofloculación, sin embargo, su utilidad aparentemente puede ser limitada por las características de los carbohidratos y polisacáridos que contiene. Se sabe que el tipo de fuente de carbono utilizado en un sistema de biofloc determina la productividad y el valor nutritivo del mismo, así como la calidad del agua y el impacto sobre el rendimiento de los organismos cultivados, el uso de carbohidratos complejos conduce a mejor crecimiento de *Litopenaeus vannamei* y *Penaeus monodon*, lo que es explicado por un aparente mayor valor nutricional de los flóculos producidos (Kumar *et al.*, 2017; Serra *et al.*, 2015). Por lo que la generación de un fermento de salvado de arroz (FRB, por sus siglas en inglés) se presenta como una tecnología innovadora que incorpora carbohidratos a la unidad de cultivo promoviendo el reciclaje de los desechos generados por los organismos, así como el ocasionado por la lixiviación del alimento no consumido promoviendo el crecimiento de la biomasa bacteriana y conduciendo a la utilización de las proteínas de esta misma como alimento debido a que estimula el crecimiento de bacterias heterotróficas y éstas convierten los metabolitos tóxicos en biomasa microbiana, compuesta de diferentes materiales orgánicos

que pueden servir como fuente de nutrientes adicionales para los organismos cultivados (Avnimelech, 1999). Esta promoción de asimilación de nitrógeno por el crecimiento bacteriano puede reducir el amonio tóxico, disminuyendo de esta manera los costos de inversión y mantenimiento e incorporando un potencial reciclamiento de los desechos y el alimento no consumido (Crab *et al.*, 2012), mineralizando los desechos, mejorando la utilización de la proteína y reduciendo la dominancia de patógenos. Resolviendo de esta manera los problemas de impacto ambiental en cuerpos de agua generados por la actividad de la acuicultura además de influir en la obtención de productos de alta calidad, seguros, atractivos y socialmente aceptables (Chakravarty *et al.*, 2018), debido a que esta tecnología está basada en un mínimo recambio de agua para maximizar la bioseguridad y minimizar los efectos en el medioambiente (Romano, 2017).

2. ANTECEDENTES

A pesar de que el camarón es el recurso marino más valioso por su cultivo en grandes extensiones, ha sido una de las prácticas más criticadas debido a la destrucción de ecosistemas y el impacto ambiental que ha generado en zonas costeras como resultado de la intensificación de las técnicas de cultivo y el uso indiscriminado de químicos y antibióticos, que eventualmente se descargan sin ser tratados (Chakravarty *et al.*, 2018).

La acumulación de los desechos nitrogenados de los organismos en los cultivos intensivos, en forma de amoníaco, nitrito y nitrato deteriora gradualmente las condiciones del agua de cultivo, lo cual afecta principalmente el crecimiento y la supervivencia de los organismos (Waikhom *et al.*, 2018).

Xu *et al.* (2012), evaluaron la aportación proteica del biofloc en juveniles de camarón blanco con cero recambios de agua, obteniendo una fuente proteica suplementaria capaz de mantener la calidad del agua, logrando aumentar las proteinasas totales y tripsina en la glándula digestiva de los organismos cultivados. Además, el uso de esta estrategia ha demostrado mejorar el crecimiento y la eficiencia de alimentación en diversas especies, incluyendo el camarón blanco. Por su parte Khanjani *et al.* (2017) pusieron a prueba diferentes fuentes de carbono en el rendimiento de sistemas de cultivo con postlarvas de camarón; obteniendo como resultado un aumento en el peso y mayor supervivencia de los organismos. Otro de los beneficios de la adición de fuentes de carbono al sistema es que promueve la respuesta inmune, haciendo a los organismos resistentes a enfermedades. Ekasari *et al.* (2014), evaluaron diferentes fuentes de carbono (melaza, tapioca y salvado de arroz) en un cultivo de juveniles de camarón blanco para posteriormente hacer un reto de infección inyectando el virus de la mionecrosis infecciosa (IMNV), en donde obtuvieron mayor supervivencia, mejor asimilación de proteínas y un aumento en la actividad de la fenoloxidasa con respecto al control (sin fuente de carbono).

2.1 Comunidades microbianas en el ciclo del nitrógeno en acuicultura

Las comunidades microbianas desempeñan un papel fundamental dentro de los cultivos, ya que influyen en el ciclo de nutrientes, la productividad, nutrición de los organismos cultivados, calidad de agua, control de enfermedades y promueven la disminución del

impacto ambiental que ocasionan a los efluentes (Moriarty, 1997). En acuicultura la transformación del amonio generalmente es conceptualizada como un proceso de dos etapas, en el primer paso un grupo de bacterias oxidan el amonio (NH_4^+) como fuente de energía produciendo nitrito (NO_2^-) como subproducto, las bacterias oxidantes de amonio incluyen los géneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* y *Nitrosovibrio*. En el segundo paso un grupo de bacterias oxida nitrito a nitrato (NO_3^-), estas bacterias son conocidas como nitrito-oxidantes y típicamente pertenecen a los géneros *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* y *Nitrospina* (Timmons y Ebeling, 2007; Prosser, 1989; Kowalchuk y Stephen, 2001; Caffrey *et al.*, 2007).

Otra forma de transformación del amonio es mediante la asimilación heterotrófica, que consiste en una transformación del amonio a glutamina o glutamato las cuales pueden ser incorporadas en la ruta de síntesis de proteína. Las bacterias que lo realizan presentan la siguiente reacción metabólica que incluyen la descomposición del amonio para transformarlo en biomasa bacteriana:



El balance estequiométrico de esta reacción indica que para remover 1 g de amonio el consumo de carbohidratos será igual a 15.2 g, alcalinidad de 3,6 g y oxígeno de 4,7 g, produciendo sólidos en suspensión volátiles (SSV) de 8 g y CO_2 de 9,7 g. Dicho en otros términos por cada gramo de nitrógeno amoniacal total producido en un tanque de cultivo, es necesario añadir aproximadamente 15 g de hidratos de carbono (C: N de 15:1) (Avnimelech, 1999). Una consecuencia directa de la adición de carbohidratos para lograr estas proporciones es el aumento de la demanda de oxígeno disuelto, atribuido a las reacciones químicas propias de las bacterias heterótrofas (Schveitzer *et al.*, 2013).

Existen bacterias capaces de mantener la calidad del agua y mejorar el crecimiento de los organismos cultivados, Melgar *et al* (2013), probaron una mezcla comercial en diferentes dosis (4 l/ha y 10 l/ha) de *Rhodopseudomonas palustris*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* y *Saccharomyces cerevisiae* y su efecto en la calidad de agua, sedimento y crecimiento de *Litopenaeus vannamei* y obtuvieron como resultado que en ambos tratamientos hubo un menor tiempo de cosecha, además se mantuvieron regulados los niveles

de pH significativamente, redujeron las concentraciones de nitrato y aumentó la supervivencia con respecto al control.

Nimrat *et al.*, (2012), evaluaron el efecto de dos mezclas de *Bacillus* (Probiótico A y Probiótico B) en el crecimiento y calidad de agua durante la crianza de larvas y postlarvas de *Litopenaeus vannamei*, al final del experimento no observaron diferencias en el crecimiento y supervivencia de las larvas con los tratamientos que contenían *Bacillus*, sin embargo, hubo diferencias en el crecimiento de las postlarvas tratadas con el Probiótico B con respecto al A y el control. Además, en ambos tratamientos, los niveles de pH, amoníaco y nitrito disminuyeron significativamente en comparación al control.

Wang *et al.*, (2005), probaron la efectividad de probióticos comerciales para mejorar la calidad de agua y la densidad de bacterias beneficiosas en el cultivo de camarón blanco y obtuvieron como resultado que aquellos estanques tratados con probióticos comerciales mejoraron la microbiota benéfica y por consiguiente se redujeron las concentraciones de nitrógeno y fósforo, aumentando significativamente el oxígeno disuelto ($P < 0.05$), además hubo un mayor recuento promedio de *Bacillus sp*, bacterias amonificantes y mineralizantes a diferencia del control. Dalmin *et al.*, (2002), evaluaron probióticos comerciales compuestos por *Bacillus spp.* en estanques de cultivo de *Penaeus monodon*, monitoreando bacterias heterótrofas totales (BHT), bacterias beneficiosas y bacterias patógenas a lo largo del experimento. El tratamiento con probiótico tuvo un aumento en BHT y bacterias beneficiosas en comparación con el control y, además, el tanque tuvo una menor carga orgánica y mayor transparencia del agua de cultivo. Concluyendo que los probióticos utilizados en el experimento tienen la capacidad de mejorar las condiciones del cultivo y por consecuencia promover el crecimiento y la supervivencia de los organismos. Por su parte Shan y Obbard (2001), utilizaron cultivos de bacterias nitrificantes aisladas del agua de cultivo de camarón, se enriquecieron y se colocaron en bolas pequeñas de arcilla porosa para posteriormente agregarlas al tanque en condiciones aeróbicas, se evaluó la capacidad de disminución del amonio total y obtuvieron que estas eran capaces de mantener una concentración menor de 0.5 mg/l.

2.2 Control de los niveles de nitrógeno tóxico en el cultivo de camarón

La acuicultura en altas densidades, tiene mayor probabilidad de que los organismos cultivados se encuentren expuestos a concentraciones altas de los desechos nitrogenados que se acumulan en el agua, lo cual disminuye la supervivencia, inhibe el crecimiento y causa disfunciones fisiológicas. El amoníaco y el nitrito actúan como factores estresantes, estimulando la liberación de hormonas corticosteroides las cuales están relacionadas a la inmunosupresión del organismo y por consecuencia una menor resistencia a la incidencia de enfermedades (Tomasso, 1994).

Los métodos más comunes para controlar el amonio en el agua consisten en el recambio de agua constantes, uso de biofiltros, fuentes de carbono para la asimilación de proteína microbiana, entre otros (Avnimelech, 1999). Una estrategia para mejorar la calidad del agua en los sistemas de cultivo y que promete dar solución a esta problemática son los sistemas de biofloc, que de acuerdo con Hargreaves (2006), consiste en incrementar la proporción de carbono/nitrógeno mediante la adición de una fuente de carbono externa que por consecuencia promueva el crecimiento de bacterias heterotróficas en el sistema de cultivo, reduciendo los recambios de agua casi a un 0%.

En el caso del uso de biofiltros, Rogers y Klemetson (1985) pusieron a prueba cuatro filtros biológicos de película fija (contactor biológico giratorio, rayo, filtro de goteo y filtro anaeróbico suspendido) en un sistema de cultivo de peces para eliminar amoníaco, obteniendo como resultado la eliminación del 90% del amoníaco con el contactor biológico giratorio.

Por su parte, Gaona *et al* (2011) evaluaron la eliminación de sólidos suspendidos del agua de cultivo en tanques con biofloc, obteniendo que, al eliminar sólidos suspendidos mediante sedimentación de partículas, el oxígeno disuelto y valores de pH aumentaron, además de que la tasa de conversión alimenticia, supervivencia y productividad fueron mayores significativamente ($p < 0.05$) en comparación al tratamiento con biofloc (sin eliminación de sólidos suspendidos) y al control.

En la actualidad se buscan estrategias de cultivo que sean económicamente más eficientes y que permitan reducir el impacto de la acuicultura sobre el ambiente (Hargreaves, 2006). En este sentido, la biotransformación es considerada una eficiente estrategia para disminuir los

efectos negativos que producen las elevadas concentraciones de nitrógeno amoniacal, sin embargo, la capacidad de biotransformación microbiana depende de la tasa metabólica de los grupos microbianos implicados en el proceso, en este sentido, la asimilación heterotrófica de amonio es considerablemente más rápida que el proceso de nitrificación y a diferencia de este, tiene una menor dependencia de la disponibilidad del oxígeno (Frías-Espericueta y Páez-Osuna, 2001).

2.3 Carbono en la asimilación microbiana del amonio

Se sabe que el uso de una fuente de carbono compleja, como el salvado de arroz, puede dar un mejor resultado en cuestión del rendimiento en el crecimiento a diferencia de las fuentes de carbono simple. Serra *et al.*, (2015), realizaron dos experimentos en cultivos con postlarvas de camarón blanco, comparando fuentes de carbono complejas contra fuentes de carbono simples para evaluar la eficiencia sobre el crecimiento y en la disminución de las concentraciones de amonio, En el primero compararon melaza contra salvado de arroz y en el segundo dextrosa contra salvado de arroz, obteniendo en los dos experimentos una disminución significativa ($p < 0.05$) en las concentraciones de amonio al utilizar melaza y dextrosa, pero en ambos casos el salvado de arroz generó mayor rendimiento en el crecimiento.

Una manera de utilizar adecuadamente las fuentes de carbono complejas para promover el crecimiento y, además, lograr mejorar la calidad de agua, es mediante el uso de microorganismos que tengan la capacidad de fermentar y favorezcan la solubilidad de la fuente de carbono en el agua. Romano *et al.*, (2018), hicieron un experimento con cultivos de bagre africano donde probaron tres tratamientos (salvado de arroz crudo, salvado de arroz incubado con *Bacillus* spp. con aireación y sin aireación), comparando la eficiencia del salvado de arroz crudo y el salvado de arroz fermentado con *Bacillus* spp., donde éste fue el más efectivo porque tuvo una mayor solubilidad en el agua que el crudo, dando como resultado una mejor calidad de agua; además de un incremento en el crecimiento y eficacia de alimentación. Otro estudio enfocado a la fermentación de salvado de arroz mediante el uso de microorganismos es el de Supriyati *et al.*, (2015) quienes utilizaron *Bacillus*

amyloliquefaciens para aumentar la calidad del salvado de arroz que se da como alimento a pollos de engorda, observando que durante la fermentación el contenido de fibra cruda se redujo significativamente y al suministrarlo como alimento obtuvieron mejores valores de ganancia de peso corporal y tasa de conversión de alimentación.

2.4 Salvado de arroz en los sistemas de producción de acuícola

En acuicultura el salvado de arroz es ampliamente utilizado como suplemento alimenticio y de acuerdo con Ranjan *et al.*, (2018), la suplementación del salvado con enzimas mejora significativamente el crecimiento de peces. En este mismo sentido, se sabe que la fermentación del salvado de arroz con *Bacillus amyloliquefaciens* y sustancias húmicas incrementa su valor nutricional, reduce el contenido de fibra cruda y aumenta el contenido de proteína cruda (Supriyati *et al.*, 2015). Mientras que la fermentación con *Rhizopus oryzae* produce un incremento en el contenido de fosfolípidos y ácidos grasos insaturados, mientras que la grasa total y los ácidos grasos saturados disminuyen (Oliveira *et al.*, 2011). Por lo que parece evidente que la fermentación con microbios específicos puede aumentar el valor de los subproductos agrícolas (Ranjan *et al.*, 2018).

El salvado de arroz también ha sido considerado una fuente de carbono para la tecnología de biofloculación, sin embargo, su utilidad aparentemente puede ser limitada por las características de los carbohidratos y polisacáridos que contiene. Se sabe que el tipo de fuente de carbono usado en un sistema de biofloc determina la productividad y el valor nutritivo del mismo, así como la calidad del agua y el impacto sobre el rendimiento de los organismos cultivados, el uso de carbohidratos complejos conduce a mejor crecimiento de *Litopenaeus vannamei* y *Penaeus monodon*, lo que es explicado por un aparente mayor valor nutricional de los flóculos producidos (Kumar *et al.*, 2017; Serra *et al.*, 2015).

Por otro lado, los azúcares simples o el glicerol son más efectivos para eliminar el amonio en los sistemas basados en biofloculación que los carbohidratos complejos (Dauda *et al.*, 2017; Khanjani *et al.*, 2017; Serra *et al.*, 2015). Por ejemplo, en el cultivo de peces, la aplicación de salvado de arroz condujo a niveles excesivos de amonio, debido a un consumo más lento de esta fuente de carbono (Dauda *et al.*, 2017). Por lo anterior se ha sugerido que

se puede lograr una mejor gestión de la calidad del agua si se mejora la solubilidad del salvado de arroz mediante tratamientos previos con microorganismos, enzimas y/o fermentación (Dauda *et al.*, 2017; Ekasari *et al.*, 2014).

Actualmente existen enzimas microbianas disponibles, así como microorganismos capaces de producir enzimas hidrolíticas que pueden ayudar a reducir el contenido de fibra de los carbohidratos complejos y mejorar la solubilidad en agua, por lo que parece viable que el tratamiento previo del salvado de arroz pueda mejorar su solubilidad en agua al reducir el contenido de fibra y por lo tanto aumentar su potencial como fuente de carbono en los sistemas basados en biofloculación, si tiene éxito, esto podría permitir una mayor flexibilidad en la elección de las fuentes de carbono, que en el caso del salvado de arroz es un subproducto agrícola de bajo costo que está fácilmente disponible (Romano *et al.*, 2018).

La selección de cepas para fermentación de cereales actualmente juega un papel relevante al tratar de introducir comunidades con funciones específicas para el tratamiento de agua (Shih *et al.*, 2005). Y por lo mismo, resulta relevante buscar una comunidad con alta capacidad de asimilación de amonio que adicionalmente cumpla otras funciones dentro de la acuicultura (Dittman *et al.*, 2017). Por lo tanto, las bacterias heterotróficas aerobias pueden ser más adecuadas para disminuir la acumulación de compuestos del nitrógeno en la industria de la acuicultura (Huang *et al.*, 2017). Las cepas probióticas que son capaces de realizar la asimilación de amonio pueden ser candidatos idóneos para los cultivos marinos, además de que pueden ser más efectivas y seguras para la aplicación en la industria de acuicultura, pero pocos estudios han detallado las capacidades asimilatorias de cepas de *Bacillus* aisladas de ambientes acuícolas y su seguridad para los animales acuáticos (Huang *et al.*, 2017). La aplicación junto con el salvado como fuente de carbono puede resultar en beneficios múltiples para el cultivo. Este concepto es relativamente nuevo y actualmente se evalúa si las partículas de salvado de arroz colonizadas con probióticos pueden actuar como un simbiótico y estas al comportarse como un coloide pueden sustituir a los sistemas basados en biofloc, en cuyo caso su capacidad de remoción de amonio puede ser una clave de su mayor eficiencia.

3. JUSTIFICACIÓN

En acuicultura es indispensable tener mecanismos de control de amonio, ya que este compuesto nitrogenado tiene una gran influencia en el desarrollo óptimo de los organismos (Caipang y Aguana, 2011), las altas concentraciones de los compuestos nitrogenados causan estrés en el camarón y favorecen la proliferación de patógenos, provocando infecciones, lento crecimiento o la muerte de los organismos (Carroza *et al.*, 2012). además de que esto lleva consigo un alto costo ambiental por el severo impacto que causan las descargas de desechos al medio ambiente además de producir la mortalidad de los organismos, generando pérdidas económicas. Existen diversas tecnologías para mantener o mejorar la calidad de agua, por la microbiota inducida con características probióticas sobre el cultivo de interés, de tal manera que la capacidad de biotransformación dependería de la tasa metabólica de los grupos microbianos, reduciendo el porcentaje de recambio y la incidencia de enfermedades en los cultivos, tal es el caso de la tecnología de FRB que puede contribuir en la reducción de los desechos nitrogenados provenientes del sistema de cultivo, con mayor eficiencia y menor costo económico y ambiental. Sin embargo, hasta ahora la información de la generación del FRB y cómo afecta las comunidades microbianas de los organismos no está del todo estudiada en los sistemas de cultivo, por lo que el presente trabajo busca contribuir en la incorporación de un consorcio de bacterias ácido lácticas que pueden promover la optimización del uso del alimento y minimizar el impacto de los desechos nitrogenados en la calidad del agua de cultivo y de las descargas al medioambiente.

4. HIPÓTESIS

Considerando que existen bacterias del genero *Bacillus* que poseen una mayor capacidad de asimilación de amonio y que el salvado de arroz puede ser una fuente de carbono disponible para promover la ruta asimilatoria, la fermentación de salvado con un consorcio de *Bacillus* sp. promoverá un control eficiente en la calidad del agua y el estado de salud del cultivo de camarón.

5. OBJETIVOS

5.1. *Objetivo general*

Evaluar el uso de fermento de salvado de arroz empleando un consorcio de *Bacillus* sp. en el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

5.2. *Objetivos particulares*

1. Aislar y caracterizar bacterias del género *Bacillus* spp. de hepatopáncreas y tracto digestivo de organismos silvestres de *Litopenaeus vannamei*.
2. Seleccionar un consorcio de bacterias del género *Bacillus* con capacidad de asimilar amonio
3. Evaluar las condiciones de fermentación de salvado de arroz
4. Determinar la composición del salvado de arroz antes y después de la fermentación, así como la afinidad de las bacterias del género *Bacillus* al salvado de arroz.
5. Evaluar el fermento del salvado de arroz producido por *Bacillus* spp. como base para mejorar la calidad de agua y salud de los organismos en cultivo.
6. Evaluación de las comunidades bacterianas del agua de cultivo y tracto digestivo de juveniles de camarón mediante secuenciación masiva del gen 16S ARN ribosomal y análisis bioinformático.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas de organismos silvestres de

Litopenaeus vannamei.

6.1.1. Aislamiento de las cepas

Se colectaron 22 muestras de hepatopáncreas y tracto digestivo de camarones silvestres, provenientes de las costas de Sinaloa (Teacapan y Huizache), las cuales fueron fijadas con glicerol al 50% para su transporte en nitrógeno líquido y para su traslado al laboratorio de microbiología del CIBNOR y almacenadas en ultracongelación a -80°C hasta su procesamiento. En el laboratorio se homogenizaron con un disruptor de tejidos (Biospec Productos, Bartlesville, Ok) en tubos estériles con 7 ml de Infusión Cerebro corazón (BHI) suplementado con 2.5% de NaCl. Posteriormente, de cada homogenizado se sembraron por triplicado 20 μL del extracto en una placa de agar MRS con 2.5% de NaCl, y se incubó a 35°C durante 24 horas. Las colonias que crecieron se aislaron y caracterizaron con base a Tinción de Gram, Forma y Tamaño. Para los experimentos las cepas fueron ajustadas a una densidad óptica de 1 a 600 nm ($\text{DO}_{600}=1$) en un Biophotometer Eppendorf y el número de unidades formadoras de colonias (UFC) se contaron después de cada dilución serial en 2.5% NaCl en placas de Agar Soya tryptocasein (TSA) suplementado con 2.5% de NaCl.

6.1.2. Actividad hemolítica de cepas

La actividad hemolítica fue determinada de acuerdo con Cowan y Steel's (1993); en la cual se emplearon placas Petri con base agar y 5% de sangre de ternera. Se hicieron estrías de cada una de las cepas y se incubaron a 35°C , por 24 h. El tipo de hemólisis se interpretó de acuerdo al procedimiento estándar que se basa en la coloración que se produce alrededor de la punción después del periodo de incubación. La coloración verde-grisácea se interpretó como hemólisis alfa y la coloración amarilla como hemólisis beta, con base en la degradación parcial o total de los eritrocitos, respectivamente.

6.1.3. Evaluación de la producción de enzimas extracelulares con la galería Api Zym (API®/ID32, Biomereux)

Se realizaron suspensiones bacterianas ($DO_{600}=0.7$) en solución salina al 0.8 % con cultivos bacterianos de 24 h. para posteriormente inocular la galería a 35 °C por 4 h, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Pasado este tiempo, se añadió una gota de reactivo ZYM A y una gota del reactivo ZYM B dejando en reposo las muestras por 10 m a temperatura ambiente. Posteriormente, la galería fue expuesta 10 s a 245 nm de radiación UV, a una distancia de 15 cm por encima de las cúpulas con la finalidad de eliminar el fondo amarillo debido al exceso de compuesto que no reaccionó. La actividad enzimática fue determinada y semicuantificada de acuerdo a la intensidad de color usando la ficha de referencia Api Zym (Anexo 1).

6.1.4. Caracterización molecular de las cepas aisladas

6.1.4.1 Aislamiento de ADN

Para la extracción de ADN de las cepas aisladas se utilizó el kit MO BIO Laboratories, Inc. (UltraClean Microbial DNA Isolation Kit) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y la pureza del ADN total se determinaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y un espectrofotómetro NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies, Wilmington, EE. UU.).

6.1.4.2. Amplificación del fragmento del gen 16s ARNr mediante PCR

Se utilizaron dos pares de oligonucleótidos para amplificar una región del gen 16s con los primers 27F (GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG) y 1495R (CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA) (Bianciotto *et al.*, 1996) con el fin de obtener un fragmento relativamente grande. La reacción se realizó en tubos Eppendorf de 200 µl de capacidad con 50 µl de la mezcla de reacción. La reacción de amplificación contenía 100 ng de ADN, 0.25 µM de cada oligo, 5 µL de buffer PCR 10X, 10 mM de dNTP's, 1 U de Taq polimerasa y agua mili-Q estéril para

tener un volumen final de 50 μ L. Las reacciones se amplificaron en un termociclador BIORAD MJ Mini, las condiciones en las que se amplificaron fueron las siguientes: 2 min a 95 °C, 30 seg a 95 °C, 30 seg a 56 °C, después 1 min a 72 °C, posteriormente 5 min a 72 °C y por último infinito a 4 °C hasta retirar las muestras.

Los productos de PCR se evaluaron en geles de agarosa al 1% en buffer TBE. De cada reacción se tomaron 5.0 μ L y se mezclaron con 2 μ L de buffer de carga Como estándar se utilizaron 2 μ L del marcador de 10 Kb DNA Ladder (INVITROGEN).

Los productos fueron enviados para su secuenciación a los laboratorios de MacroGen (<http://www.macrogen.com>) en Seúl, Korea. Una vez obtenidas las secuencias se depuraron y alinearon utilizando el software Codon Code Aligner. Para esto, se eliminaron bases de baja calidad al inicio y al final de cada secuencia, se alinearon los fragmentos de secuencias para construir el consenso y finalmente se analizaron las discrepancias y se corrigieron donde fuera necesario. Adicionalmente se efectuaron análisis de alineamiento Blast entre las secuencias obtenidas en el presente estudio y aquellas reportadas en el National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

6.2. Generación del consorcio

6.2.1. Antagonismo entre cepas

La actividad antagónica de cada cepa sobre otras para la generación del consorcio, fue probada mediante el método de difusión en discos (Whatman No. 1), para lo cual, cada disco fue impregnado con 100 μ l de una suspensión bacteriana ajustada a una D.O.=1, λ =600 en solución salina al 2.5 %. Los discos fueron colocados sobre placas de agar soya triptocaseina previamente inoculadas mediante un hisopo con una suspensión de cada bacteria. La actividad fue determinada por la presencia de halos después de 24 horas de incubación a 35°C.

6.2.2. Curva de crecimiento de las cepas

Para determinar la tasa de crecimiento de cada una de las cepas, se realizó a partir de un cultivo de 24 h en microplaca de 96 pozos, con dos concentraciones (10 μ L y 100 μ L) de

cada inóculo en solución salina a 1.0 D.O₆₀₀ y posteriormente se ajustó a un volumen de 300 µL con TSB. La microplaca se incubó a 35°C en un lector de microplaca (Varioskan, Thermo Fisher Scientific) tomando lecturas cada hora durante 24 horas. El crecimiento de las bacterias fue registrado cada hora como el incremento en absorbancia a 600 nm. Los parámetros de crecimiento para cada cepa se calcularon ajustándolos a los modelos logístico $y = a \cdot (1 + \exp(b - cx))^{-1}$ y de tasa de crecimiento K, el cual indica el tiempo en el que la población alcanza su duplicación y se obtuvieron de la siguiente manera:

$$K = \frac{\log X_t - \log X_0}{0.301 (t)}$$

Donde K es la tasa de crecimiento, log X_t es el logaritmo base 10 de la densidad óptica del cultivo bacteriano al tiempo “X” de crecimiento exponencial de la población y log X₀ es el logaritmo base 10 de la densidad óptica del cultivo bacteriano al tiempo “0” o inicial.

6.3. Determinar la composición del salvado de arroz antes y después de la fermentación, así como la afinidad de las bacterias ácido lácticas.

6.3.1. Determinación de la composición del salvado de arroz

6.3.1.1. Análisis químico proximal del salvado

Para determinar la composición del salvado, se realizó un análisis químico proximal del salvado de arroz y del salvado pre tratado con NaOH al 1%, para conocer el contenido de lípidos se utilizó el método de Soxtec-Avanti, la cuantificación de proteínas se realizó con el método de Dumas basado en combustión (Leco FP-528) y se utilizó el método de determinación por diferencia de peso (calcinación a 600° C / 5 h) para cuantificar cenizas en cada muestra.

6.3.1.2. Cuantificación de carbohidratos del salvado

Para la cuantificación de carbohidratos se utilizó el método propuesto por Roe *et al* (1961), utilizando muestras de 5 g de salvado sin tratar y de salvado pre tratado por NaOH al 1%.

6.3.2. Afinidad de las cepas bacterianas al salvado de arroz

6.3.2.1. Pre tratamiento del salvado de arroz.

Para determinar la fermentación en estado sólido (SSF, por sus siglas en inglés) del salvado de arroz, éste se trató con hidróxido de sodio (NaOH) al 1% el cual se esterilizó a 121 °C durante 20 minutos, para eliminar las fracciones de lignina del núcleo. Posteriormente se lavó con abundante agua corriente y posteriormente con agua destilada hasta alcanzar la neutralidad y finalmente dejarlo secar a 80 °C. Una vez seco para la producción de enzimas, a 5 g de salvado de arroz modificado se le agregaron 10 ml de solución de sal mineral que contiene (g / l) KH_2PO_4 (0.1), NaCl (0.25), MgSO_4 (0.01) y CaCl_2 (0.01) y se esterilizaron 121 ° C durante 15 min. Posteriormente de acuerdo a la metodología de Gomaa (2013) se agregó 1 mL del inóculo de cada bacteria ajustado a 1.0 OD_{600} y se incubaron a 35 ° C durante 72 h.

6.3.2.2. Preparación del inóculo

Una vez seco para la producción de enzimas, a 5 g de salvado de arroz modificado se le agregaron 10 ml de solución de sal mineral que contiene (g / l) KH_2PO_4 (0.1), NaCl (0.25), MgSO_4 (0.01) y CaCl_2 (0.01) y se esterilizaron 121 ° C durante 15 min. Posteriormente de acuerdo a la metodología de Gomaa (2013) se agregó 1 mL del inóculo de cada bacteria ajustado a 1.0 OD_{600} y se incubaron a 35 ° C durante 72 h.

6.3.2.3. Cálculo de UFC bacteriano en el salvado tratado

Para el cálculo del número de bacterias se evaluó mediante técnicas microbiológicas estándar. Brevemente, a partir de 5 g de salvado pre tratado, inoculado con 1 mL de cada cepa a una D.O de 1.0, se tomó 1 g de cada matraz y se homogenizó en 9 mL de solución salina al momento de la inoculación y al final de la fermentación a las 72 horas, a partir del homogenizado se hicieron diluciones decimales en solución salina al 2.5 % de NaCl y las diluciones fueron sembradas en placas de TSA. La carga bacteriana fue expresada en unidades formadoras de colonia UFC por mililitro.

6.4. Evaluación del fermento de salvado de arroz producido por *Bacillus* como base para mejorar la calidad de agua y salud de los organismos

6.4.1. Preparación de los tratamientos

Para la evaluación del fermento en un modelo acuícola se usaron tres tratamientos diferentes incluyendo salvado de arroz, los cuales fueron; solo salvado (Salv), salvado de arroz más un probiótico comercial (Salv + Com) (EPICIN-HATCHERIES, Epicore Networks Eastampton, NJ U.S.A) y salvado de arroz más el consorcio (Salv + Com). La formulación del tratamiento Salv fue de 350 g de salvado de arroz, del Salv + Com fue de 340 g de salvado de arroz más 10 g de probiótico comercial y del Salv + Bact fue de 285 g de salvado de arroz más 65 g del inóculo; a cada uno se les agregó 3.5 L de agua de mar y se dejó en aireación durante 24 horas para posteriormente agregar 2 litros, este procedimiento se repitió cada dos días.

6.4.2. Bioensayo

La actividad del fermento fue evaluada en un cultivo de camarón dentro de las instalaciones del CIBNOR, en una unidad piloto de 15 tanques de 250 L con 12 organismos cada uno de 6-7 g en 200 L de agua de mar filtrada (Fig. 1), equipados con un sistema de aireación

diseñado para inducir la formación de flóculos microbianos, durante 30 días evaluando por cuadruplicado tres tratamientos diferentes (1) Fermento de salvado de arroz (Salv) (2) Fermento de salvado de arroz con probiótico comercial (Salv + Com), (3) Fermento de salvado de arroz con el consorcio (Salv + Bact) y el control sin fermento (Control), agregando 2 L de los tratamientos cada dos días, monitoreando diariamente la temperatura de cada unidad, y cada tercer día el amonio, nitritos, nitratos y pH con el Kit Ammonia NH₃/NH₄⁺ de Api®; además de un seguimiento de los parámetros de calidad de agua tomando muestras diarias para evaluar la concentración de amonio (N-NH₄).



Figura 1. Tanques de 250 L empleados para el bioensayo de camarones con Fermento de salvado de arroz (Salv), Fermento de salvado de arroz con probiótico comercial (Salv + Com), Fermento de salvado de arroz con el consorcio (Salv + Bact) y el control sin fermento (Control).

6.4.3. Zootecnia

De los ensayos con los diferentes tratamientos de uso de salvado de arroz durante 30 días en el laboratorio del CIBNOR, los organismos fueron alimentados a saciedad en dos raciones, ajustando diariamente la tasa de alimentación considerando el consumo de alimento (Benítez *et al.*, 2018). Evaluando al final la supervivencia y el rango de peso para cada replica.

6.4.4. Efecto del inóculo de salvado de arroz fermentado sobre el consumo de amonio

Se tomaron muestras de aproximadamente 15 mL de los 15 tanques durante los 29 días del experimento y se almacenaron en congelación para posteriormente cuantificar la concentración de amonio a lo largo del experimento.

Se utilizó un método de colorimetría para cuantificar la concentración de amonio en el agua de cada uno de los tratamientos, basándonos en los parámetros medibles del Kit Ammonia NH₃/NH₄⁺ de Api®, para esto se agregaron 5 mL de cada muestra en tubos Falcon de 15 mL y se les agregó 8 gotas de los reactivos 1 y 2 del kit, posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a una velocidad de 7,000 rpm, una vez hecho esto se colocaron tres réplicas de 300 µL de cada muestra en una microplaca de 96 pozos para medir a una absorbancia de 680 nm en un lector de microplaca (Varioskan, Thermo Fisher Scientific). Los valores obtenidos se compararon con la tarjeta de colores que viene con el Kit Ammonia NH₃/NH₄⁺ de Api®.

6.4.5. Toma de muestras de agua para secuenciación masiva del gen 16S

De cada uno de los tanques, se tomaron aproximadamente 100 ml con la ayuda de un frasco, el cual se sumergió a lo largo del tanque, con la finalidad de tomar una muestra representativa de todo el tanque a una profundidad media y superficial, una vez colectada el agua ésta se vertía en un recipiente para posteriormente, ser filtrada a través de una membrana de 0.2µm, con la cual se retendría el total de microorganismos presentes en el cuerpo de agua; posteriormente, la membrana se fijó en una solución STE buffer (0.1 m NaCl, 0.05 m Tris-HCl, pH 7.5, 0.001 m EDTA) manteniéndolas a 4°C, para posteriormente realizar la extracción y purificación de ADN.

6.4.6. Toma de muestras de tracto digestivo para secuenciación masiva del gen 16S ARN ribosomal

Se tomaron muestras del tracto digestivo de 10 organismos en el día cero del experimento y al finalizar el bioensayo, se extrajo el tracto digestivo de tres organismos de cada tanque con

pinzas de disección estériles con la finalidad de hacer pools para obtener una muestra representativa de los tratamientos y se almacenó en 1.5 mL de etanol al 96% a 4°C para posteriormente realizar la extracción y purificación del ADN.

6.4.7. Toma y procesamiento de muestras para histología de hepatopáncreas

Se fijaron 10 organismos al azar de cada tratamiento en solución Davidson, para su procesamiento histológico. Posteriormente se obtuvo una sección longitudinal de cada organismo donde se incluyera el hepatopáncreas, siguiendo el método descrito por Bell y Lightner (1988), una vez hecho esto, las muestras se colocaron en histocassettes para posteriormente procesarlas. Los tejidos se depositaron en alcohol etílico al 70% durante 24 horas y el procesamiento histológico se realizó con un procesador automático de tejidos (LEICA ASP200S®). Para deshidratar las muestras, se realizaron series de alcohol etílico en concentración ascendente (70, 80, 90, 96 y 100%), posteriormente se aclaró con xileno al 100%, pasando antes por alcohol etílico 100: xileno (1:1) y después por xileno al 100%. Para infiltrar las muestras en parafina, estas se introdujeron en un recipiente con una solución 1:1 de parafina:xileno, después se colocaron en otros recipientes con parafina líquida a 60°C. La inclusión de las muestras se realizó en Paraplast X-Tra (Mc Cormick Scientific, San Diego, CA) con punto de fusión de 54-56 °C en un centro de inclusión (LEICA EG1150H y EG1150C®), los moldes se enfriaron en una placa fría a -5°C.

Se utilizó un microtomo de rotación automático (LEICA RM2155®) para el corte de tejidos a 4 µm de grosor y posteriormente se pusieron en un baño de flotación con agua y grenetina al 1% a 43°C, los cortes se colocaron en portaobjetos y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas. Los cortes se desparafinaron en tres pasos (xileno I, II y III) por 10 min en cada paso y se les añadió solución 50:50 de alcohol etílico 100%-xileno por 5 min, posteriormente se hidrataron con alcohol en serie decreciente (96, 70 y 70%) por dos minutos cada uno y finalmente se pasaron por agua destilada.

6.4.8. Tinción Hematoxilina-Eosina (H-E)

Los cortes de tejido de hepatopáncreas se procesaron en un teñidor automático de tejidos (LEICA ST5020[®]). Para la observación visual de los tejidos, se empleó la técnica de tinción Hematoxilina-Eosina. Las laminillas se montaron en medio permanente de resina sintética Entellan[®] y se dejaron secar por 24 horas, finalmente se observaron en el microscopio las estructuras histológicas del tejido.

La observación de las laminillas se realizó en un microscopio de campo claro Olympus BX41; las imágenes fueron digitalizadas usando el campo claro con una cámara digital para microscopio marca Nikon Digital Sight DS-Ri1[®] conectada a una computadora. Las imágenes (microfotografías) de los tejidos fueron digitalizadas con los objetivos 10, 20, 40, 60 y 100×, y analizadas digitalmente con el software Image Pro Premier (versión 9.0) Olympus-Media Cybernetics[®]. Los cortes teñidos se utilizaron para medir el área de las vesículas lipídicas de las células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas.

6.5. Evaluación de las comunidades bacterianas del agua de cultivo y tracto digestivo mediante secuenciación masiva del 16S ARN ribosomal y análisis bioinformático.

6.5.1. Extracción de ADN a partir de muestras de agua

El ADN bacteriano de las muestras concentradas se extrajo con el kit de aislamiento de ADN Power Water (Mo Bio Laboratories, Inc, Carlsbad, CA). La concentración de ADN y la pureza se midieron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Wilmington, EE. UU.). Una vez obtenido el ADN, la calidad se verificó mediante una electroforesis con gel de agarosa al 0.8% y buffer TBE a 90 V por 30 minutos, para posteriormente fotodocumentarlo.

6.5.2. Extracción de ADN a partir de muestras del tracto digestivo

El ADN de tracto digestivo de los organismos se extrajo mediante el método casero de sales, se hicieron tres réplicas de cada tratamiento. El tejido se homogenizó con un pistilo de plástico estéril adicionando 400 μ L de buffer de lisis (NaCl 100mM, Tris 50 mM, EDTA 100, SDS 1%) y 2 μ L de proteinasa K (10 μ g x μ L), posteriormente se colocaron a baño María durante 60 min a 60 °C. Una vez hecho esto se adicionaron 200 μ L de NaCl 6M, se agitaron y se incubó en hielo durante 10 minutos. Las muestras se centrifugaron a 12,000 g por 10 min a temperatura ambiente y se transfirió el sobrenadante a tubos con 1 mL de etanol absoluto frío y se incubó durante toda la noche, al día siguiente se centrifugaron las muestras a 12,000 g por 10 min y se descartó el sobrenadante para añadir 1 mL de etanol al 70%, una vez hecho esto se centrifugó de nuevo a 12,000 g durante 10 min y una vez más se descartó el sobrenadante, las muestras se secaron en un concentrador de vacío (Speed Vac) durante una hora y el ADN obtenido se diluyó en 50 μ L de agua miliQ.

6.5.3. Secuenciación masiva del gen 16S ARN ribosomal

La preparación de la biblioteca se realizó siguiendo el protocolo para secuenciación metagenómica 16S de Illumina (Part # 15044223 Rev. B); brevemente, la amplificación por PCR de la región variable V3 del gen 16S ARNr se amplificó con los cebadores propuestos por Huses et al., (2008) con adaptadores Illumina: 16S-V3_338f (TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG acy cct acg ggr ggc agc ag) y 16S-V3_533r (GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA G tta ccg cgg ctg ctg gca c). El protocolo de amplificación fue de un ciclo a 95 ° C / 3 min, seguido de 30 ciclos de 95 ° C / 30 s, 60 ° C / 30 s y 72 ° C / 30 s, y un ciclo final de 72 ° C / 5 minutos. Los amplicones de PCR se purificaron con perlas magnéticas de Ampure XP y luego se agregaron índices de Illumina para cada muestra en una segunda PCR a 95 ° C / 3 min, seguido de 8 ciclos de 95 ° C / 30 s, 55 ° C / 30 s, y 72 ° C / 30 s, y un ciclo final de 72 ° C / 5 min., Seguido de una segunda limpieza con cuentas.

Los amplicones de PCR finales se cuantificaron con Qubit (Thermo Scientific) Y se preparó un conjunto equimolar. Este conjunto se cuantificó con el método de HS para el Qubit y se

ajustó a 4 nM para mayor desnaturalización, a una dilución a 2 pM y secuenciación en una flow cell (300 ciclos) en Miniseq de Illumina.

6.5.4. Análisis bioinformático

Las secuencias Fastq se procesaron con el software Mothur (Schloss *et al.*, 2009) utilizando el pipeline MiSeq SOP (https://mothur.org/wiki/MiSeq_SOP); para comenzar, una vez que se ejecutó Mothur se estableció en qué carpeta se iba a trabajar para posteriormente combinar el conjunto de lecturas con el comando `make.contigs`, el cual extrae la secuencia y la calidad del Fastq, crea el complemento inverso de la lectura para después unir las en contigs, en este comando se eliminaron las bases con una calidad phred inferior a Q25, después se ejecutó el comando `screen.seqs` que eliminó las bases ambiguas y toda lectura mayor a 275 pb. Una vez hecho esto, se eliminan los duplicados de las secuencias con el comando `unique.seqs` para poder alinear las secuencias con la base de datos `silva.bacteria.fasta`. Posteriormente se pre agruparon las secuencias usando el comando `pre.cluster` permitiendo hasta 2 diferencias entre secuencia. Las secuencias quiméricas se eliminaron usando el algoritmo VSEARCH que se encuentra en Mothur usando el comando `chimera.vsearch`, para poder clasificarlas se usó el comando `classify.seqs` y se eliminó todo aquello que no fuera bacteriano utilizando el comando `remove.lineage`. Las secuencias se agruparon en OTUs con los comandos `dist.seqs` y `cluster`, además se agruparon las secuencias en filotipos de acuerdo a su clasificación taxonómica utilizando el comando `phylotype`.

6.6. Análisis estadísticos

Se realizaron pruebas de normalidad y homocedasticidad de los datos; en los casos en que se cumplieron ambos supuestos, los datos fueron analizados mediante ANDEVA, usando el programa Statistica (versión 7). Para detectar el tratamiento o los tratamientos que presentaron diferencias significativas, se aplicó una prueba de Tukey.

7. RESULTADOS

*7.1. Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas de hepatopáncreas y tracto digestivo de organismos silvestres de *Litopenaeus vannamei*.*

7.1.1. Aislamiento de las cepas

En total se procesaron 22 muestras de camarón silvestre, aislando en total 62 cepas bacterianas de tracto digestivo de camarón blanco, de las cuales 34 crecieron en agar soya triptocaseina (TSA) y 26 crecieron en agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS). Sin embargo, en este trabajo solo se utilizaron aquellas que crecieron en el medio de cultivo MRS, resultando todas Gram positivas. Debido a que la morfología de las cepas se repetía constantemente, se decidió trabajar solo con 8 cepas, descartando una o más cepas repetidas, basándonos en parámetros morfológicos (Tabla. I).

Tabla I. Morfología de las colonias aisladas de MRS provenientes del tracto digestivo de camarón silvestre. Donde 26 de las 27 tuvieron morfología de Bacilos.

Morfología	Medio de cultivo	Total
Bacilos	MRS	26
Cocos	MRS	1
<i>Total</i>		27

7.1.2. Prueba de hemólisis

Se probaron las 27 cepas en agar sangre para conocer la capacidad hemolítica de estas, se obtuvo que 19 cepas resultaron tener hemólisis tipo beta la cual se caracteriza por generar un halo transparente alrededor de las colonias y 8 cepas hemólisis tipo alfa según el halo de lisis (Anexo 2) observado a las 24 horas de incubación, por lo cual el resto del presente trabajo se realizó con las 8 cepas con actividad hemolítica tipo Alfa ya que esto indica una lisis parcial de eritrocitos.

7.1.3. Evaluación de producción de enzimas mediante la galería Api Zym (API®/ID32, Biomereux)

Al evaluar la producción de enzimas de las 8 cepas utilizadas, se detectó esterasa lipasa y α -galactosidasa en una mayor concentración en todas las cepas, además se pudo observar la presencia de lipasa, valina arilamidasa, cistina arilamidasa, fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa (Tab. II).

Tabla II. Producción de enzimas de las 8 cepas seleccionadas.

Enzima	Sustrato	L2a M	L3a M	L4a M	L5a M	L6a M	L9a m	L19c M	L21aM b
Esterasa lipasa (C8)	2-naftol caprilato	5	3	3	1	5	3	5	5
Lipasa (C14)	2-naftol miristato	1	1	0	1	1	1	1	1
Valina arilamidasa	L-valil-2-naftilamida	0	3	0	0	0	0	0	0
Cistina arilamidasa	L-cistil-2-naftilamida	0	1	0	0	0	0	0	0
Fosfatasa ácida	2-naftol fosfato	1	0	1	1	0	1	0	0
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	Naftol-AS-BI-fosfato	1	3	1	0	1	1	1	1
α -galactosidasa	6-Br-2-naftol- α D-galactopiranosida	5	4	3	3	3	5	3	5

7.1.4. Caracterización molecular de las cepas aisladas

7.1.4.1. Amplificación del fragmento del gen 16S ARNr mediante PCR

Se obtuvieron secuencias de las 27 cepas en ambas direcciones, de las cuales 8 (ambos componentes) resultaron tener un alto parecido entre la mayoría de las secuencias de calidad obtenidas, todas pertenecientes al género *Bacillus*, sin embargo, se dificulta la identificación a nivel especie ya que existe un alto grado de similitud entre las cepas de la misma especie a nivel del gen 16S. Mientras que con las cepas restantes se logró determinar su especie con un ID del 95 al 99% (Tabla. III).

Tabla III. Identificación molecular de las cepas aisladas del medio de cultivo MRS, resultados obtenidos de la secuenciación parcial del gen 16S.

Cepa	Clave	ID	%ID
1	L2aM	<i>Bacillus sp</i> DU117(2010)	99
2	L3aM	<i>Bacillus thuringensis</i> ILBB297	98
3	L4aM	<i>Bacillus sp</i> XG06290170	99
4	L5aM	<i>Bacillus sp</i> cp-h65	98
5	L6aM	<i>Bacillus sp</i> DU117(2010)	99
6	L7aM	<i>Lysinibacillus sp</i> E4	97
7	L9aM	<i>Bacillus sp</i> DU117(2010)	99
8	L12aM	<i>Macrococcus caseolyticus</i> GCF1S3	99
9	L12bM	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> BGSLP30	98
10	L12cM	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> BGSLP30	97
11	L14aM	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> BN4	98
12	L15aM	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> VN3-2	97
13	L15bM	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> CL11	96
14	L15cM	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> HS5-MRR	97
15	L16aM	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> BGSLP40	95
16	L17aM-a	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> CL11	99

17	<i>L17aM-b</i>	<i>Lysinibacillus fusiformis HS5-MRL</i>	97
18	<i>L17bM</i>	<i>Lysinibacillus fusiformis HS5-MRL</i>	97
19	<i>L18aM</i>	<i>Lysinibacillus sp BG2-11</i>	99
20	<i>L18bM</i>	<i>Lysinibacillus fusiformis BGSLP30</i>	99
21	<i>L19aM</i>	<i>Lysinibacillus sp SSK5D12</i>	98
22	<i>L19bM</i>	<i>Lysinibacillus fusiformis CL11</i>	99
23	<i>L19cM</i>	<i>Bacillus sp hb18</i>	97
24	<i>L20aM</i>	<i>Lysinibacillus sp SSK5D12</i>	95
25	<i>L21aM</i>	<i>Lysinibacillus fusiformis CL11</i>	98
26	<i>L21aM-b</i>	<i>Bacillus sp hb18</i>	98
27	<i>L22aM</i>	<i>Lysinibacillus sp BG2-11</i>	98

7.2. Generación del consorcio

7.2.1. Prueba de antagonismo

Ninguna de las 8 cepas empleadas en el presente estudio presentó efecto antagónico, lo cual permitió obtener una mezcla de las bacterias probióticas seleccionadas.

7.2.2. Curvas de crecimiento

Las curvas de crecimiento se realizaron con tres réplicas de cada cepa, el mix y el control en dos volúmenes diferentes 10 y 100 μL , ambos con concentraciones de 2×10^7 (Fig. 2 y 3), los resultados en ambas concentraciones reflejaron que las cepas se comportan de manera parecida en cuestión de horas, pero en densidades diferentes; además se puede observar que en ambos casos el mix tiene mayor densidad que las cepas por si solas.

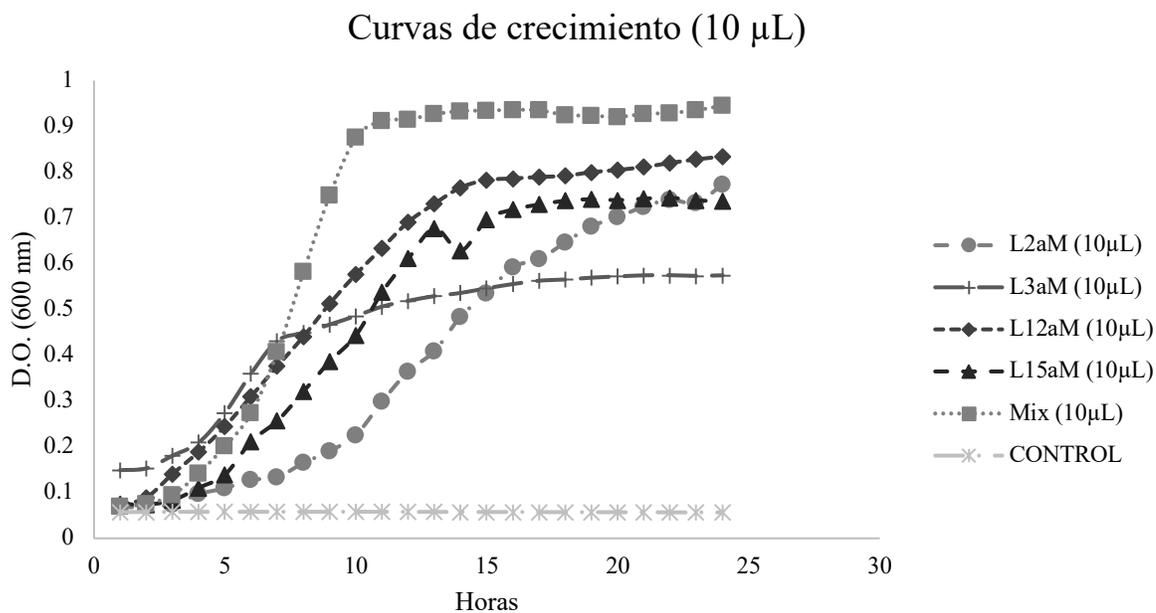


Figura 2. Curva de crecimiento de las cepas utilizadas en el consorcio, volumen de 10 μ L del inóculo a una D.O.600= 1.0, con una concentración inicial de 2×10^7 , n=3.

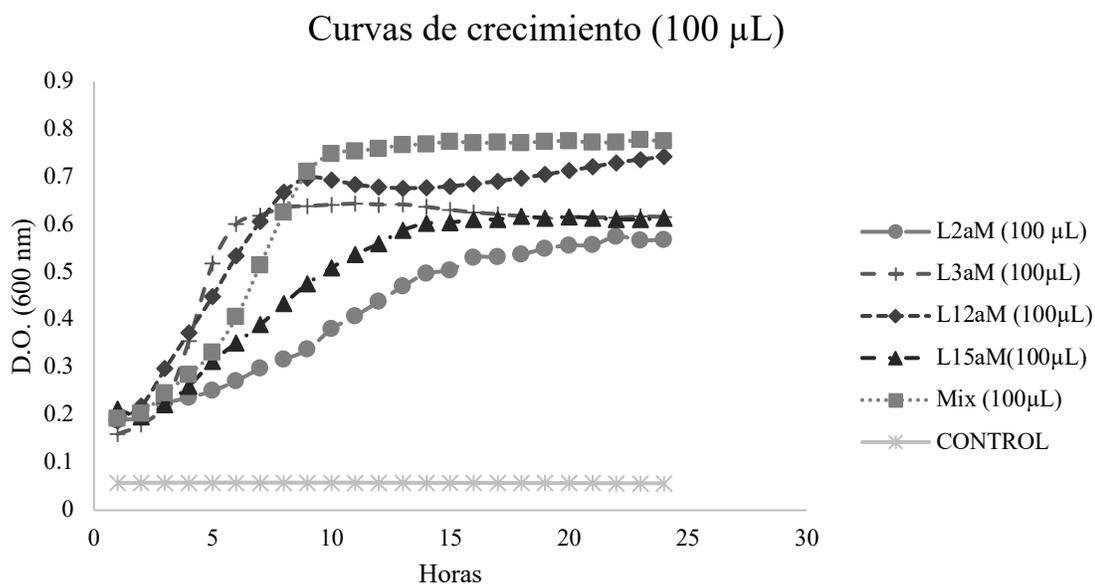


Figura 3. Curva de crecimiento de las cepas utilizadas en el consorcio, volumen de 100 μ L del inóculo a una D.O.600= 1.0, con una concentración inicial de 2×10^7 , n=3.

7.3. Composición

7.3.1. Química proximal

Al evaluar la composición del salvado se hizo un análisis de carbohidratos, proteínas, extracto etéreo y cenizas en los distintos tratamientos (Salvado solo, salvado pre tratado), se obtuvo una concentración de carbohidratos del 73.81 %, proteína 8.29 %, 1.03% de extracto etéreo y 14.04 % de cenizas, sin embargo al exponerlo a un tratamiento de predigestión con NaOH y calor, el porcentaje de carbohidratos y cenizas incrementa ligeramente a un 77.41 y 17.03 % respectivamente y el de proteína y extracto etéreo disminuye (Tabla. IV).

Tabla IV. Evaluación de la composición química proximal del salvado de arroz antes y después del tratamiento con NaOH.

Muestra	Carbohidratos (%)	Proteína (%)	Extracto etéreo (%)	Cenizas (%)
Salvado tratado con NaOH	77.41	4.21	0.22	17.03
Salvado	73.81	8.29	1.03	14.04

7.4. Evaluación del fermento del salvado producido por bacterias ácido lácticas como base para mejorar la calidad en un modelo acuícola

7.4.1. Zootecnia

En cuestión de ganancia de peso, en la figura 6 se puede observar que los tratamientos presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) mostrando que el tratamiento de salvado más probiótico comercial fue el más efectivo, seguido del salvado solo y luego el salvado más bacterias; además podemos observar que el salvado más bacterias no posee diferencias al control y al tratamiento de solo salvado; sin embargo, a pesar de que el probiótico comercial

en conjunto con el salvado promueve la ganancia de peso en los organismos, se observó que mientras duró el experimento, éstos no se alimentaban igual y además el amonio se incrementaba ligeramente más en este tratamiento (Fig. 4).

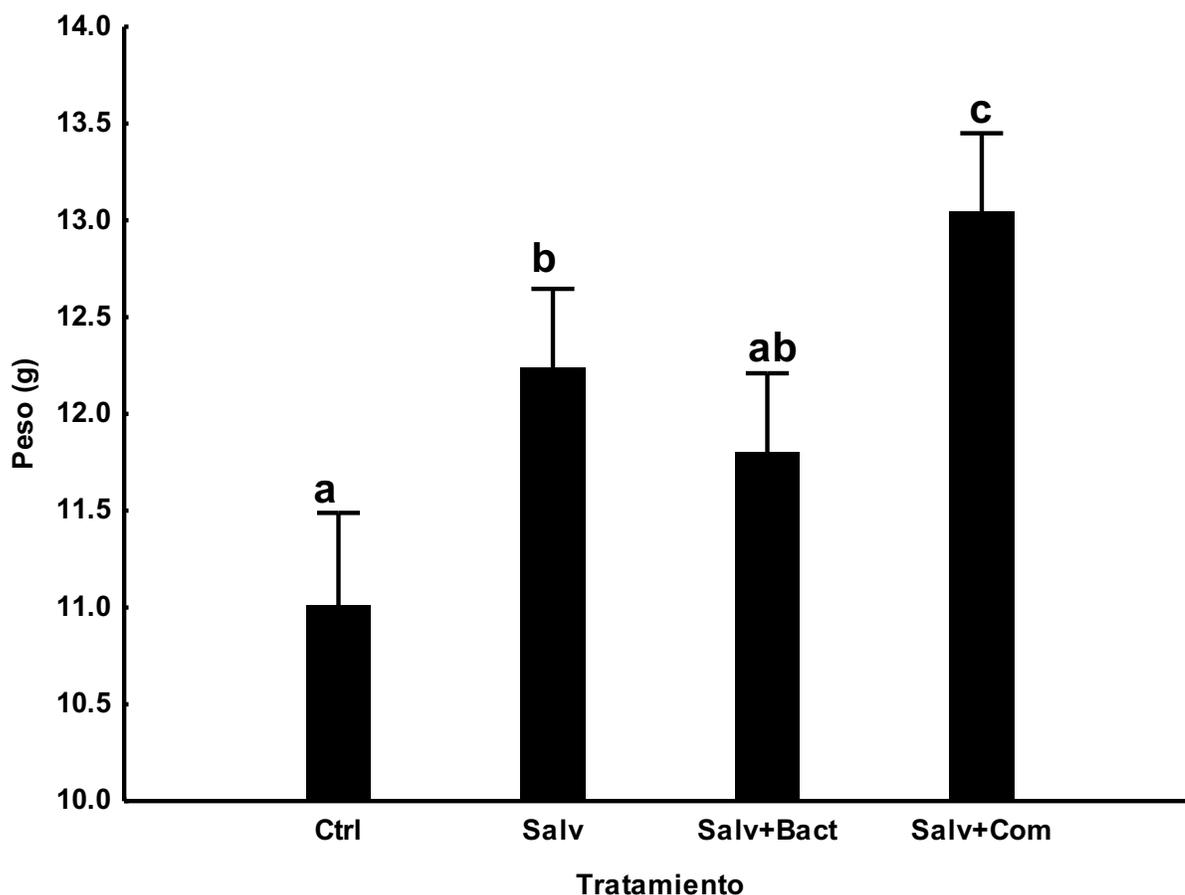


Figura 4. Gráfica de ganancia de peso entre tratamientos. Promedio de 4 réplicas por tratamiento, n=12.

7.4.2. Parámetros bioquímicos del agua

Se graficaron y analizaron los primeros 15 días del experimento debido a que son los días más importantes al realizar la siembra. No se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos, sin embargo, a partir de la segunda semana se puede observar una disminución en la concentración de amonio del tratamiento de salvado más bacterias, a

diferencia del tratamiento de salvado más probiótico comercial que se va incrementando a lo largo de la segunda semana del experimento (Fig. 5).

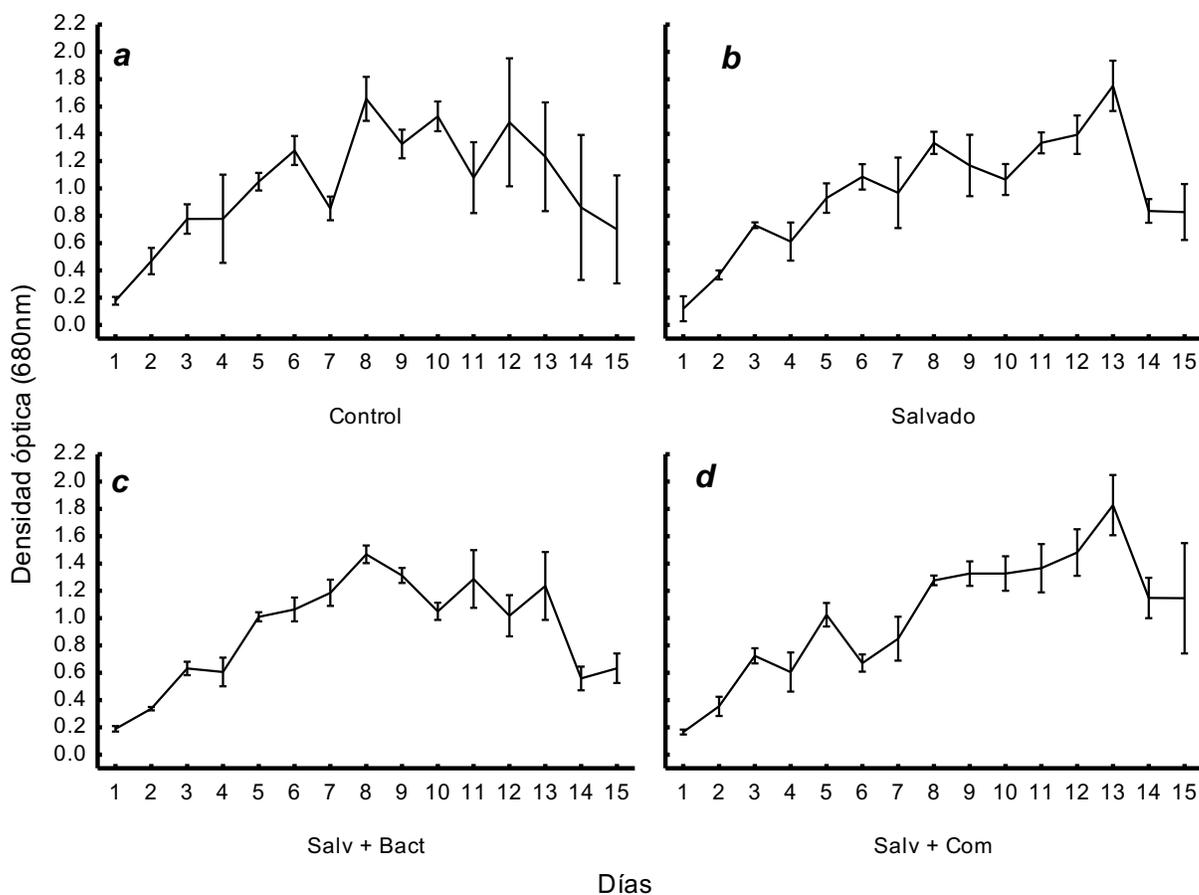


Figura 5. Contenido de amonio en el agua de cultivo a lo largo de 15 días del experimento, por método colorimétrico a una D.O. de 680 nm. (a) Tratamiento control, (b) Tratamiento con salvado, (c) Tratamiento salvado más consorcio de *Bacillus* y (d) Tratamiento con salvado más probiótico comercial.

7.4.3. Extracción de ADN de muestras de agua para secuenciación masiva del gen 16S

Se obtuvieron 22 muestras de agua para secuenciación, las cuales tuvieron buena concentración de ADN (Tabla. V) a excepción de las muestras IR1, IR2 e IR3, ya que éstas fueron las muestras iniciales de los tanques cuando el agua se encontraba limpia y filtrada. La calidad del ADN de las muestras estuvo dentro de los rangos solicitados por el proveedor de servicios para mandar a secuenciar.

Tabla V. Concentración y calidad de ADN de muestras de agua.

Muestra	Clave	Concentración ADN (ng/μl)	260/280
1	IR1	3.3	1.69
2	IR2	4.2	1.38
3	IR3	2.9	1.36
4	TCS1	10.6	1.66
5	TSS1	20.1	1.87
6	TCMS1	19.8	1.81
7	TNS1	16.5	1.69
8	TCS2	17.3	1.68
9	TSS2	29.5	1.7
10	TNS2	24.1	1.78
11	TCMS2	16.4	1.95
12	TCS3	10.4	1.85
13	TSS3	14.4	1.85
14	TCMS3	14.4	1.63
15	TNS3	15.9	1.9
16	TCS4	12.4	1.99
17	TSS4	14.4	1.93
18	TCMS4	15.8	1.75
19	TNS4	24.7	2
20	IR1 REP	2.9	2.67
21	IR2 REP	1.2	-5.89
22	IR3 REP	3.1	2.38

7.4.4. Extracción de ADN de muestras de tracto digestivo para secuenciación masiva del gen 16S

Se obtuvieron 13 muestras de agua para secuenciación, las cuales tuvieron buena concentración de ADN (Tabla VI). La calidad del ADN de las muestras resultó dentro de los rangos necesarios para mandar a secuenciar.

Tabla VI. Concentración y calidad de ADN de muestras de agua.

Muestra	Clave	Concentración ADN (ng/μl)	260/280
1	D1	113.6	1.9
2	TCR1	96.6	1.91
3	TCR2	160.1	1.89
4	TCR3	101	1.94
5	TSR1	184.7	1.92
6	TSR2	115	1.93
7	TSR3	150.3	1.97
8	TNR1	140.6	1.94
9	TNR2	210.8	1.91
10	TNR3	110.5	1.92
11	TCMR1	186.9	1.97
12	TCMR2	306.1	2
13	TCMR3	170.3	2

7.4.5. Histología

7.4.5.1. Área lipídica en hepatopáncreas

Al evaluar el área de vesículas lipídicas de las células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas de distintos organismos expuestos a los diferentes tratamientos, se observaron diferencias significativas ($P=0.00049$) en el área de cobertura lipídica, como se puede observar en la figura 6 y 7, el tratamiento con mayor condición nutricional en relación

a la cantidad de lípidos almacenados en hepatopáncreas fue el Salvado más bacterias (47,226.38 \pm 8,564.09), siendo éste el más alto a comparación del Control (25,658.42 \pm 3,879.91) y de la Muestra Inicial (19,266.56 \pm 4291.06), seguido del Salvado más probiótico comercial (30,714.29 \pm 3815.916) (Fig. 6 y 7).

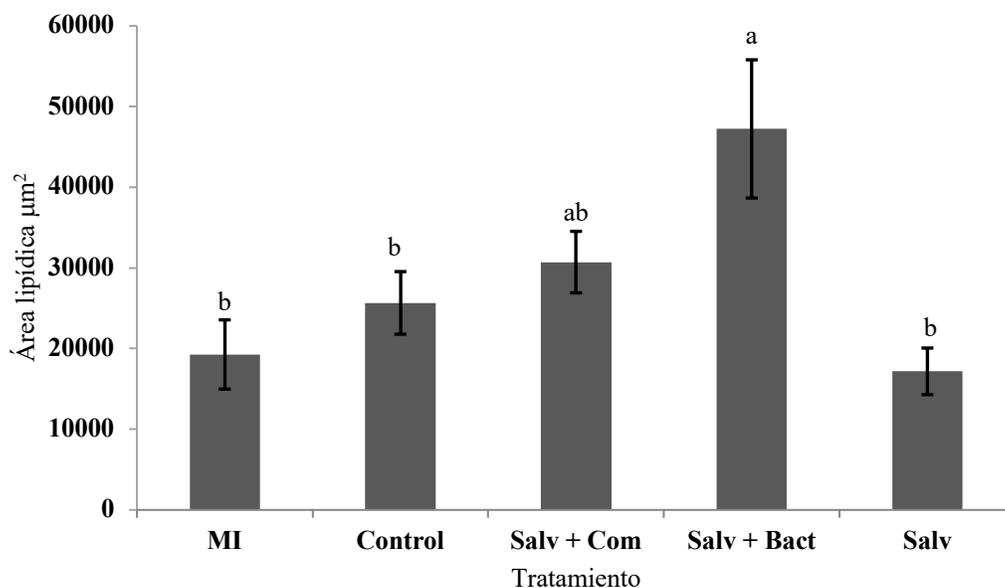


Figura 6. Área lipídica de células epiteliales de hepatopáncreas (media \pm error estándar) μm^2 , utilizando ANOVA de una vía donde la variable dependiente fue el área de cobertura lipídica y la variable categórica el tratamiento, n=10.

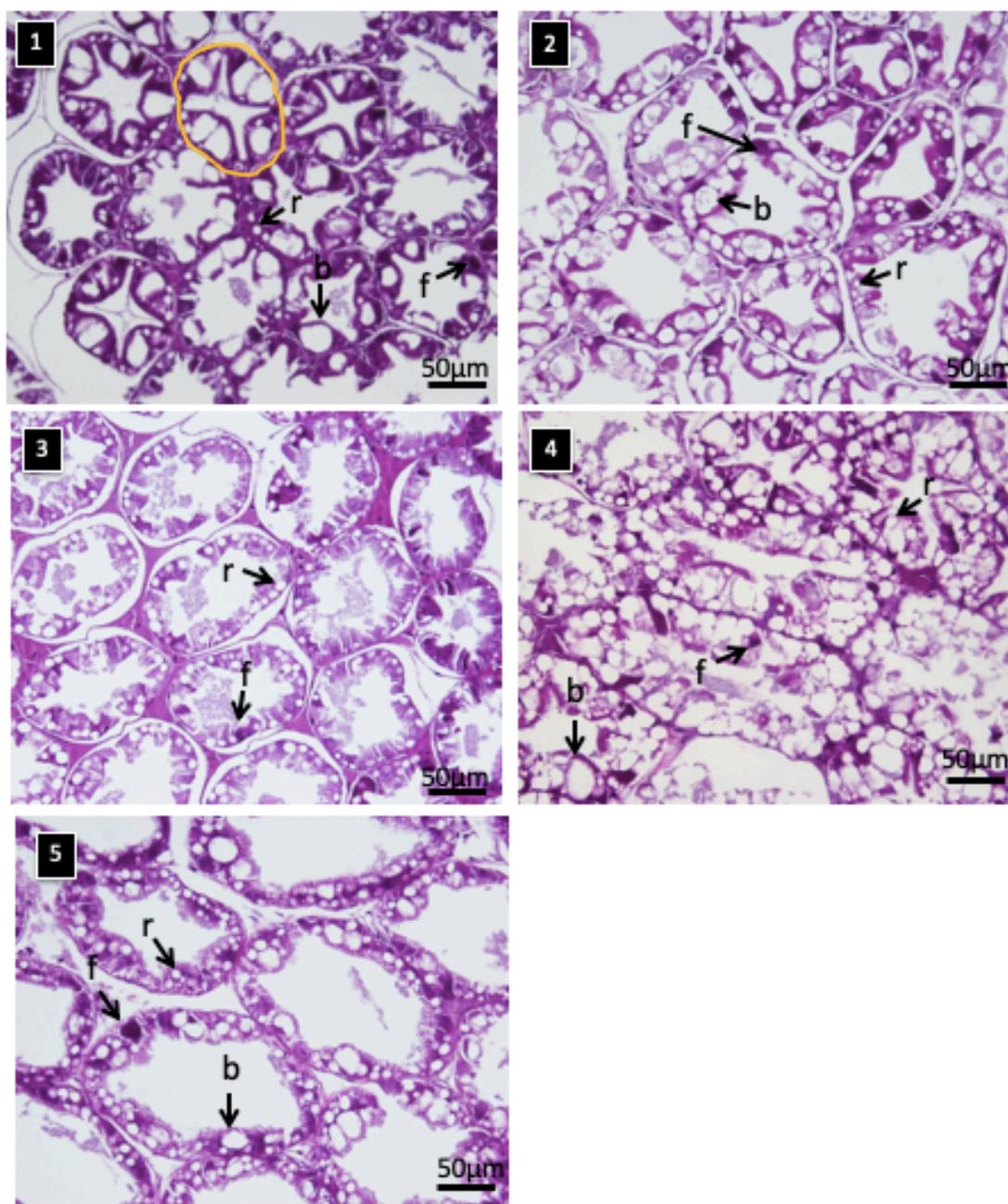


Figura 7. Células epiteliales de túbulos de hepatopáncreas. 1. Muestra inicial, 2. Control, 3. Salv + Comercial, 4. Salv + Bacterias y 5. Salvado. Señalando células HpB (b), HpF (f) y HpR (r).

7.4.5.2. Altura de branquias

Se realizó la evaluación de la altura de las branquias de distintos organismos al azar de cada uno de los tratamientos (Fig. 8), sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($P=0.45936$) entre el tamaño de las branquias expuestas a los diferentes tratamientos (Fig. 9).

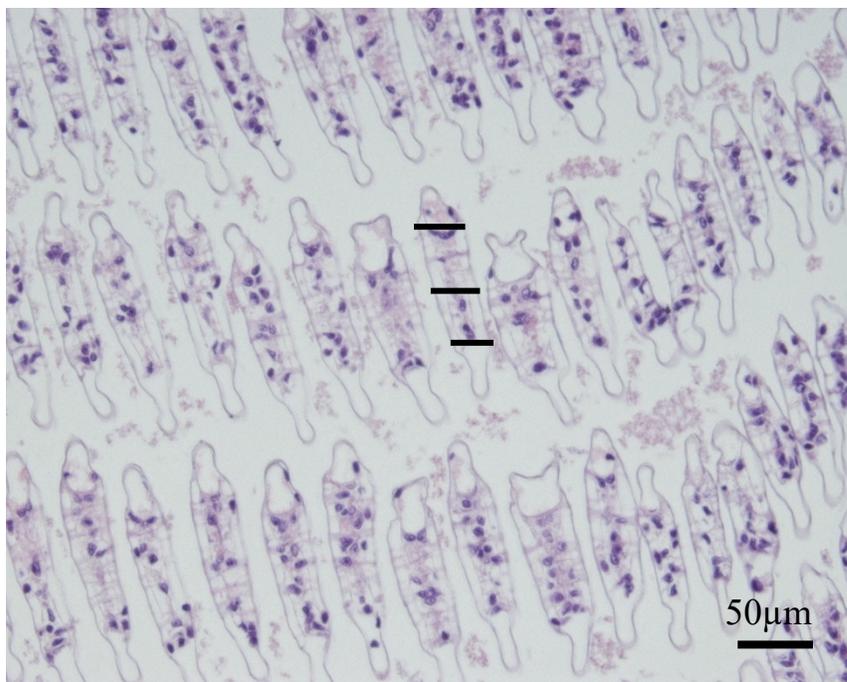


Figura 8. Filamento branquial de muestras obtenidas a partir de organismos tratados con salvado más bacterias. Se señalan las 3 mediciones hechas del ancho del filamento branquial.

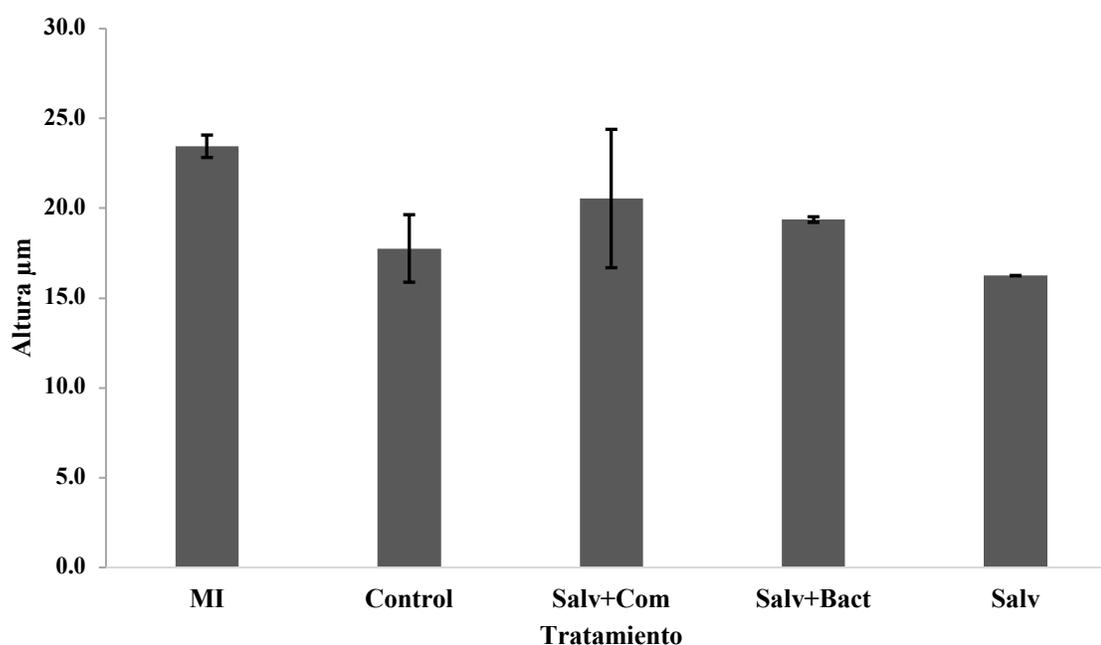


Figura 9. Altura branquial (media \pm error estándar), utilizando ANOVA de una vía donde la variable dependiente fue la altura de las branquias y la variable categórica el tratamiento, $n=10$.

7.5. Evaluación de las comunidades bacterianas

7.5.1. Diversidad y riqueza bacteriana en tracto digestivo

Se combinó el conjunto de lecturas de las secuencias de tracto digestivo para evaluar la calidad de los archivos Fastq y después combinarlas en contigs que nos permitieran calcular el número de grupos, una vez hecho esto, se eliminaron las secuencias con bases ambiguas y aquello que fuera mayor a 275 pb para tener un control de calidad y reducir el número de secuencias (1,224,105); posteriormente, se realizó el alineamiento de las secuencias y la preagrupación de éstas, donde al eliminar las secuencias quiméricas y todo aquello no bacteriano el número de secuencias finales fue de 892,805. El número de OTUs más alto se encontró en el tratamiento de salvado ($145,90 \pm 15,67$ OTU), seguido del salvado más bacterias ($143,17 \pm 16,89$ OTU) mientras que el más bajo fue el tratamiento de salvado más

probiótico comercial ($103,21 \pm 19,26$ OTU), comportándose de la misma manera en cuestión del índice de diversidad de Shannon ($3,74 \pm 0,18$ y $3,63 \pm 0,20$) y riqueza Chao1 ($346,52 \pm 35,92$ y $328,51 \pm 49,24$) respectivamente, siendo el salvado más probiótico comercial el de menor diversidad ($3,11 \pm 0,47$) y riqueza ($232,50 \pm 46,47$) incluso menor que el control (Tabla. VII).

Tabla VII. Índice de diversidad de Shannon y riqueza Chao1 en el tracto digestivo

Tratamiento*	No. de lecturas	OTUs totales	Índice de diversidad Shannon	Estimador de riqueza Chao1
Control	984	$132,70 \pm 3,51$	$3,65 \pm 0,17$	$318,57 \pm 28,63$
I	984	105,84	3,31	246,83
Salv + Bact	984	$143,17 \pm 16,89$	$3,63 \pm 0,20$	$328,51 \pm 49,24$
Salv + Com	984	$103,21 \pm 19,26$	$3,11 \pm 0,47$	$232,50 \pm 46,47$
Salvado	984	$145,90 \pm 15,67$	$3,74 \pm 0,18$	$346,52 \pm 35,92$

*Se realizaron tres réplicas por tratamiento, excepto D que corresponde a la muestra inicial.

7.5.2. Diversidad y riqueza bacteriana en agua de cultivo

Se combinó el conjunto de lecturas de las secuencias de tracto digestivo para evaluar la calidad de los archivos Fastq y después combinarlas en contigs que nos permitieran calcular el número de grupos, una vez hecho esto, se eliminaron las secuencias con bases ambiguas y aquello que fuera mayor a 275 pb para tener un control de calidad y reducir el número de secuencias (1,224,105); posteriormente, se realizó el alineamiento de las secuencias y la preagrupación de éstas, donde al eliminar las secuencias quiméricas y todo aquello no bacteriano el número de secuencias finales fue de 892,805. El número de OTUs más alto se encontró en el tratamiento control ($1453,5 \pm 188,08$ OTU), seguido del salvado más bacterias ($1434,5 \pm 312,13$ OTU) mientras que el más bajo fue el tratamiento de salvado más probiótico comercial ($1091,25 \pm 241,05$ OTU), en cuestión del índice de diversidad de Shannon, el tratamiento más alto fue el de Salvado más bacterias ($4,475 \pm 0,44$), seguido del control, siendo el Salvado más probiótico comercial el más bajo ($4,01 \pm 0,40$) de la misma manera

que riqueza Chao1 ($2739,25 \pm 784,32$), en este caso, el control siguió siendo el más alto ($3956,25 \pm 619,00$), seguido nuevamente del Salvado más bacterias ($3796,25 \pm 1092,57$). En todos los casos el tratamiento de Salvado más probiótico comercial, los valores se encontraron más bajos que el control y la muestra inicial (Tabla. VIII).

Tabla VII. Índice de diversidad de Shannon y riqueza Chao1 en el agua de cultivo.

Tratamiento*	No. de Lecturas	Total OTUS	Índice de diversidad de Shannon	Estimador riqueza Chao 1
Control	21699	$1453,5 \pm 188,08$	$4,33 \pm 0,49$	$3956,25 \pm 619,00$
I	21699	$1301,33 \pm 267,59$	$3,64 \pm 0,40$	$3931 \pm 778,94$
Salv + Bact	21699	$1434,5 \pm 312,13$	$4,475 \pm 0,44$	$3796,25 \pm 1092,57$
Salv + Com	21699	$1091,25 \pm 241,05$	$4,01 \pm 0,40$	$2739,25 \pm 784,32$
Salvado	21699	$1256,75 \pm 184,45$	$4,2075 \pm 0,17$	$3203,75 \pm 757,55$

* Se realizaron tres réplicas por tratamiento, I corresponde a la muestra Inicial.

7.5.3. Abundancia relativa de tracto digestivo

Los resultados de abundancia relativa en tracto digestivo arrojaron que las tres familias más representativas dentro de los cuatro tratamientos, fueron las Rhodobacteraceae, Vibrionaceae y Flavobacteriaceae, siendo la Rhodobacteraceae la más abundante, considerando que éstas se encuentran en las primeras etapas de la formación de biofilm, además esta familia la podemos encontrar dentro del filo de las proteobacterias (Fig. 10).

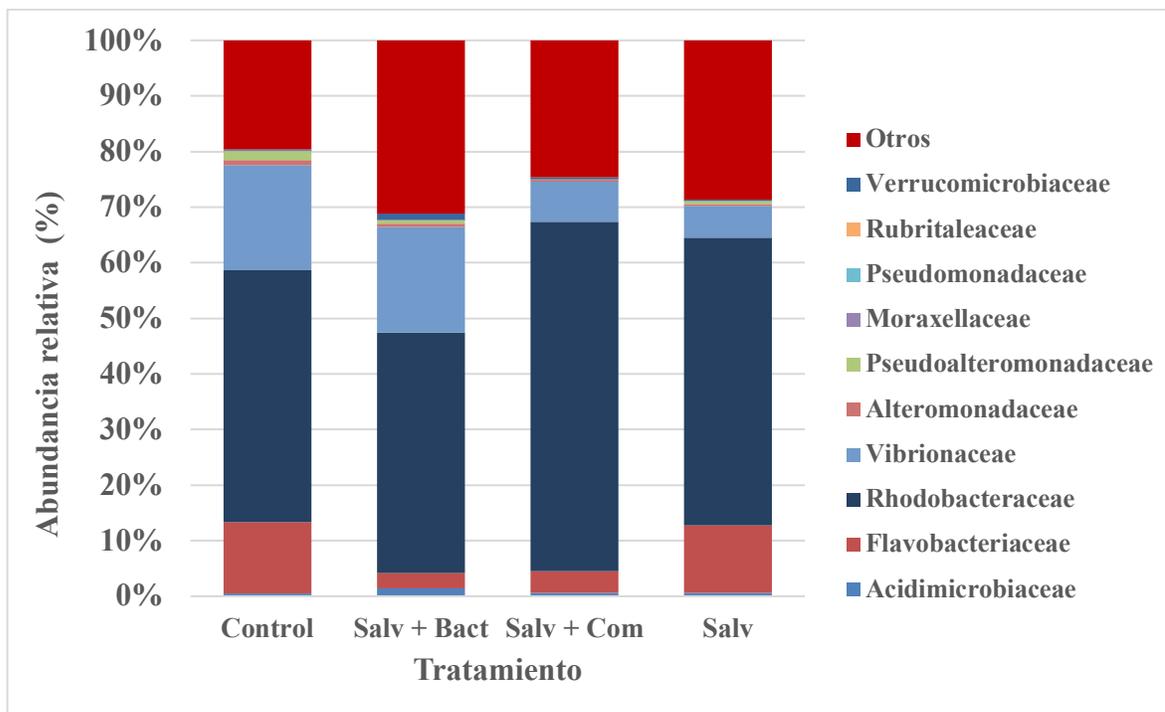


Figura 10. Abundancia relativa de grupos bacterianos del tracto digestivo de *Litopenaeus vannamei*.

7.5.4. Abundancia relativa en las muestras de agua

Se realizó el análisis bioinformático de las muestras de agua que se tomaron tanto del día uno como de los cuatro tratamientos durante el experimento (una por semana). En donde se pueden observar comportamientos distintos de las comunidades microbianas del inicio al final de los tratamientos.

Como se puede observar en la Figura 11, en la muestra inicial la clase predominante es la Gammaproteobacteria; sin embargo, al final del experimento podemos observar que en todos los tratamientos la clase que predominó fue la Alphaproteobacteria, siendo el tratamiento de salvado + comercial el más evidente. En el caso del tratamiento de Salvado podemos observar las Alphaproteobacteria son menos predominantes que en el resto y que existe una mayor proporción de bacterias no clasificadas que en el resto.

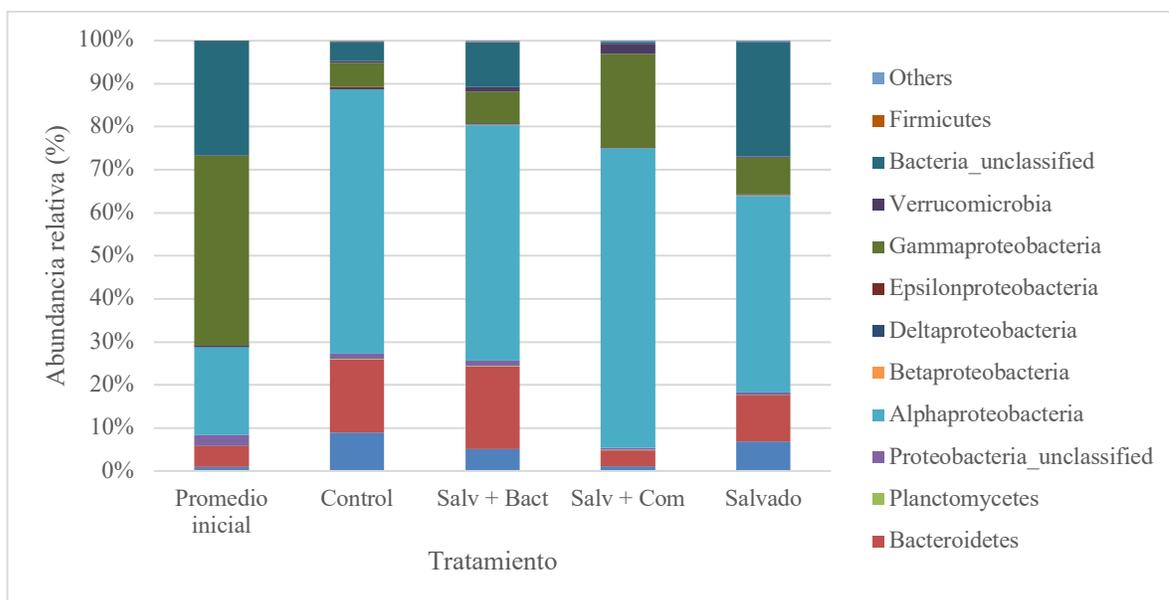


Figura 11. Abundancia relativa de la muestra inicial de agua comparada con las muestras finales de los diferentes tratamientos.

8. DISCUSIÓN

8.1. Aislamiento y caracterización de bacterias beneficiosas de la microbiota de camarón

El uso de bacterias potencialmente beneficiosas para mejorar la calidad del cultivo ha aumentado con el tiempo en la acuicultura y debido a que el rango de microorganismos usados es muy diverso (gram positivo y gram negativo) a diferencia de los utilizados en organismos terrestres (Newaj-Fyzul *et al.*, 2014), por ello es de suma importancia establecer criterios de selección y realizar la caracterización adecuada de las cepas aisladas, así como considerar que es necesario que cumplan con ciertas características, tales como exclusión competitiva, fuentes de nutrientes, influencia en la calidad del agua, efectos antivirales, antagonismo hacia bacterias patógenas, el método de adherencia o colonización, efecto inmunoestimulador (Gatesoupe, 1999, Balcázar *et al.*, 2006).

En el presente estudio se emplearon 27 cepas de 62 aisladas de hepatopáncreas y tracto digestivo de organismos silvestres de camarón blanco, esto debido a que se utilizaron aquellas que crecieron en MRS (suplementado al 2.5% NaCl) y resultaron gram positivas. Al ser evaluadas, mostraron actividad alfa hemolítica y reacciones enzimáticas (API) positivas para lipasa, valina arilamidasa, cistina arilamidasa, fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa, lo cual difiere con lo reportado por Kongnum y Hongpattarakere (2012), en cuanto a la suplementación de NaCl y enfocados a que las cepas tuvieran actividad antagónica contra patógenos del género *Vibrio*. Estos autores, aislaron 202 cepas de bacterias ácido lácticas de diferentes especies de camarón cultivado y silvestres (*Litopenaeus vannamei*, *Metapenaeus brevicornis* y *Penaeus merguensis*), seleccionando solo aquellas que crecieron en agar MRS (suplementado al 1.5 % NaCl), con actividad catalasa negativa y que tuvieran actividad antibacterial contra *Vibrio harveyi*, de las cuales solo trabajaron con 1 cepa identificada como *Lactobacillus plantarum* (MRO3.12), mientras que el presente estudio mediante la identificación por el gen 16S se identificaron las 27, de las cuales 19 fueron identificadas como *Lysinibacillus sp.* Sin embargo, *Lysinibacillus* es un género gram-positivo, aeróbicos o anaeróbicos facultativo, en forma de bastón que forma endoesporas y que por estas características inicialmente puede ser confundida con *Bacillus*, sin embargo, *Lysinibacillus* puede causar infecciones graves en humanos (Wenzler *et al.*, 2015), por lo

cual las cepas pertenecientes a este género no se utilizaron en los experimentos posteriores; y 8 fueron identificadas como *Bacillus spp.* las cuales han sido empleadas como probióticos (Gullian *et al.*, 2004), como lo reportan Nimrat *et al.*, (2012) que probaron dos mezclas de probióticos compuestos de *Bacillus* (Probiótico A y Probiótico B) y el modo de administración en larva y postlarva de camarón blanco, obteniendo diferencias significativas ($P < 0.05$) en el crecimiento de las postlarvas tratadas con el Probiótico B a diferencia del control, además los dos tratamientos aumentaron significativamente ($P < 0.05$) el número de bacterias heterótrofas totales, disminuyendo significativamente los niveles de pH, amoníaco y nitritos.

8.2. Generación del consorcio

La mayoría de las bacterias tienen la capacidad de producir compuestos antibacteriales tales como los ácidos orgánicos, que pueden inhibir el crecimiento o desplazar a otras bacterias lo cual puede contribuir al biocontrol de enfermedades causadas por otros patógenos. Esto no es la excepción en el caso de las bacterias aisladas de medios marinos (Gatesoupe, 1999). Las interacciones microbianas tienen un papel importante al momento de realizar un consorcio microbiano, ya que la línea entre el equilibrio microbiano y la competición potencialmente patógena es muy delgada, además, la composición de las comunidades microbianas del hospedero puede modificarse debido a las prácticas de cría y las condiciones ambientales (Balcázar *et al.*, 2006), por lo cual fue necesario evaluar la actividad antagónica entre las cepas de *Bacillus sp* utilizadas en el presente estudio, para comprobar si en algún punto del crecimiento tenían actividad antagónica entre ellas. Las cepas utilizadas en el presente estudio no presentaron inhibición entre ellas por lo cual fue posible la elaboración del consorcio, esto puede ser debido a que las cepas se aislaron del mismo medio, teniendo el mismo origen y haber sido expuestas a las mismas condiciones ambientales. Contrastando con los resultados de Lalloo (2010) quienes evaluaron el efecto inhibitorio de *Bacillus cereus* contra *Aeromonas hydrophila* obteniendo que la concentración de esta última disminuía un 70% debido a la exclusión competitiva por crecimiento y por la competición de nutrientes de *B. cereus*.

8.3. Fuentes de carbono

Debido al incremento en el desarrollo de la acuicultura en los últimos años, ha sido necesario implementar estrategias sustentables que permitan mantener la calidad de los cultivos intensivos. Una de las estrategias utilizadas recientemente ha sido la adición de fuentes de carbono para promover la conversión de los desechos nitrogenados en biomasa bacteriana que sirve como proteína derivada (Schneider *et al.*, 2006; Crab *et al.*, 2010; Xu y Pan., 2012; Xu *et al.*, 2012). Se sabe que las comunidades microbianas tienen efecto en la calidad del agua de cultivo, debido a que las bacterias heterotróficas tienen la capacidad de utilizar el amoníaco que se acumula en la columna de agua como fuente de nitrógeno descomponiéndolo en formas menos tóxicas y asimilables, sin embargo, es necesario el uso de una fuente de carbono para promover el crecimiento de estas comunidades (Avnimelech, 2009; Crab *et al.*, 2009).

La elección de la fuente de carbono es de suma importancia debido a que ésta puede influir la productividad de la biomasa bacteriana, el valor nutritivo y la calidad del agua (Romano *et al.*, 2018). El uso de fuentes de carbono simples tales como sacarosa, melaza y dextrosa se ha evaluado por diversos estudios, comprobando que son efectivas (Xu *et al.*, 2012; Xu y Pan, 2012, 2014); sin embargo se recomienda el uso de fuentes de carbono complejas derivadas de harina de plantas como salvado de arroz, almidón, tapioca y salvado de trigo (Megahed y Mohamed, 2014 ; Ekasari *et al.*, 2014 ; Serra *et al.*, 2015), debido a su bajo costo, además de ser una fuente adicional de proteínas que mejora la eficiencia nutricional del sistema de cultivo y genera un mejor rendimiento en el crecimiento del organismo cultivado (Asaduzzaman *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2017; Serra, 2015). Por lo anterior, en este trabajo se utilizó salvado de arroz, ya que al hacer una evaluación químico proximal para conocer la calidad del producto utilizado, obtuvimos que los valores de proteína y carbohidratos se encontraba en 73.81% y 8.29% respectivamente, contrastando con los resultados de Ifesan (2015) quienes al realizar la evaluación proximal del salvado de arroz obtuvieron 34.42% y 6.36% de carbohidratos y proteína respectivamente. Debido a que el salvado de arroz es una fuente de carbono efectiva pero compleja, se ha sugerido realizar un tratamiento previo mediante el uso de enzimas, microorganismos, fermentación y calor para incrementar la solubilidad del salvado en el agua y que los nutrientes tengan mejor

biodisponibilidad (Dauda *et al.*, 2017; Ekasari *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2016) por lo cual en el presente estudio se realizó la predigestión del salvado de arroz utilizando NaOH 1% junto con un tratamiento de calor para posteriormente inocularlo con un consorcio de *Bacillus* sp capaces de fermentar el salvado de arroz. Al realizar la evaluación proximal previa a la inoculación, el porcentaje de carbohidratos incrementó ligeramente a 77.41% y la proteína disminuyó 4.21%, a diferencia de Hernández *et al.*, (2014) quienes al realizar un tratamiento enzimático con α -amilasa y glucoamilasa, obtuvieron una disminución en la composición proximal del salvado de arroz, teniendo valores iniciales de 48.3% de carbohidratos y 13.4% de proteína, y después del tratamiento 40.6% y 2.7% respectivamente.

El consorcio de *Bacillus* sp. utilizado en este estudio, es una herramienta eficiente para la disminución de amonio en menos de 12 horas, según los requerimientos observados por Crab *et al.*, (2010). A diferencia del trabajo de Yang *et al.*, (2011) donde la densidad óptica inicial (DO) de la cepa, fue de 0.04 y desarrollando su crecimiento máximo, la máxima conversión de amonio a biomasa fue de 120 h, obteniendo una DO final de 0.16; en el presente estudio, la capacidad de asimilar amonio por parte de todas las cepas seleccionadas en un tiempo determinado fue de 12 horas, en las cuales, realiza una capacidad de asimilar amonio bastante aceptable con una $DO_{600=1}$ de cada una de los *Bacillus* sp. seleccionadas. La ausencia del proceso fermentativo resulta en un bajo crecimiento de *B. subtilis*, lo que concuerda con lo publicado por Espinosa de los Monteros Fernández (2005). De esto se deduce, que, a mayor disposición de azúcares reducibles disponibles, mayor será la tasa de crecimiento por parte del consorcio bacteriano seleccionado en el estudio.

Es evidente que no existe consumo de amonio por parte de Control (-), puesto que no existen microorganismos que realicen el consumo de amonio esperado (ambiente estéril), sin embargo y mediante el inóculo llevado a cabo con *Bacillus* spp. sí existe el consumo de amonio deseado, concordando con (Zokaeifar *et al.*, 2012) el cual menciona que se registró el mayor nivel de actividad enzimática digestiva total en dietas suplementadas con *B. subtilis* en camarones, obteniendo también los mejores rendimientos de crecimiento en comparación con el control.

8.4. Evaluación de fermentos por bacterias probióticas en un modelo acuícola.

En la actualidad, se sabe que a los azúcares no digeribles del tipo oligosacáridos aumentan el desarrollo de las bacterias beneficiosas en el huésped y se les considera un prebiótico, ya que los productos obtenidos de la fermentación pueden desempeñar un papel importante en la mejora de la salud del organismo cultivado (Roberfroid, 2005; Choque-Delgado *et al.*, 2011). Además de la mejora inmunoestimulante generada por el uso de fermentos, esta estrategia puede generar las condiciones estuarinas propicias para la proliferación de zooplancton en el sistema de cultivo que, en conjunto con la biomasa bacteriana, sirve como nutrición suplementaria para los organismos (Chakravarty, 2018). En este trabajo se suministraron cuatro tratamientos diferentes a lo largo de un mes para evaluar los efectos del fermento de salvado de arroz en el sistema de cultivo de camarón, al finalizar el experimento, se observó que el tratamiento más efectivo en cuestión de ganancia de peso fue el de salvado de arroz fermentado por probiótico comercial, seguido del tratamiento de salvado solo. Contrastando con los resultados de Romano *et al.*, (2018), quienes probaron tres diferentes tratamientos en el pez *Clarias gariepinus*, utilizando salvado de arroz crudo y salvado de arroz fermentado por *Bacillus* sp (con y sin aireación) durante 42 días, el tratamiento con mayor ganancia de peso fue el fermentado con *Bacillus* sin aireación. Debido a esto, se esperaba que en nuestro experimento el tratamiento más efectivo en cuestión de ganancia de peso fuera el salvado fermentado por el consorcio de *Bacillus*, sin embargo, a pesar de que ese no fue el resultado, observamos que la ganancia de peso fue ligeramente mayor a la del control.

En cuanto a la evaluación del amonio de los tratamientos con el de método de colorimetría basándonos en los parámetros medibles del Kit Ammonia NH₃/NH₄⁺ de Api®, el comportamiento de los tratamientos durante la primera semana fue similar debido al acondicionamiento del cultivo, sin embargo al finalizar la segunda semana se observó que el tratamiento con una mayor concentración de amonio (1.1 mg/L) fue el de salvado fermentado por el probiótico comercial, seguido de los tratamientos control y salvado (0.8 mg/L) y el tratamiento con la concentración más baja fue el de salvado fermentado por el consorcio de *Bacillus* (0.5 mg/L); tal es el caso de Romano *et al.*, (2018) quienes en la segunda semana del experimento obtuvieron un comportamiento similar en los tratamientos, debido a que los tratamientos con una concentración más alta de amonio fueron los de salvado de arroz crudo

(4 mg/L) y salvado de arroz fermentado por *Bacillus* con aireación (3.8 mg/L), siendo el salvado de arroz fermentado el más efectivo para la asimilación de amonio (2.5 mg/L).

8.5 Histología

El hepatopáncreas está constituido por una red de túbulos que se dividen en regiones proximal, media y distal; además está constituido por células HpB , HpE , HpF y HpR (en el caso de *Litopenaeus vannamei*) y sus principales funciones son la digestión del alimento, absorción de nutrientes, almacenamiento y digestión de productos principalmente en forma de glucógeno y la eliminación de residuos en forma de heces (Franceschini-Vicentini *et al.*, 2009), por lo cual, la evaluación de los efectos que tienen los tratamientos aplicados durante el experimento es de suma importancia.

La tinción de hematoxilina-eosina permitió identificar los diferentes tipos de células que se encontraban en el tejido epitelial del hepatopáncreas. Las células b (HpB) son las de mayor tamaño y las que tienen la función de almacenar glucógeno y lípidos (Silva *et al.*, 2018), por lo cual se evaluó el área de cobertura lipídica del hepatopáncreas utilizando estas células, obteniendo diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). El tratamiento con una mayor cobertura lipídica fue el de salvado fermentado por el consorcio de *Bacillus* ($47,226.38 \pm 8,564.095$), lo cual podría indicar que los tratamientos no tuvieron un efecto negativo en este órgano, así como una condición nutricional mejor a la del tratamiento de salvado fermentado por el probiótico comercial (30714.29 ± 3815.916). A diferencia del método de García-Bernal *et al.*, (2017) quienes probaron el efecto probiótico de *Streptomyces* spp. en camarón blanco infectado con *Vibrio parahaemolyticus*, ellos obtuvieron una mejor integridad del hepatopáncreas en aquellos organismos alimentados con el probiótico, por lo cual las cepas no se consideraron patógenas.

La respiración del camarón se lleva a cabo en los filamentos branquiales, ubicadas dentro de las cámaras branquiales localizadas en los laterales del cefalotórax; debido a que éstas son el órgano que se encuentra en mayor contacto con el agua para llevar a cabo el intercambio del dióxido de carbono de la hemolinfa por el oxígeno disuelto en el agua (Brock y Main, 1994), es necesario evaluar el efecto de los tratamientos aplicados al organismo. Se realizó la

medición de la altura de las células epiteliales de las branquias, pero no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos ($P>0.05$), lo que indica que las modificaciones efectuadas a las dietas, no influyen la funcionalidad a nivel branquial en ninguno de los tratamientos.

8.6. Evaluación de las comunidades bacterianas

La composición de las comunidades bacterianas en los estanques de cultivo tiene una alta influencia en la microbiota interna de los organismos cultivados, lo cual es fundamental para modular el sistema inmune y digestivo, absorción de nutrientes, regulación de procesos metabólicos y producción de vitaminas (Luo *et al.*, 2006; Bikel *et al.*, 2015). Es por lo anterior que es importante analizar la composición y los cambios de las comunidades microbianas tanto de la columna de agua como del tracto digestivo de los organismos; sin embargo, los métodos convencionales de cultivo que se han utilizado no son del todo confiables debido a que aproximadamente el 99% de las bacterias no son cultivables. Para resolver esta problemática, se han desarrollado tecnologías de nueva generación, tales como la secuenciación de gen 16S rRNA que nos permite conocer a detalle la composición de las comunidades bacterianas en los sistemas de cultivo.

En el presente estudio se realizó la secuenciación masiva del gen 16S rRNA para evaluar la diversidad, riqueza y abundancia relativa microbiana del agua de cultivo y tracto digestivo de los organismos cultivados, observando que en el agua de cultivo se encontraron Proteobacterias, Bacteroides y Alphaproteobacteria en todos los tratamientos, sin embargo en el caso de los tratamientos con salvado de arroz fermentado con probiótico comercial favoreció el crecimiento de Alphaproteobacteria en mayor proporción, esto en comparación con los otros dos tratamientos con el consorcio natural y sin probióticos. La mayoría de estos phyla y clase han sido reportados previamente como microbiota natural del agua de camarones o en los intestinos camarones peneidos (Tuyub *et al.*, 2014; Rungrassamme *et al.*, 2014; Vaz-Moreira *et al.*, 2011). Comparando las muestras de agua de salvado natural, con probiótico comercial y sin probióticos, encontramos en todos los tratamientos Betaprotobacteria, Alphaproteobacteria y Gammaproteobacteria. Xion *et al.*, (2015);

demonstraron que las Betaproteobacteria abundan en el cultivo saludable de camarones. De hecho, se informó que las Betaproteobacteria tienen una capacidad especializada para degradar la materia orgánica compleja y los biopolímeros como la celulosa, lo que implica que los miembros de este taxón bacteriano podrían tener un efecto positivo en la calidad de agua

Con respecto a Alphaproteobacteria. Estas bacterias podrían competir con los camarones por nutrientes, pero sus enzimas también podrían ayudar a los camarones en la digestión de sustratos complejos (Wainwright y Mann, 1982), así como en la alimentación directa de camarones (Moss, 2001). Además, su degradación de la membrana peritrófica podría desintegrar las heces, mejorando en este aspecto la calidad del agua.

En el caso de los estudios sobre los efectos en la microbiota de camarón, observamos que la administración de salvado de arroz con probiótico comercial, probiótico natural y sin probióticos modificó la composición de la comunidad bacteriana, dando como resultado distintas comunidades dentro de la microbiota asociadas con los camarones; obteniendo que el tratamiento con mayor diversidad bacteriana en tracto digestivo fue el de salvado y la menor en el tratamiento de salvado fermentado por el probiótico comercial. Las tres familias más representativas fueron las *Rhodobacteraceae* (Proteobacteria), *Vibrionaceae* (Proteobacteria) y *Flavobacteriaceae* (Bacteroidetes). Si bien las comunidades bacterianas dentro del ecosistema gastrointestinal del camarón estaban dominadas por las familias pertenecientes al phylum Proteobacterias, particularmente representadas por miembros que pertenecen a la clase Alphaproteobacteria, se observaron diferencias a nivel de OTU (definidas en un 97% de similitud), excepto para muestras de camarones tratados con salvado de arroz sin probióticos. Estas observaciones se validaron aún más mediante pruebas de AMOVA, cuyos resultados revelaron marcadas diferencias entre esas muestras de salvado con y sin probióticos. Se han descrito previamente resultados similares, en los cuales la administración de probióticos modificó sustancialmente la composición de la comunidad bacteriana dentro del ecosistema gastrointestinal de las especies acuáticas (Hostins et al., 2017; Zokaifar et al., 2014). Estas diferencias en la composición de la comunidad bacteriana pueden estar directamente relacionadas con las propiedades antibacterianas de los fermentos

con bacterias probióticas. El consorcio probiótico utilizado en este estudio estaba compuesto principalmente por *Bacillus* sp, que producen una variedad de productos metabólicos que pueden interferir con el crecimiento de otros microorganismos (Vandenbergh, 1993). Nuestro estudio también demostró que una relación fuente de carbono bacteria debe definirse cuidadosamente para evitar una sobredosis con costos innecesarios.

9. CONCLUSIONES

1. Se estudiaron 27 cepas de 62 aisladas de hepatopáncreas y tracto digestivo de organismos silvestres de camarón blanco; de las cuales, sólo se trabajó con 8 cepas (bacilos), debido a sus características.

2. A pesar del aumento de peso con salvado adicionado con probiótico comercial, éste no es el más efectivo puesto que induce el acumulamiento de amonio, con respecto a los otros tratamientos.

3. El tratamiento con mayor condición nutricional en relación a la cantidad de lípidos almacenados en hepatopáncreas fue el Salvado más el consorcio de bacterias del género *Bacillus*, observado por histología.

4. Por la secuenciación masiva se mostró que el tratamiento con mayor diversidad y riqueza fue el del salvado fermentado por el consorcio de bacterias del género *Bacillus*.

10. RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar investigando el uso de diferentes enzimas digestivas, así como cepas probióticas con la finalidad de seguir optimizando el proceso enzimático y fermentativo del salvado de arroz.

Evaluar la aplicación de una concentración mínima de nitrógeno durante la fermentación para tener una mayor bioaugmentación del consorcio probiótico con la finalidad de una dominación más rápida del consorcio en condiciones de producción.

Evaluar diferentes microorganismos probióticos, con la finalidad de ser aplicado el proceso fermentativo a temperaturas óptimas para peces y moluscos.

Evaluar la medición de fósforo y la demanda de oxígeno, ya que son importantes para poder tener más claros los resultados y entender el comportamiento de las comunidades bacterianas y de las concentraciones de N.

11. LITERATURA CITADA

- Asaduzzaman, M., M. M. Rahman, M. E. Azim, M. A. Islam, M. A. Wahab, M. C. J. Verdegem, J. A. J. Verreth. 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. 1999. C / N ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*. 176:227-235.
- Avnimelech, Y. 2009. *Biofloc technology: a practical guide book*. J World Aquacult Soc.
- Azim, M. E., D.C. Little, J.E. Bron. 2008. Microbial protein production in activated suspension tanks manipulating C:N ratio in feed and the implications for fish culture. *Bioresource Technol*. 99:3590-3599.
- Balcázar, J. L., I. De Blas, I. Ruiz-Zarzuola, D. Cunningham, D. Vendrell, J. L. Muzquiz, J. L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Vet microbiol*. 114(3-4):173-186.
- Bell, T.A., D.V. Lightner. 1988. A Handbook of Normal Penaid Shrimp Histology. *J World Aquacult Soc*. 114.
- Benítez J., Y. Chen, T.S.H. Teo, A. Ajamieh. 2018. Evolution of the impact of e business technology on operational competence and firm profitability: a panel data investigation. *Inf Manag*. 55:120-130.
- Bianciotto, V., C. Bandi, D. Minerdi, M. Sironi, H.V. Tichy, P. Bonfante. 1996. An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 62:3005–3010.
- Bikel, S., A. Valdez-Lara, F. Cornejo-Granados, K. Rico, S. Canizales-Quinteros, X. Soberon, A. Ochoa-Leyva. 2015. Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: towards a systems-level understanding of human microbiome. *Comput struct biotec*. 13:390-401.
- Boyd, C.E., L. Massaut. 1999. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquac. Eng*. 20:113–132.
- Brock, J.A., K. L. Main. 1994. A guide to common problems and diseases important to shrimp farms in the Americas. *World J Microb Biot*. 13:415-418.
- Caffrey, J., N. Bano, K. Kalanetra, J. Hollibaugh. 2007. Ammonia oxidation and ammonia-oxidizing bacteria and archaea from estuaries with differing histories of hypoxia. *ISME J*. (1):660-662.

- Caipang, C. M., M. P. N. Aguana. 2011. Conventional PCR assays for the detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shrimp aquaculture in the Philippines. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*. 4(3):339-350.
- Carroza, C., F. Hurtado, X. Gutierrez. 2012. Nitrogenated compounds' biofiltration under alternative bacterium fixation substrates. *Lat Am J Aquat Res*. 40(3):772-785.
- Chakravarty, S., S. Kumar, S. Prakash. 2018. Back to the Basics: Biomimicry in Shrimp Farming. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 7(5):2172-2184.
- Choque-Delgado, G. T., W. M. S. C. Tamashiro, M. R. Marostica Jr, Y. M. F. Moreno, G. M. Pastore. 2011. The putative effects of prebiotics as immunomodulatory agents. *Food Res Int*. 44:3167-3173.
- Cowan, S. T., K. J. Steel. 1993. Identification of Medical Bacteria. 3rd edn Cambridge.
- Crab, R., A. Lambert, T. Defoirdt, P. Bossier, W. Verstraete. 2010. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. *J appl microbiol*. 109(5):1643-1649.
- Crab, R., M. Kochva, W. Verstraete, Y. Avnimelech. 2009. Bio-flocs technology application in over-wintering of tilapia. *Aquacult Eng*. 40(3):105-112.
- Crab, R., T. Defoirdt, P. Bossier, W. Verstraete. 2012. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*. 356–357, 351–356.
- Dalmin, G., K. Kathiresan, A. Purushothaman. 2002. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian J Exp Biol*. 39: 939-942.
- Dauda, A., N. Romano, M. Ebrahimi, M. Karim, I. Natrah, M. Kamarudin, J. Ekasari. 2017. Different carbon sources affects biofloc volume, water quality and the survival and physiology of African catfish *Clarias gariepinus* fingerlings reared in an intensive biofloc technology system. *Fisheries Sci*. 83(6):1037-1048.
- Dittmann, K., B. Rasmussen, M. Castex, L. Gram, M. Bentzon-Tilia. 2017. The aquaculture microbiome at the centre of business creation. *Microb Biotechnol*. 101(6):1279–1282.
- Dopazo, C., M. Lemos, C. Lodeiros, J. Bolinches, J. Barja, A. Toranzo. 1988. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *J Appl Bacter*. 65:97-101.
- Ekasari, J., M. H. Azhar, E. H. Surawidjaja, S. Nuryati, P. DeSchryver, P. Bossier. 2014. Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. *Fish Shellfish Immun*. 41, 332–339.

Franceschini-Vicentini, I. B., K. Ribeiro, L. P. Papa, J. Marques Junior, C. A. Vicentini, P. M. C. M. Valenti. 2009. Histoarquitectura del Hepatopáncreas del Camarón de la Amazonia *Macrobrachium amazonicum*. *Int J Morphol*. 27(1):121-128.

Frías-Espericueta, M. G., F. Páez-Osuna. 2001. Toxicidad de los compuestos del nitrógeno en camarones. *Camaronicultura y medio ambiente*. 224 - 242.

Gaona, C.A.P., L. H. Poersch, D. Krummenauer, G. K. Foes, W. J. Wasielesky. 2011. The effect of solids removal on water quality, growth and survival of *Litopenaeus vannamei* in a bio flocculation technology culture system. *Inter. Journ of recircul aquac*. 12:54-73.

García-Bernal, M., R. Medina-Marrero, C. Rodríguez-Jaramillo, O. Marrero-Chang, Á. I. Campa-Córdova, R. Medina-García, J. M. Mazón-Suástegui. 2018. Probiotic effect of *Streptomyces spp.* on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquacult nutr*. 24(2):865-871.

Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*. 180:147-165.

Gomaa, E. Z. 2013. Some applications of amylase produced by *Bacillus subtilis* NCTC-10400 and *Bacillus cereus* ATCC 14579 under solid state fermentation. *Afr J Microbiol Res*. 7(29):3720-3729.

Gullian, M., F. Thompson, J. Rodriguez. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 233(1-4):1-14.

Hargreaves, J. A. 2006. Photosynthetic suspended-growth system in aquaculture. *Aquacult Eng*. 34:344-363.

Hernandez, N., M. E. Rodriguez-Alegria, F. Gonzalez, A. Lopez-Munguia. 2000. Enzymatic treatment of rice bran to improve processing. *J Am Oil Chem Soc*. 77(2):177-180.

Hostins Bm Lara G., O. Decamp, D. E. Cesar. W. Wasielesky. 2017. Efficacy and variations in bacterial density in the gut of *Litopenaeus vannamei* reared in a BFT system and in clear water supplemented with a commercial probiotic mixture. *Aquaculture*. 480:58–64.

Huang, F., L. Pan, L. Na, X. Tang. 2017. Characterization of novel *Bacillus* strain N31 from mariculture water capable of halophilic heterotrophic nitrification aerobic denitrification. *J Biosci Bioeng*. 20(20):1-8.

Huses, S. M., L. Dethlefsen, J. A. Huber, D. M. Welch, D. A. Relman, M. L. Sogin. 2008. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS Genet*. 4(11):100255.

- Ifesan, B. O. T., B. T. Ifesan, A. K. Orogbangba. 2015. Physicochemical properties of fermented and non-fermented rice bran flour and its utilization in bread making.
- Irianto A, P. A. Robertson, B. Austin. 2003. Oral administration of formalin-inactivated cells of *Aeromonas hydrophila* A3–51 controls infection by atypical *A. salmonicida* in goldfish, *Carassius auratus* (L.). J Fish Dis. 26:117-120.
- Irianto, A., B. Austin. 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis. 25:333-342.
- Karunasagar, I., M. M. Shivu, S. K. Girisha. 2007. Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. Aquaculture. 268(1-4):288–292.
- Kaur, H., M. Arora, S. Bhatia, M. S. Alam. 2016. Solid State Fermentation of Deoiled Rice Bran for Production of fungal enzymes-A Review. Intl J Appl Pure Sci Agric. 2(2):143-159.
- Khanjani, M. H., M. M. Sajjadi, M. Alizadeh, I. Sourinejad. 2017. Nursery performance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) cultivated in a biofloc system: The effect of adding different carbon sources. Aquac Res. 48:1491-1501.
- Kongnum, K., T. Hongpattarakere. 2012. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. Fish shellfish immun. 32(1):170-177.
- Kowalchuk, G., J. Stephen. 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. Annu Rev Microbiol. (55):485-529.
- Kumar, R., S. Mukherjee, K. P. Prasad, A. K. Pal. 2006. Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.). Aquac Res. 37:1215–1221.
- Kumar, S., P. Anand, D. De, A. Deo, T. Ghoshal, J. Sundaray, N. Lalitha. 2017. Effects of biofloc under different carbon sources and protein levels on water quality, growth performance and immune responses in black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius, 1978). Aquac Res. 48(3):1168-1182.
- Laloo, R., G. Moonsamy, S. Ramchuran, J. Görgens, N. Gardiner. 2010. Competitive exclusion as a mode of action of a novel *Bacillus cereus* aquaculture biological agent. Lett Appl Microbiol. 50(6):563-570.
- Luis-Villasenor, I. E., T. Castellanos-Cervantes, B. Gomez-Gil, Á. E. Carrillo-García, A. I. Campa-Córdova, F. Ascencio. 2013. Probiotics in the intestinal tract of juvenile whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*: modulation of the bacterial community. World J Microb Biot. 29(2):257-265.

- Luo, Y., D. Hui, D. Zhang. 2006. Elevated CO₂ stimulates net accumulations of carbon and nitrogen in land ecosystems: a meta-analysis. *Ecology*. 87:53-63.
- Megahed, M. E., K. Mohamed. 2014. Sustainable growth of shrimp aquaculture through biofloc production as alternative to fishmeal in shrimp feeds. *J Agr Sci*. 6(6):176.
- Melgar Valdes, C. E., E. Barba Macías, C. A. Álvarez-González, C. Tovilla Hernández, A. J. Sánchez. 2013. Microorganisms effect with probiotic potential in water quality and growth of the shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae) in intensive culture. *Rev Biol Trop*. 61(3):1215-1228.
- Moriarty, D. J. 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture*. 151(1-4):333-349.
- Moss S, S. Divakaran, B. Kim. 2001. Stimulating effects of the pond water on digestive enzyme activity on the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquac Res*. 32:125–131.
- Newaj-Fyzul, A., A. H. Al-Harbi, B. Austin. 2014. Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture*. 431:1-11.
- Nimrat, S., S. Suksawa, T. Boonthai, V. Vuthiphandchai. 2012. Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Vet Microbiol*. 159(3-4):443-450.
- Oliveira, M., V. Feddern, L. Kupski, E. P. Cicolatti, E. Badiale-Furlong, L. A. de Souza-Soares. 2011. Changes in lipid, fatty acids and phospholipids composition of whole rice bran after solid-state fungal fermentation. *Bioresource Technol*. 102(17):8335-8338.
- Prosser, J. 1989. Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv Microb Physiol*. (30):125-181.
- Ranjan, A., N. P. Sahu, A. D. Deo, S. Kumar, K. K. Jain. 2018. Comparative evaluation of fermented and non-fermented de-oiled rice bran with or without exogenous enzymes supplementation in the diet of *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *Fish Physiol Biochem*. 44(4):1037-1049.
- Ray L. A., R. Miranda, J. W. Jr, Tidey, J. E. McGeary, J. MacKillop, C. J. Gwaltney, D. J. Rohsenow, R. M. Swift, P. M. Monti. 2010. Polymorphisms of the μ -opioid receptor and dopamine D4 receptor genes and subjective responses to alcohol in the natural environment. *J Abn Psy*. 119:115-125.
- Roberfroid M. B. 2005. Introducing inulin-type fructans. *Brit J Nutr*. 93(1):13-25.
- Roe, J. H., J. M. Barley, R. R. Gray, J. N. Robinson. 1961. *J Biol Chem*. 236:1244-1253.

Rogers, G. L., S. L. Klemetson. 1985. Ammonia removal in selected aquaculture water reuse biofilters. *Aquacult Eng.* 4(2):135-154.

Romano, N., A. B. Dauda, N. Ikhsan, M. Karim, M. S. Kamarudin. 2018. Fermenting rice bran as a carbon source for biofloc technology improved the water quality, growth, feeding efficiencies, and biochemical composition of African catfish *Clarias gariepinus* juveniles. *Aquac Res.* 00:1–11.

Romano, N., C. Zeng. 2017. Cannibalism of decapod crustaceans and implications for their aquaculture: a review of its prevalence, influencing factors, and mitigating methods. *Rev Fish Sci Aquac.* 25(1):42-69.

Rungrassamee W, A. Klanchui, S. Maibunkaew, S. Chaiyapechara, P. Jiravanichpaisal, N. Karoonuthaisiri. 2014. Characterization of intestinal bacteria in wild and domesticated adult black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *PLOS ONE.* 9(3):91853.

Schloss, P. D., S. L. Westcott, T. Ryabin, J. R. Hall, M. Hartmann, E. B. Hollister, J. W. Sahl. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 75(23):7537-7541.

Schneider, O., V. Sereti, E. H. Eding, J. A. Verreth. 2006. Molasses as C source for heterotrophic bacteria production on solid fish waste. *Aquaculture.* 261(4):1239-1248.

Schweitzer, R., R. Arantes, P. F. S. Costódio, C. M. do Espírito Santo, L. V. Arana, W. Q. Seiffert, E. R. Andreatta. 2013. Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. *Aquacult Eng.* 56:59-70.

Serra, F. P., C. A. Gaona, P. S. Furtado, L. H. Poersch, W. Wasielesky. 2015. Use of different carbon sources for the biofloc system adopted during the nursery and grow-out culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult Int.* 23(6):1325-1339.

Shan, H., J. Obbard. 2001. Ammonia removal from prawn aquaculture water using immobilized nitrifying bacteria. *Appl Microbiol Biot.* 57(5-6):791-798.

Shih, I. L., P. J. Wu, C. J. Shieh. 2005. Microbial production of a poly (g-glutamic acid) derivative by *Bacillus subtilis*. *Process Biochem.* (40):2827-2832.

Sugita H, K. Shibuya, H. Shimooka, Y. Deguchi. 1996. Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish. *Aquaculture.* 145:195-203.

Supriyati, T. H., T. Susanti, I. W. R. Susana. 2015. Nutritional value of rice bran fermented by *Bacillus amyloliquefaciens* and humic substances and its utilization as a feed ingredient for broiler chickens. *Asian Austral J Anim.* 28(2):231.

- Thompson, F. L., P. C. Abreu, W. Wasielesky. 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture*. 203(3-4):263-278.
- Timmons, M., J. Ebeling. 2007. *Recirculating aquaculture* (2nd. ed.). U.S.: Northeastern Regional Aquaculture Center.
- Tomasso, J. R. 1994. Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. *Rev Fish Sci*. 2(4):291-314.
- Tuyub Tzuc J, D. Rendíz Escalante, R. Rafael, G. Gaxiola, L. Arena. 2014. Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *SpringerPlus*. 3(1):280-290.
- Vandenbergh P.A. 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol Rev*. 12:221-237.
- Vaz-Moreira, I., V. Figueira, A. R. Lopes, E. De Brandt, P. Vandamme, O. C. Nunes, C. M. Manaia. 2011. *Candidimonas nitroreducens* gen. nov., sp. nov. and *Candidimonas humi* sp. nov., isolated from sewage sludge compost. *Int J Syst Evol Microbiol*. 61:2238-2246.
- Verschuere, L., G. Rombaur, P. Soogerloos., W. Verstrate. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev*. 4(64):655-671.
- Waikhom, S., S. Aanand, C. Rajeswari, P. Padmavathy, R. George. 2018. Ammonia and nitrite toxicity to pacific white-leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *IJAR*. 4(7):182-189.
- Wainwright, P. F., K. H. Mann. 1982. Effect of antimicrobial substances on the ability of the mysid shrimp *Mysis stenolepis* to digest cellulose. *Mar Ecol Prog Ser*. 7:309-313.
- Wang, Y. B., Z. R. Xu, M. S. Xia. 2005. The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds. *Fisheries Sci*. 71(5):1036-1041.
- Wenzler, E., K. Kamboj, J. M. Balada-Llasat. 2015. Severe sepsis secondary to persistent *Lysinibacillus sphaericus*, *Lysinibacillus fusiformis* and *Paenibacillus amylolyticus* bacteremia. *Int J Infect Dis*. 35:93-95.
- Xiong H, A. J. Rodríguez-Sánchez, S. Szedmak, J. Piater. 2015. Diversity priors for learning early visual features. *Front Comput Neurosci*. 9:104.
- Xu, W. J., L. Q. Pan, D. H. Zhao, J. Huang. 2012. Preliminary investigation into the contribution of bioflocs on protein nutrition of *Litopenaeus vannamei* fed with different dietary protein levels in zero-water exchange culture tanks. *Aquaculture*. 350:147-153.

Xu, W. J., L. Q. Pan. 2012. Effects of bioflocs on growth performance, digestive enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange tanks manipulating C/N ratio in feed. *Aquaculture*. 356:147-152.

Xu, W. J., L. Q. Pan. 2014. Evaluation of dietary protein level on selected parameters of immune and antioxidant systems, and growth performance of juvenile *Litopenaeus vannamei* reared in zero-water exchange biofloc-based culture tanks. *Aquaculture*. 426:181-188.

Zokaeifar H, N. Babaei, C. R. Saad, M. S. Kamarudin, K. Sijam, J. L. Balcazar. 2014. Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*. 36:68-74.

Zokaeifar, H., J. L. Balcázar, C. R. Saad, M. S. Kamarudin, K. Sijam, A. Arshad, N. Nejat. 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immun*. 33(4):683-689.

12. ANEXOS

Anexo 1. Tabla de referencia Api Zym

Quantité de substrat hydrolysé Quantity of hydrolysed substrate	Activité colorée Activity mark	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
>40 nanomoles	5	White	Light Purple	Light Blue	Light Green	Light Yellow	Light Orange	Light Red	Light Purple	Light Blue	Light Green	Light Yellow	Light Orange	Light Red	Light Purple	Light Blue	Light Green	Light Yellow	Light Orange	Light Red	Light Purple	Light Blue
30 nanomoles	4	White	Light Purple	Light Blue	Light Green	Light Yellow	Light Orange	Light Red	Light Purple	Light Blue	Light Green	Light Yellow	Light Orange	Light Red	Light Purple	Light Blue	Light Green	Light Yellow	Light Orange	Light Red	Light Purple	Light Blue
20 nanomoles	3	White	Light Purple	Light Blue	Light Green	Light Yellow	Light Orange	Light Red	Light Purple	Light Blue	Light Green	Light Yellow	Light Orange	Light Red	Light Purple	Light Blue	Light Green	Light Yellow	Light Orange	Light Red	Light Purple	Light Blue
10 nanomoles	2	White	Light Purple	Light Blue	Light Green	Light Yellow	Light Orange	Light Red	Light Purple	Light Blue	Light Green	Light Yellow	Light Orange	Light Red	Light Purple	Light Blue	Light Green	Light Yellow	Light Orange	Light Red	Light Purple	Light Blue
5 nanomoles	1	White	Light Purple	Light Blue	Light Green	Light Yellow	Light Orange	Light Red	Light Purple	Light Blue	Light Green	Light Yellow	Light Orange	Light Red	Light Purple	Light Blue	Light Green	Light Yellow	Light Orange	Light Red	Light Purple	Light Blue
0 nanomole	0	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White
		Control - Témoins	2 - naphthyl - phosphate	2 - naphthyl - butyrate	2 - naphthyl - caprylate	2 - naphthyl - inyrate	L - leucyl - 2 - naphthylamide	L - valyl - 2 - naphthylamide	L - cystyl - 2 - naphthylamide	N - benzoyl-DL - arginine - 2 - naphthylamide	N - glycaryl - phenylalanine - 2 - naphthylamide	2 - naphthyl - phosphate	Naphthol-AS-Bi-phosphate	6-Br-2-naphthyl-β-D-galactopyranoside	2-naphthyl-β-D-galactopyranoside	Naphthol-AS-Bi-β-D-galacturonide	2-naphthyl-β-D-glucopyranoside	6-Br-2-naphthyl-β-D-glucopyranoside	1-naphthyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide	6-Br-2-naphthyl-β-D-mannopyranoside	2-naphthyl-β-D-fucopyranoside	

Anexo 2. Tabla de capacidad hemolítica de las cepas aisladas en medio de cultivo MRS (1/2).

Cepa	Tipo
L2aM	Alfa
L3aM	Alfa
L4aM	Alfa
L5aM	Alfa
L6aM	Alfa
L7aM	Beta
L9aM	Alfa
L12aM	Beta
L12bM	Beta
L12cM	Beta
L14aM	Beta
L15aM	Beta
L15bM	Beta

Anexo 3. Tabla de capacidad hemolítica de las cepas aisladas en medio de cultivo MRS (2/2).

Cepa	Tipo
L15cM	Beta
L16aM	Beta
L17aM-a	Beta
L17aM-b	Beta
L17bM	Beta
L18aM	Beta
L18bM	Beta
L19aM	Beta
L19bM	Beta
L19cM	Alfa
L20aM	Beta
L21aM	Beta
L21aM-b	Alfa
L22aM	Beta