



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

ESTABILIDAD ECOLÓGICA EN SISTEMAS ACUÍCOLAS: UN
ENFOQUE HOLOBIÓMICO PARA LA GESTIÓN SOSTENIBLE DE
LA PRODUCCIÓN DE CAMARÓN.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

P r e s e n t a

Eric Daniel Gutiérrez Pérez

La Paz, Baja California Sur, mayo de 2024.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 19 del Mes de Abril del 2024, 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:

"ESTABILIDAD ECOLÓGICA EN SISTEMAS ACUÍCOLAS: UN ENFOQUE HOLOBIÓMICO PARA LA GESTIÓN SOSTENIBLE DE LA PRODUCCIÓN DE CAMARÓN "

Presentada por el alumno:

Eric Daniel Gutiérrez Pérez

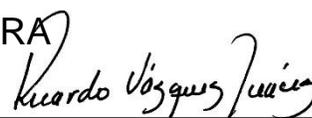
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Acuicultura

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.

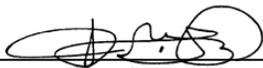
LA COMISIÓN REVISORA



Dra. Paola Magallón Servín
Co-Directora de Tesis



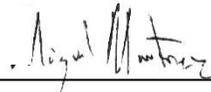
Dr. Ricardo Vázquez Juárez
Co-Director de Tesis



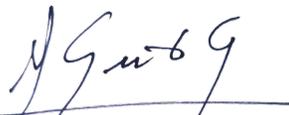
Dr. Francisco Javier Magallón Barajas
Co-Tutor de Tesis



Dra. Alejandra Escobar Zepeda
Co-Tutora de Tesis



Dr. Miguel Ángel Martínez Mercado
Co-Tutor de Tesis



Dra. Alejandra Nieto Garibay,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

La Paz, Baja California Sur, a 19 de Abril de 2024.

Los miembros del comité de tesis del estudiante Eric Daniel Gutiérrez Pérez del Programa de Doctorado en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
iThenticate
- Filtros utilizados:
 1. Citas excluidas
 2. Bibliografía excluida
 3. Coincidencias inferiores a 20 palabras excluidas
- Porcentajes de similitud:
2%
Se muestra captura de pantalla

TESIS

INFORME DE ORIGINALIDAD

2%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	cibnor.repositorioinstitucional.mx Internet	188 palabras — 1%
2	decapoda.nhm.org Internet	111 palabras — 1%
3	idoc.pub Internet	58 palabras — < 1%
4	aquahoy.com Internet	31 palabras — < 1%
5	docplayer.es Internet	24 palabras — < 1%
6	vdocumento.com Internet	22 palabras — < 1%

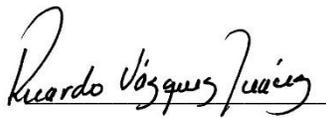
EXCLUIR CITAS ACTIVADO
EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA ACTIVADO

EXCLUIR FUENTES DESACTIVADO
EXCLUIR COINCIDENCIAS < 20 PALABRAS

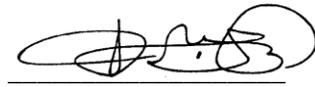
Firmas del Comité



Dra. Paola Magallón Servín



Dr. Ricardo Vázquez Juárez



Dr. Francisco Javier Magallón Barajas



Dra. Alejandra Escobar Zepeda



Dr. Miguel Ángel Martínez Mercado

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dra. Paola Magallón Servín
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Directora de Tesis

Dr. Ricardo Vázquez Juárez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Director de Tesis

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutor de Tesis

Dra. Alejandra Escobar Zepeda
EBI/Sanger Institute
Co-Tutora de Tesis

Dr. Miguel Ángel Martínez Mercado
CICESE-CIGoM
Co-Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dra. Paola Magallón Servín
Dr. Ricardo Vázquez Juárez
Dr. Francisco Javier Magallón Barajas
Dra. Alejandra Escobar Zepeda
Dr. Miguel Ángel Martínez Mercado

Jurado de Examen

Dra. Paola Magallón Servín
Dr. Ricardo Vázquez Juárez
Dr. Francisco Javier Magallón Barajas
Dra. Alejandra Escobar Zepeda
Dr. Miguel Ángel Martínez Mercado

Suplentes

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado

Resumen

El “holobioma del sistema acuícola” es una visión holística que reconoce que cada componente del sistema influye en los microbiomas presentes. Estos a su vez impactan en la estabilidad de la comunidad microbiana, la ecoeficiencia y la producción de las especies cultivadas. La estabilidad microbiológica en los sistemas de cultivo de biofloc es crucial para la sostenibilidad de la acuicultura intensiva de camarón. En este estudio, se propone el uso de métricas de diversidad como alternativa para comprender la estabilidad en los sistemas de biofloc durante el cultivo. Se analizaron datos de secuenciación de amplicones del gen 16S rRNA de un estudio longitudinal trifásico asociado a sistemas de biofloc con una duración de 109 días. Se analizaron cuatro tratamientos de biofloc: A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. La densidad de siembra en cada fase fue: Fase-1) 1500 PL•m⁻², Fase-2) 750 PL•m⁻² y Fase-3) 325 PL•m⁻². Se realizó un análisis FODA del sistema de producción de una empresa de larvicultura desde la perspectiva de la bioseguridad, incorporando el enfoque del holobioma y de la estabilidad de las comunidades microbiológicas

La volatilidad del índice de Faith revela una variación y tendencia oscilante, mientras que la volatilidad del índice de Pielou muestra un rango consistente de valores promedio entre 0.6 y 0.9 para los cuatro tratamientos. Existe una correlación significativa entre las covariables pH, Floc, Temperatura, Salinidad, Amonio y NH₃ y el índice de Faith, con una correlación negativa moderada con la temperatura. Los análisis ANCOM y de volatilidad de características a lo largo de las fases y tratamientos identifican la importancia de taxones clave, como Actinobacteria, Polyangia, Gammaproteobacteria, Cyanobacteria, Bacteroidia y Alphaproteobacteria. El análisis de PCoA y la prueba PERMANOVA de la 'distancia UniFrac no ponderada' muestran una diferenciación en la composición microbiana por Fase, Tratamiento, días de cultivo, Mes y pH. El análisis longitudinal basado en PCoA y el modelo de LME muestran una relación significativa entre los días de cultivo y la Fase en la estructura de las comunidades microbianas, demostrando que la diversidad beta presenta estabilidad a partir del día 44 (fases 2 y 3), influenciada por Actinobacteria, Polyangia y Alphaproteobacteria, consideradas estrategias K. El análisis FODA muestra que las amenazas más relevantes para la estabilidad microbiológica y la salud de los cultivos es la carga microbiana de Vibrios inherente a los organismos, así como el uso de antibióticos en el sistema productivo. Utilizar métricas de diversidad con modelos estadísticos, permite identificar el punto de estabilidad microbiológica en los sistemas de biofloc, junto con taxones clave, que en conjunto con análisis FODA ofrecen una perspectiva valiosa para optimizar la estabilidad microbiológica en sistemas de cultivo de biofloc.

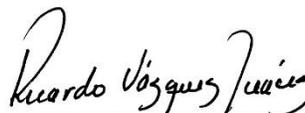
Palabras clave: Biofloc, cultivo de camarones, estabilidad microbiológica, análisis longitudinal, volatilidad de taxones.

ORCID: 0000-0001-5191-1814

Vo.Bo. Co-Directores de Tesis



Dra. Paola Magallón Servín



Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Summary

The "holobiome of the aquaculture system" is a holistic concept that recognizes how each component of the system influences the present microbiomes. These, in turn, impact the stability of the microbial community, eco-efficiency, and the production of cultivated species. Microbiological stability in biofloc cultivation systems is crucial for the sustainability of intensive shrimp aquaculture. In this study, the use of diversity metrics is proposed as an alternative to understanding stability in biofloc systems during cultivation. Amplicon sequencing data of the 16S rRNA gene from a 109 days longitudinal three-phase study associated with biofloc systems were analyzed. Four biofloc treatments were analyzed: A) Heterotrophic Probiotic, B) Chemotrophic Probiotic-Microalgae, C) Chemotrophic Probiotic, and D) Traditional maturation without specific probiotics. The stocking density in each phase was: Phase-1) 1500 PL•m⁻², Phase-2) 750 PL•m⁻², and Phase-3) 325 PL•m⁻². A SWOT analysis of the production system of a larviculture company was conducted from a biosafety perspective, incorporating the holobiome approach and the stability of microbiological communities.

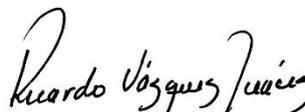
The volatility of the Faith index reveals oscillating variation and trend, while the volatility of the Pielou index shows a consistent range of average values between 0.6 and 0.9 for the four treatments. There is a significant correlation between the covariates pH, Floc, Temperature, Salinity, Ammonium, and NH₃, and the Faith index, with a moderate negative correlation with temperature. ANCOM and feature volatility analyses throughout the phases and treatments identify the importance of key taxa, such as Actinobacteria, Polyangia, Gammaproteobacteria, Cyanobacteria, Bacteroidia, and Alphaproteobacteria. PCoA analysis and PERMANOVA test of 'Unweighted UniFrac distance' show differentiation in microbial composition by Phase, Treatment, cultivation days, Month, and pH. Longitudinal analysis based on PCoA and LME model show a significant relationship between cultivation days and Phase in microbial community structure, demonstrating that beta diversity presents stability from day 44 (phases 2 and 3), influenced by Actinobacteria, Polyangia, and Alphaproteobacteria, considered as *K*-strategists. The SWOT analysis shows that the most relevant threats to microbiological stability and crop health are the *Vibrio* microbial load inherent in the organisms, as well as the use of antibiotics in the production system. Using diversity metrics with statistical models allows identifying the point of microbiological stability in biofloc systems, along with key taxa, which, together with SWOT analysis, offer a valuable perspective to optimize microbiological stability in biofloc culture systems.

Keywords: Biofloc, shrimp farming, microbiological stability, longitudinal analysis, taxon volatility
ORCID: 0000-0001-5191-1814

Vo.Bo. Co-Directores de Tesis



Dra. Paola Magallón Servín



Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Dedicatoria

A mis Padres, Raúl Gutiérrez Álvarez y María Elizabeth Pérez Albores, y a mi Hermano, Alan Alejandro Gutiérrez Pérez, por su apoyo y amor.

Al pueblo mexicano, cuyos impuestos apoyan la investigación y el desarrollo tecnológico. Espero que la información generada sea útil y contribuya al desarrollo social.

Al universo y al amor, por ser mis guías.

A mí mismo, con todo el amor, por todo el esfuerzo y entusiasmo puesto en este trabajo, que, pese a los inconvenientes, logró realizarse.

«El ser humano es un buen proyecto» -Prem Dayal-

«Que tu alimento sea tu medicina y tu medicina sea tu alimento» -Hipócrates-

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) y a la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, por permitirme realizar mis estudios de Doctorado, así como por los conocimientos y espacios brindados.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada con número #639891.

Al Laboratorio de Genómica y Bioinformática del CIBNOR por el acceso al servidor.

A los miembros de mi Comité Tutorial, Dra. Paola Magallón Servín, Dr. Ricardo Vázquez Juárez, Dr. Francisco Javier Magallón Barajas, Dra. Alejandra Escobar Zepeda y Dr. Miguel Ángel Martínez Mercado, por su apoyo académico, guía y comprensión en situaciones ajenas a nuestro control.

Al Dr. Guillermo Portillo Clark por sus consejos y asesorías en el manejo de sistemas acuícolas.

A la empresa Genética Acuícola Mexicana S.A. de C.V. (GENAMEX), por la capacitación brindada en el manejo de organismos y por ser el enlace con la empresa donde se realizó parte del trabajo.

A mis amigos, que me apoyaron y aconsejaron en los momentos difíciles: Hamid Tejas, Rubí Martínez, Salvador Reyes, Alicia Alvarado, Geovanna Zárate, Cristina Carreón, María Green, Marcela Escobedo y Lesly Castro.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de figuras	vii
Lista de tablas	ix
1.INTRODUCCIÓN	1
2.ANTECEDENTES	2
2.1 Los camarones.....	2
2.1.1 Penaeus (Litopenaeus) vannamei Boone, 1931.....	2
2.1.2 Morfología externa	3
2.1.3 Morfología interna	4
2.1.4 Ciclo de vida y establecimiento del microbioma intestinal	4
2.1.5 Cultivo de camarón	5
2.1.6 Producción de camarón en México y el mundo.....	6
2.2 Sistemas de cultivo con tecnología biofloc	7
2.2.1 Beneficios de los sistemas BFT.....	9
2.2.2 Retos para optimizar los sistemas BFT.....	9
2.2.3 El estudio de los bioflocs	10
2.2.4 Metabolismo de carbohidratos, crecimiento microbiano y biofloc	12
2.3 Alimentos fermentados en la acuicultura.....	15
2.3.1 Alimentos fermentados en el cultivo de camarón.....	15
2.3.2 Beneficios de los alimentos fermentados en el cultivo de camarón.....	16
2.4 El microbioma del camarón	17
2.5 Teoría ecológica en la acuicultura de camarón.....	19
2.6 Estabilidad de los sistemas biofloc.....	20
2.7 La metagenómica como enfoque molecular para el análisis de comunidades microbianas	21
2.8 El “holobioma del sistema acuícola”	22
2.8.1 El “holobioma del sistema acuícola” y su relación con la intensificación, la bioseguridad y la ecoeficiencia de los cultivos	23
3.JUSTIFICACIÓN	26
4.HIPÓTESIS	27
5.OBJETIVO	28
5.1 Objetivo general.....	28
5.2 Objetivos particulares	28
6.MATERIAL Y MÉTODOS	29
6.1 Estudio longitudinal de la estabilidad microbiológica de sistemas biofloc (CIBNOR)	29
6.1.1 Condiciones experimentales	29
6.1.2 Metadatos	30
6.1.3 Extracción de ADN y secuenciación	30
6.1.4 Análisis de datos.....	30

6.1.5 Análisis estadístico	31
6.2 Estudio en el sistema de producción de postlarvas de camarón (Empresa de larvicultura en Sinaloa).....	32
6.2.1 Diagrama del sistema productivo	32
6.2.2 Análisis del agua de cultivo	34
6.2.3 Determinación de amonio	34
6.2.4 Productividad del cultivo.....	35
6.2.5 Otros metadatos	35
7.RESULTADOS	36
7.1 Estudio Longitudinal y Estabilidad de comunidades bacterianas asociadas a bioflocs por el perfil taxonómico del gen 16S ARNr (CIBNOR).....	36
7.1.1 Procesamiento de las secuencias.....	36
7.1.2 Volatilidad de la diversidad alfa	36
7.1.3 Estadísticas de diversidad alfa	38
7.1.4 Abundancia diferencial.....	38
7.1.5 Identificación longitudinal de la volatilidad de características.....	39
7.1.6 Diversidad beta	43
7.1.7 Efectos mixtos lineales.....	47
7.1.8 Maduración microbiológica de los sistemas biofloc	47
7.2 Estudio en el sistema de producción de postlarvas de camarón.....	49
7.2.1 Estudio de DAFO/FODA de la empresa de larvicultura desde la perspectiva de bioriesgo.	49
8.DISCUSIÓN	51
8.1 Estudio Longitudinal y Estabilidad de comunidades bacterianas asociadas a bioflocs por el perfil taxonómico del gen 16S ARNr (CIBNOR).....	51
8.1.1 Diversidad alfa.....	51
8.1.2 Diversidad beta	53
8.1.3 Estabilidad de los sistemas biofloc.....	54
8.2 Estudio en el sistema de producción de postlarvas de camarón.....	56
9.CONCLUSIONES	58
10.LITERATURA CITADA.....	60
11.ANEXO	69
Anexo A.-Estudio Longitudinal y Estabilidad de comunidades bacterianas asociadas a bioflocs por el perfil taxonómico del gen 16S ARNr.....	69
Anexo B.-Artículo Publicado.- How a holobiome perspective could promote intensification, biosecurity and eco-efficiency in the shrimp aquaculture industry.	82
Anexo C.-Artículo Sometido.- Microbiological Stability of Biofloc Culture Systems in Shrimp Farming: A Perspective on Diversity.	102

Lista de figuras

Figura 1. Vista lateral de la morfología externa de un camarón peneido generalizado (Fischer et al., 1995).....	3
Figura 1.1. Genitales externos de camarones peneidos adultos generalizados (Fischer et al., 1995).	3
Figura 2. Vista lateral de la morfología interna de un camarón peneido adulto, hembra (Instituto Sinaloense de Acuicultura, 2009).	4
Figura 3. Ciclo de vida de camarones peneidos (Fischer et al., 1995).....	5
Figura 4. Componentes del "holobioma del sistema acuícola". El "microbioma del sistema de cultivo" implica el microbioma planctónico, el microbioma del sedimento y el microbioma del biofloc; en el "microbioma del huésped" pueden incluirse el microbioma de la piel, el hepatopáncreas y el intestino medio, entre otros; los "microbioma vectores" involucran aquellos componentes que pueden introducir activamente microbiomas exóticos (Gutierrez-Perez <i>et al.</i> , 2022).....	23
Figura 5. Esquema general de los módulos del sistema productivo de la empresa de larvicultura.	33
Figura 6. Análisis de volatilidad del índice de diversidad de Faith en cuatro tratamientos biofloc. A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Se señalan con flechas el inicio de cada fase del bioensayo. Los puntos en el gráfico representan la dispersión de los valores, las líneas continuas representan los valores promedio, las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar (+/- 2x y 3x) desde la media global.....	37
Figura 7. Análisis de volatilidad del índice de uniformidad de Pielou en cuatro tratamientos biofloc. A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Se señalan con flechas el inicio de cada fase del bioensayo. Los puntos en el gráfico representan la dispersión de los valores, las líneas continuas representan los valores promedio, las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar (+/- 2x y 3x) desde la media global.	37
Figura 8. Gráfico de la volatilidad de Actinobacteria por tratamiento. A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Los puntos en el gráfico representan la dispersión de los valores, las líneas continuas representan los valores promedio, las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar (+/- 2x y 3x) desde la media global.....	40
Figura 9. Gráfico de la volatilidad de Polyangia por tratamiento. A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Los puntos en el gráfico representan la dispersión de los valores, las líneas continuas representan los valores promedio, las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar (+/- 2x y 3x) desde la media global.....	41
Figura 10. Gráfico de la volatilidad de Gammaproteobacteria por tratamiento. A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Los puntos en el gráfico representan la dispersión de los valores, las líneas continuas representan los valores promedio, las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar (+/- 2x y 3x) desde la media global.....	41

Figura 11. Gráfico de la volatilidad de Cyanobacteria por tratamiento. A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Los puntos en el gráfico representan la dispersión de los valores, las líneas continuas representan los valores promedio, las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar (+/- 2x y 3x) desde la media global.....	42
Figura 12. Gráfico de la volatilidad de Bacteroidia por tratamiento. A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Los puntos en el gráfico representan la dispersión de los valores, las líneas continuas representan los valores promedio, las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar (+/- 2x y 3x) desde la media global.....	42
Figura 13. Gráfico de la volatilidad de Alphaproteobacteria por tratamiento. A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Los puntos en el gráfico representan la dispersión de los valores, las líneas continuas representan los valores promedio, las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar (+/- 2x y 3x) desde la media global.....	43
Figura 14. PCoA de UniFrac No Ponderado por fase. Fase 1) 1500 PL•m ⁻² ; Fase 2) 750 PL•m ⁻² ; Fase 3) 325 PL•m ⁻²	44
Figura 15. PCoA de UniFrac No Ponderado por tratamiento. A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico.	44
Figura 16. Gráfico de la volatilidad temporal en la estructura de la comunidad microbiana por fase. Fase 1) 1500 PL•m ⁻² ; Fase 2) 750 PL•m ⁻² ; Fase 3) 325 PL•m ⁻² . Los puntos en el gráfico representan la dispersión de los valores, las líneas continuas representan los valores promedio, las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar (+/- 2x y 3x) desde la media global.....	46
Figura 17. Gráfico de la volatilidad temporal en la estructura de la comunidad microbiana por tratamiento. A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Los puntos en el gráfico representan la dispersión de los valores, las líneas continuas representan los valores promedio, las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar (+/- 2x y 3x) desde la media global.....	47
Figura 18. Gráficos de dispersión de regresión que ilustran los efectos de la Fase (A) y el Tratamiento (B) en la comunidad microbiana. Las diferentes fases se definieron por la densidad de siembra: Fase 1) 1500 PL•m ⁻² ; Fase 2) 750 PL•m ⁻² ; Fase 3) 325 PL•m ⁻² . Se muestran los tratamientos A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico, y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Los puntos en los gráficos representan la dispersión de los valores, las líneas continuas representan los valores promedio.	48
Figura 19. Análisis FODA de la bioseguridad de la empresa de larvicultura	50

Lista de tablas

Tabla 1. Categorías con diferencias significativas en la prueba de Kruskal-Wallis para diversas métricas de diversidad alfa	38
Tabla 2. Análisis de correlación de Spearman para evaluar la influencia de covariables en los índices de diversidad alfa de Faith y Pielou.	39
Tabla 3. Resultados de la prueba PERMANOVA para la métrica “UniFrac no ponderado” para cada categoría de interés.	45
Tabla 4. Resultados de la prueba PERMDISP para la métrica UniFrac no ponderado para cada categoría de interés.	45
Tabla 5. Resultados de la prueba ADONIS para la métrica UniFrac no ponderado para cada categoría de interés.	46
Tabla 6. Tabla de datos microbiológicos, amoníaco y de producción obtenidos de los muestreos	49

1. INTRODUCCIÓN

México es el 7° productor mundial de camarón y exporta cerca del 17.6% de su producción (SIAP, 2020). En 2018 el 68.5% de la producción nacional de camarón fue de origen acuícola, siendo el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) la principal especie cultivada (CONAPESCA, 2018; SIAP, 2019). En México, los sistemas de cultivo intensivos (≤ 300 Poslarvas $\cdot m^2$) de camarón son uno de los sectores más tecnificados dentro de la acuicultura de esta especie. Sin embargo, en los últimos años su crecimiento ha sido afectado por diversos brotes de enfermedades (Instituto Nacional de Pesca, 2013), haciendo que el cultivo semi-intensivo (≤ 30 Poslarvas $\cdot m^2$) sea la principal forma de producción (CONAPESCA, 2017).

La tecnología de biofloc (BFT) emerge como una estrategia para impulsar la sostenibilidad en la acuicultura en cultivos intensivos de camarón blanco, donde su éxito está intrínsecamente ligado a las comunidades microbiológicas (Krummenauer *et al.*, 2020). Estas comunidades desempeñan funciones cruciales, como mantener la calidad del agua al absorber compuestos nitrogenados, proporcionar una fuente de alimento viable y competir contra patógenos para fortalecer la salud y la bioseguridad del sistema BFT (Nery *et al.*, 2019; Pimentel *et al.*, 2023). La BFT se centra en estimular una comunidad microbiana específica para facilitar el reciclaje de nutrientes y mantener la calidad del agua (Ferreira *et al.*, 2021). La estabilidad microbiana en los sistemas BFT se explica por la teoría ecológica de los estrategias r/K, que distingue entre comunidades microbianas oportunistas (r) y no oportunistas (K) (Chen *et al.*, 2023; Skjermo *et al.*, 1997). Identificar los factores que afectan las comunidades microbianas y determinar el punto de estabilidad microbiológica en estos sistemas es esencial para lograr un control de las condiciones del cultivo y una predicción del estado de salud del cultivo (Copetti *et al.*, 2021; Pimentel *et al.*, 2023), así como para su promoción, para lo cual son necesarios estudios longitudinales (Quince *et al.*, 2017). Por otra parte, alteraciones en el microbioma del sistema de cultivo y las fluctuaciones constantes de nutrientes pueden afectar el microbioma intestinal de los camarones (Cornejo-Granados *et al.*, 2018), que está involucrado en el crecimiento y desarrollo del hospedero, afectando la absorción de nutrientes, modulando la respuesta inmunológica y previniendo el crecimiento de bacterias patógenas en el organismo (Panigrahi *et al.*, 2018; Buford, 2017), por lo cual, es esencial adoptar una visión holística del sistema de acuicultura, integrando todos sus elementos bajo el concepto de "holobioma".

2. ANTECEDENTES

2.1 Los camarones

Existen cerca de 2500 especies de camarón descritas en el mundo, los cuales pueden alcanzar tallas desde unos milímetros hasta aproximadamente 35 cm de longitud (desde la extremidad del rostro hasta la punta del telson). Este grupo de crustáceos se extiende desde el ecuador hasta las regiones polares, en ambientes marinos, salobres y en aguas dulces. A pesar del gran número de especies descritas, solo alrededor de 300 son de interés económico, los cuales se explotan en aguas de la plataforma continental a profundidades inferiores a 100 m. La mayor parte de las especies son bentónicas y en la fase adulta viven sobre fondos muy variados. Las especies de camarón de interés comercial del Pacífico centro-oriental pertenecen a 5 familias: *Penaeidae*, *Sicyoniidae* y *Solenoceridae* (Penaeoidea), y *Pandalidae* y *Palaemonidae* (Caridea) (Fischer *et al.*, 1995).

2.1.1 *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* Boone, 1931

El camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) es una especie característica de fondos lodosos. Durante su vida adulta son esencialmente marinos y son capturados a profundidades entre 5 y 72 m, mientras que en aguas marinas costeras se encuentran entre 1 y 4 m. Esta especie necesita de los sistemas estuarinos y lagunares para su crecimiento (Fischer *et al.*, 1995).

Al igual que *Litopenaeus stylirostris*, *L. vannamei* ha sido utilizado con éxito en la acuicultura, y su cultivo se ha convertido en una actividad económica importante para México. La pesquería de esta especie es importante principalmente en el sur de México donde se clausuran las bocas de las lagunas una vez que las postlarvas entran, lo cual aumenta el rendimiento de las capturas cuando las postlarvas han alcanzado la fase adulta, alcanzando una longitud máxima de 23 cm (Fischer *et al.*, 1995).

2.1.2 Morfología externa

La morfología externa del camarón se esquematiza en la Fig. 1 y Fig. 1.1.

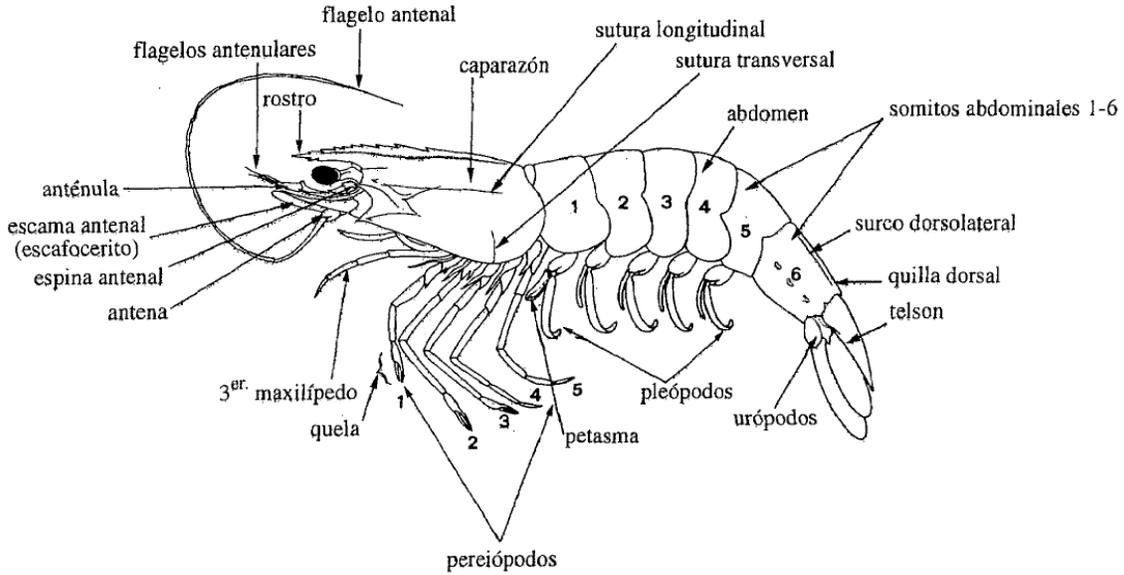


Figura 1. Vista lateral de la morfología externa de un camarón peneido generalizado (Fischer et al., 1995).

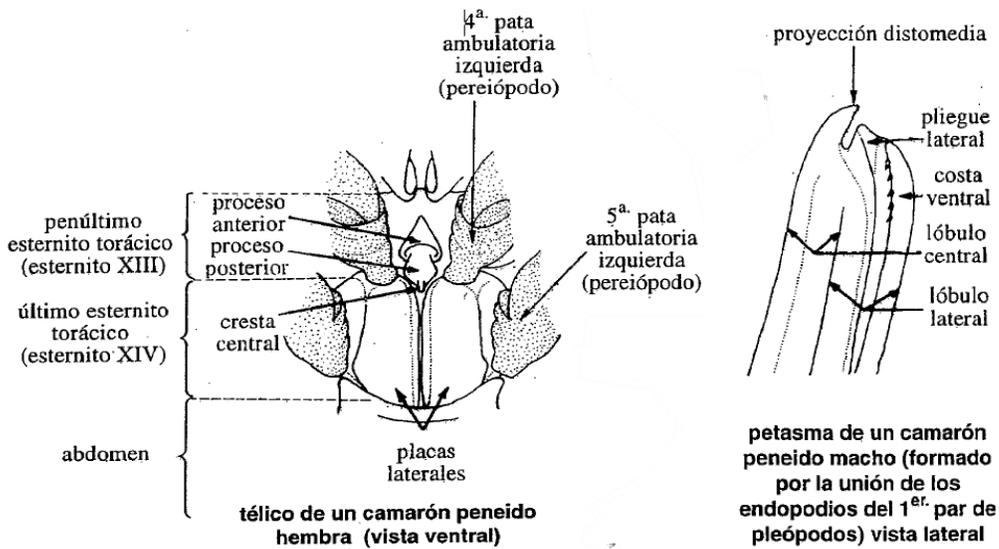


Figura 1.1. Genitales externos de camarones peneidos adultos generalizados (Fischer et al., 1995).

estadio de mysis I los organismos ya presentan aspecto de camarón y se empiezan a formar las estructuras mandibulares y las superficies internas para la maceración del alimento. Las larvas planctónicas, son llevadas por la corriente marina hacia la costa y en el trayecto se convierten en postlarvas (PL) pero es hasta la mysis tardía y estadio de postlarva temprana que se vuelven principalmente zooplanctonófagas. En aguas salobres costeras dejan su modo de vida planctónico y asumen uno bentónico, en estos fondos ricos en alimento se acelera su crecimiento alcanzando el estadio juvenil, en el cual, obtienen una condición omnívora plena. Al aumentar su talla, regresan a la zona de desagüe de los estuarios, donde se convierten en sub-adultos para posteriormente migrar a aguas oceánicas donde continúan su crecimiento y ciclo reproductivo (Fig. 3) (Fischer *et al.*, 1995; Samocha, 2019; Simoes *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2020).

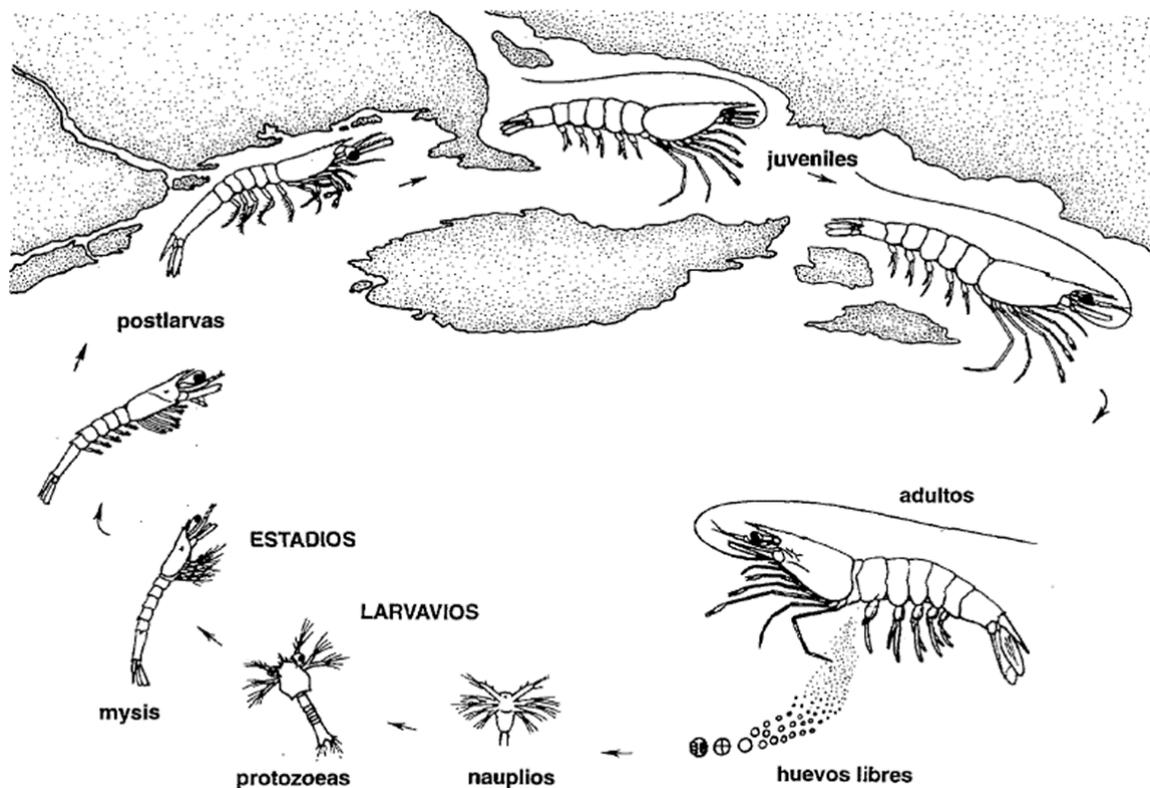


Figura 3. Ciclo de vida de camarones peneidos (Fischer *et al.*, 1995).

2.1.5 Cultivo de camarón

De acuerdo con la densidad de organismos cultivados y la tecnificación, los sistemas de cultivo se clasifican en extensivo, semi-intensivo, intensivo e hiperintensivo. En los sistemas extensivos la sobrevivencia de los organismos es del 50%, mientras que en sistemas intensivos e

hiperintensivos aumenta a 75% y 85% respectivamente, lo cual está ligado al nivel de tecnificación que también permite reducir los tiempos de cultivo. Para el buen desarrollo de los cultivos es necesario mantener las mejores condiciones ambientales, cuyos promedios son: 28°C, 35 ups, 6 mL•L⁻¹ de oxígeno disuelto, pH 7-9, <0.1 mg•L⁻¹ de nitrito, 0.4-0.8 mg•L⁻¹ de nitrato, 0.1-1 mg•L⁻¹ de amonio, 35-45 cm de turbidez y 100-140 mg•L⁻¹ de alcalinidad (Instituto Nacional de Pesca, 2013; CONAPESCA, 2017). Por otra parte, una buena nutrición es clave para la calidad del producto, la salud y el crecimiento de los organismos e influye en la generación de residuos. Los alimentos formulados que se suministran a los cultivos contienen los requerimientos necesarios de proteína, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales. Los aminoácidos esenciales que debe tener la fuente de proteína son la arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina, y dentro de los ácidos grasos esenciales se encuentran el ácido linoleico, linolénico, araquidónico, eicosapentanoico (EPA) y docosahexanoico (DHA) (Martínez-Córdova *et al.*, 2014; Prangnell *et al.*, 2019).

Para aumentar los niveles de producción de camarón, la industria se ha tecnificado y pasado de sistemas de cultivo semi-intensivos a intensivos/hiperintensivos. Este cambio combinado con la introducción de nuevas variedades de camarón y la internacionalización del mercado, ha promovido la propagación de enfermedades, mermando las producciones y haciendo que los sistemas semi-intensivos sigan siendo la principal forma de producción en México (CONAPESCA, 2017; Xiong *et al.*, 2016; Prangnell *et al.*, 2019). Esta intensificación también se caracteriza por demandar mayores insumos de alimento, los cuales representan hasta el 60% de los costos de producción, y generan desafíos a combatir como una mayor descarga de nitrógeno al ambiente, mayor riesgo de enfermedades e introducción de patógenos en los cuerpos de agua naturales (Xiong *et al.*, 2016; Dauda, 2020; Crab *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2019).

2.1.6 Producción de camarón en México y el mundo

La producción de camarón es una actividad económica importante, existen 118 países con actividad camaronera y a nivel mundial se producen 9.1 millones de toneladas de las cuales, China aporta el mayor volumen (41.8%) (SIAP, 2019). México es actualmente el 7° productor mundial de camarón con 237,674 toneladas (3% del volumen mundial) y exporta el 17.6% de su

producción con un valor de 386,000,000 USD (SIAP, 2020). Por su volumen, el camarón ocupa el segundo lugar en la producción pesquera en México, sin embargo, por su valor económico, se localiza en el primer lugar (CONAPESCA, 2021). En 2018 el 68.5% de la producción mexicana de camarón fue de origen acuícola, siendo el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) la principal especie cultivada (99% de la producción acuícola) (CONAPESCA, 2018; CONAPESCA, 2014). Los cinco principales estados productores de camarón en México son: Sinaloa, Sonora, Nayarit, Tamaulipas y Baja California Sur (SIAP, 2020).

Los principales mercados de la producción mexicana lo constituyen Estados Unidos, Vietnam y Francia, y del año 2012 al 2017 las naciones de destino del producto mexicano, aumentó de 13 a 16 respectivamente (CONAPESCA, 2017). El 80% de la exportación mexicana la adquiere Estados Unidos, la cual tiene un valor de 293,985,642 USD. Por otra parte, el 47.7% del camarón que México importa para consumo proviene de China (SIAP, 2020). Dentro de los países que realizan compras significativas de camarón se encuentran Emiratos Árabes Unidos, Corea del Sur, Venezuela y Dinamarca, los cuales, se perfilan como mercados potenciales para la venta mexicana (SIAP, 2019).

El estancamiento de las capturas pesqueras, el incremento poblacional y la preferencia del consumidor por productos más saludables y amigables con el ambiente, ha provocado un aumento en la demanda de camarón cultivado (FAO, 2020; FAO, 2018; Guemez-Sorhouet *et al.*, 2019). Esto hace necesario que la industria camaronera satisfaga los requerimientos de los países importadores en los aspectos de: residuos químicos, seguridad alimentaria, certificación, trazabilidad, etiquetado de certificación ecológica y sustentabilidad ambiental (FAO, 2020; FAO, 2018).

2.2 Sistemas de cultivo con tecnología biofloc

La Tecnología Biofloc (BFT) es una tecnología que mejora la calidad del agua de los sistemas acuícolas mediante la adición de una fuente de carbono, lo cual estimula el crecimiento bacteriano en el agua de cultivo reduciendo la concentración de compuestos nitrogenados como el amonio, al ser transformado en proteínas por los microorganismos (Ekasari *et al.*, 2014). El

biofloc está compuesto por partículas orgánicas pequeñas formadas de excreciones, partículas de alimento, detritos y microbios, unidos por las secreciones exopoliméricas de los últimos (Guemez-Sorhouet *et al.*, 2019; Ray y Lotz, 2014). Los sistemas BFT cumplen la función de eliminar los compuestos tóxicos nitrogenados a través de la asimilación bacteriana heterotrófica, oxidación bacteriana quimioautotrófica (nitrificación) o asimilación fotoautotrófica (Huang *et al.*, 2020a; Martins *et al.*, 2020). Si se aumenta la proporción C/N= ~15 en los cultivos, al emplear suplementos de carbono orgánico como melaza, se estimula la asimilación de amoníaco por bacterias heterotróficas. En contraste, a relaciones de C/N= ~9, se favorece la oxidación de amoníaco en nitrito. Las bacterias responsables de este último proceso crecen lentamente en comparación con las bacterias heterotróficas, por esta razón, los sistemas de biofloc tienden a iniciarse con la suplementación de carbono orgánico (Brito *et al.*, 2016). Los sistemas que emplean biomasa de biofloc $<0.5 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$, presentan procesos microbianos dominados por algas (Ray y Lotz, 2014).

La mayoría de los alimentos acuícolas tienen una relación C/N= ~7 y bajo estas concentraciones las comunidades heterotróficas no se desarrollan, haciendo necesario la suplementación de fuentes de carbono para elevar esta relación alrededor de 20:1, con lo cual, estas comunidades pueden proliferar y asimilar una unidad de nitrógeno (ej. 20g de glucosa por cada gramo de amonio) (Panigrahi *et al.*, 2018). Las bacterias heterotróficas emplean la materia orgánica disponible como sustrato para obtener nutrientes y energía, en los sistemas biofloc, el sustrato lo obtienen del alimento suministrado a los organismos cultivados, desechos de estos y de fuentes de carbono que se adicionan a los sistemas. Estos organismos generan 40 veces más biomasa por unidad de sustrato en comparación con los quimioautótrofos (obtienen energía por oxidación de compuestos inorgánicos como el NH_3) además de asimilar el 100% de una cantidad determinada de amoníaco en contraste con los nitrificadores que oxidan el 97.5% de la misma cantidad en nitrato (Panigrahi *et al.*, 2018).

En los sistemas de biofloc con mayor suplementación de carbono orgánico, la concentración de sólidos suspendidos totales (SST) aumenta a un ritmo más rápido (Panigrahi *et al.*, 2018), lo cual puede reducir el oxígeno disuelto en el agua, reducir el crecimiento y obstruir las branquias de

los animales cultivados (Martins *et al.*, 2020). Sin embargo, el control del amoníaco por asimilación heterotrófica es inestable debido a la degradación de las bacterias muertas en los sistemas, lo cual exige un suministro continuo de carbono (Deng *et al.*, 2019). En los sistemas BFT heterotróficos también se desarrollan procesos de nitrificación bacteriana y acumulación de NO_3^- , pero se requieren periodos extensos para establecer un proceso completo de nitrificación en el sistema (Luo *et al.*, 2020). El NO_3^- es la forma más estable del nitrógeno en el agua, por lo cual, promover la nitrificación, puede amortiguar la liberación de amoníaco producido por la degradación de las bacterias muertas en los sistemas (Ray y Lotz, 2014).

2.2.1 Beneficios de los sistemas BFT

Los sistemas BFT se han implementado en la acuicultura de *Litopenaeus vannamei* (Cardona *et al.*, 2016; Panigrahi *et al.*, 2020) lo cual ha permitido intensificar su cultivo, mejorar su crecimiento, fortalecer su sistema inmune, mejorar la tasa de conversión alimenticia, aumentar la supervivencia y mantener la calidad del agua de los cultivos (Guemez-Sorhouet *et al.*, 2019; Deng *et al.*, 2019; Cavalcanti-Nery *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2016), además, estos sistemas requieren poco o nulo intercambio de agua, lo cual mejora la bioseguridad del cultivo al disminuir la entrada de agentes patógenos (Fatimah *et al.*, 2019).

2.2.2 Retos para optimizar los sistemas BFT

Para optimizar los sistemas BFT en el cultivo de camarón hay que superar algunos retos como lo son: 1. Identificar los microorganismos que producen biofloc con características benéficas, para ser utilizados como inóculos, 2. Desarrollar técnicas de monitoreo de las características y composición de los flóculos, 3. Optimizar la calidad nutricional de los flóculos, 4. Determinar el impacto del tipo de fuente de carbono en las características del biofloc y 5. Elucidar las funciones del microbioma de los organismos cultivados, sobre la producción y la salud del cultivo (Martins *et al.*, 2020; Crab *et al.*, 2012).

2.2.3 El estudio de los bioflocs

Las investigaciones se han centrado principalmente en la descripción de los atributos y la caracterización de las comunidades bacterianas en los sistemas BFT para entender su dinámica (Huang *et al.*, 2020a). Se ha descrito que la diversidad y estructura de las comunidades bacterianas en los bioflocs son afectados por variables que se relacionan con la forma de generar el biofloc en los cultivos. Martins *et al.* (2020) describe que en sistemas multitróficos de camarón blanco y tilapia, la diversidad de la comunidad bacteriana y la abundancia relativa de la familia *Vibrionaceae* se redujeron en el sistema biofloc heterotrófico (generado con azúcar blanca de caña), el cual también mejoró la recuperación de N y P en el sistema, pero produjo más lodo en comparación con el sistema con biofloc maduro (generado con agua de cultivos previos, ricos en biofloc), este último, promueve concentraciones más bajas de nitrito y amoníaco, los cuales son los desechos nitrogenados más tóxicos. Deng *et al.* (2019) reportan que la densidad de camarones cultivados (400, 600 y 800 por m⁻²) en sistemas biofloc, provoca una variación en las comunidades microbianas de los flóculos, a pesar de mantener la misma condición de C/N (15:1) en cada sistema; la disponibilidad de nutrientes juega un papel importante en la biodiversidad de microorganismos, por lo cual, al acumularse más nutrientes en el sistema con mayor densidad de siembra, se generó más biofloc y fue el sistema que presentó mayor diversidad bacteriana en el agua. Huang *et al.* (2020a) estudiaron la composición de las comunidades bacterianas en tres diferentes tamaños de biofloc (generado con sacarosa; cultivos con C/N=15) provenientes de cultivos de camarón, reportando que existen diferencias significativas entre las comunidades bacterianas de biofloc grandes (>20 µm) y pequeños (<20 µm), presentando los primeros un enriquecimiento en *Rhodobacteraceae* y *Flavobacteriaceae* los cuales, mantienen una correlación positiva con el crecimiento y tasa de supervivencia de camarones, por otro lado, algunos patógenos como *Vibrionaceae* estaban sobrerrepresentados en los bioflocs pequeños y los cuales tuvieron una correlación negativa con los parámetros de crecimiento. Liu *et al.* (2019) investigaron el uso de polvo de semillas de longan, polibutirato-β-hidroxibutirato-β-hidroxivalerato (PHBV) y la mezcla de ambos (PHBVL), como fuentes de carbono para la generación de sistemas biofloc (C/N=15) en el cultivo de tilapia, reportando que los tratamientos con PHBV y PHBVL son más eficientes en la eliminación de nitrógeno inorgánico, mientras que en el tratamiento con longan se presenta una acumulación de nitrato, resultado de una actividad de

nitrificación dominante; los biofloc generados con PHBV y PHBVL presentan una composición de aminoácidos más alta, particularmente de metionina y lisina, pero no se reflejó en el músculo de la tilapia, además, la tasa de conversión alimenticia fue menor en el tratamiento con PHBVL, con el cual se obtuvo una mayor ganancia de peso final. La relación C/N en los sistemas BFT también afecta la composición, estructura y estabilidad de los bioflocs. Panigrahi et al. (2018) estudiaron el efecto de diferentes relaciones de C/N (5:1, 10:1, 15:1 y 20:1) en el cultivo de camarón, empleando melaza fermentada con un consorcio microbiano para generar un biofloc heterotrófico, reportando que los tratamientos con las relaciones 15:1 y 20:1 son más eficientes en la reducción de los niveles de amonio, nitrito y nitrato, además, en los tratamientos con relación C/N $\geq 10:1$ se obtuvo una supervivencia significativamente mayor, una menor tasa de conversión alimenticia (FCR) y una mayor tasa de crecimiento en los organismos; las diferentes relaciones C/N produjeron cambios en las comunidades microbianas de los bioflocs, los *vibrios* fueron las bacterias dominantes en el grupo control (79%) y en el tratamiento 5:1 (37%), el género *Thauera* fue el más representado (62%) en el tratamiento 10:1, *Attheyaceae* fue el grupo dominante (56%) en el tratamiento 15:1, mientras que *Psytechrobacter* (26%), *Proteobacteria* (25%) y *Peridiniaceae* (20%), fueron dominantes en el tratamiento 20:1, observándose que el dominio de *Vibrio* disminuyó con el aumento de la relación C/N. Además de esto, se observó una tendencia creciente en los niveles de expresión de cuatro genes relacionados con el sistema inmune del camarón al incrementar la relación C/N. Empleando secuenciación de alto rendimiento y herramientas bioinformáticas, Vargas-Albores et al. (2019), investigaron las propiedades funcionales de las comunidades bacterianas en bioflocs generados con semillas de amaranto y trigo en el cultivo de camarón. Se observó que ambos cereales mantuvieron una calidad de agua adecuada para la especie cultivada. Al inicio del ensayo, cada fuente de carbono produjo un perfil taxonómico distinto en las comunidades bacterianas del biofloc, lo que resultó en diferentes propiedades funcionales. Sin embargo, a medida que avanzaba el ensayo, las condiciones mantenidas en los tratamientos propiciaron la proliferación de las mismas comunidades hacia el final del estudio. Se identificaron cuatro filos principales en ambas estructuras taxonómicas de bioflocs: Planctomycetes, Proteobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes. Además, se detectó evidencia de metabolismo de metano (vías RuMP y serina), nitrógeno (por

fijación, desnitrificación, nitrificación y desintoxicación) y fijación de dióxido de carbono (ciclos de Calvin, dicarboxilato-hidrobutirato, Wood Ljungdahl) en ambos sistemas.

Las investigaciones se han centrado en describir los atributos de los sistemas BFT y caracterizar las comunidades bacterianas en el biofloc, pero también se ha incursionado en el estudio del microbioma intestinal de los camarones, reportando por ejemplo que: 1. La microbiota intestinal del camarón es afectada por la densidad de siembra en el cultivo, presentando mayor similitud con las comunidades bacterianas del agua de cultivo a una mayor densidad de siembra (Deng *et al.*, 2019), 2. La microbiota intestinal del camarón está más relacionada con las comunidades bacterianas de bioflocs de tamaños $>20 \mu\text{m}$, la cual presenta taxones fuertemente relacionados con la salud del camarón y la calidad del agua (Huang *et al.*, 2020a), 3. La fuente de carbono empleada para generar los sistemas BFT afectan la composición de la comunidad bacteriana en el intestino de peces, afectando la actividad de las enzimas digestivas (Liu *et al.*, 2019). Para optimizar y avanzar en el entendimiento de la dinámica interna de los sistemas BFT es necesario investigar la relación que mantienen con el microbioma de los organismos, sus cambios y aportación metabólica durante el cultivo, así como los genes asociados a actividades antagonistas (Bentzon-Tilia *et al.*, 2016; Dittmann *et al.*, 2017; Verstraete y De Vrieze, 2017).

2.2.4 Metabolismo de carbohidratos, crecimiento microbiano y biofloc

Los sustratos que los microorganismos utilizan son principalmente los carbohidratos metabolizables, proteínas y lípidos, los cuales son aprovechados por diferentes vías generadoras de energía (respiración aeróbica, anaeróbica y la fermentación). Dependiendo el tipo de sustrato, estos pueden contener muchos tipos y diferentes cantidades de carbohidratos, proteínas y lípidos. Aunque los carbohidratos son la fuente preferida de los microorganismos para producción de energía, cada especie tiene amplias diferencias en su capacidad para degradarlos. Los carbohidratos comprenden compuestos como monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Los que se degradan a nivel celular como los monosacáridos, disacáridos y trisacáridos, pueden ser transportados dentro de la célula e hidrolizarse a unidades de monosacáridos antes de una mayor degradación, los polisacáridos se degradan a monosacáridos

y disacáridos, mediante enzimas microbianas extracelulares secretadas al ambiente, antes de que puedan ser transportadas y metabolizadas (Ray y Bhunia, 2010).

Dos aspectos relevantes del crecimiento microbiano en la acuicultura son la secuencia del crecimiento y el crecimiento diáuxico. En el primer caso, en alimentos/sistemas con población mixta de microorganismos, algunas de las especies pueden estar en condiciones de crecimiento óptimo o casi óptimo volviéndose predominantes, pero pueden crear un ambiente en que ya no puedan crecer rápidamente, por el agotamiento de su principal fuente de energía o la incapacidad de aprovechar las fuentes disponibles, lo que hace posible que otro tipo de población encuentre favorable este ambiente para su crecimiento. En el segundo caso los microorganismos que metabolizan más de dos nutrientes, en el que prefieren a uno sobre otro, y que se encuentran en concentraciones limitadas, muestran crecimiento en etapas, al principio la cepa crece utilizando el nutriente preferido hasta agotarlo, y después de un periodo de adaptación crece utilizando los demás nutrientes, como sucede en algunas bacterias ácido lácticas y gram negativas (Ray y Bhunia, 2010).

Una herramienta para obtener mayor beneficio (para el hombre o cultivos acuícolas) de algunos alimentos es la fermentación. Durante la fermentación, se produce una variedad de metabolitos secundarios, algunos de los cuales tienen propiedades que promueven la salud, como es el caso notable de las vitaminas del complejo B y péptidos bioactivos (antimicrobianos, reductores de colesterol, inmunoestimulantes etc.) liberados de las proteínas de los alimentos por bacterias ácido lácticas (Stanton *et al.*, 2005). Además, la fermentación hace más digeribles a los alimentos y puede eliminar componentes tóxicos de ellos como la saponina hemolítica (Lai *et al.*, 2013). Inoguchi *et al.* (2012) estudiaron el efecto de la ingesta de leche de soya fermentada sobre la microbiota y los metabolitos fecales en humanos, resaltando tres aspectos relevantes: 1. De un total de 27 cepas estudiadas, todas las especies de *Bifidobacterium*, metabolizan rafinosa, estaquiosa y oligosacáridos de soya, excepto *B. bifidum* y la mayoría de los aislados de *E. coli* y *C. perfringens*; 2. La leche de soya contiene carbohidratos como glucosa, fructosa, sacarosa, rafinosa y estaquiosa, y al fermentarse con el cultivo láctico KEFIR disminuyó significativamente la glucosa y la sacarosa, indicando que estos carbohidratos fueron utilizados como sustrato por los cultivos

lácticos empleados; 3. El número de bifidobacterias y lactobacilos aumentó significativamente, y el número de clostridios lecitinasa-negativa disminuyó durante el periodo de ingesta de leche fermentada en la microbiota fecal de los voluntarios, además, el primer hecho estuvo ligado al incremento de ácido acético fecal (contribuye a la homeostasis intestinal) mientras que el segundo estuvo ligado a la disminución de sulfuro fecal (sustancia nociva producto de la putrefacción en el intestino). Lai et al. (2013) investigaron el efecto de la fermentación láctica de la leche de soya con *Streptococcus thermophilus* y *Bifidobacterium infantis*, reportando que la fermentación reduce el contenido de saponinas y fitatos (antinutrientes), mejora el contenido fenólico total e incrementa el efecto antitumoral de la leche de soya sobre dos líneas celulares de cáncer de colon.

En los sistemas BFT se han empleado consorcios microbianos en conjunto con melaza para establecer procesos fermentativos para promover un biofloc heterotrófico en cultivos de camarón, lo cual aumenta la riqueza bacteriana en el agua de los sistemas en comparación con el sistema BFT clásico (Huerta-Rábago *et al.*, 2019), pero además, se ha empleado melaza fermentada con consorcios microbianos y diferentes relaciones de C/N, para fomentar bioflocs heterotróficos, reportando que en los tratamientos con mayor relación C/N se obtienen mayores beneficios en la salud del camarón y se aumenta la riqueza microbiana en el agua de cultivo (Panigrahi *et al.*, 2018) lo cual tiene un impacto sobre el microbioma de los organismos. La melaza de caña es un subproducto de la extracción del azúcar y se usa ampliamente en la nutrición animal, este subproducto, contiene diferentes fuentes de carbono como la sacarosa, glucosa, fructosa, almidón y dextrano, además, contiene diferentes ácidos orgánicos, minerales, sulfatos y fosfatos (Palmonari *et al.*, 2020), por esta razón, es empleado para promover comunidades heterotróficas en cultivos acuícolas, sin embargo, se obtiene un mayor beneficio/impacto en la riqueza microbiana de sistemas BFT y en el microbioma de los organismos cultivados, al emplear consorcios microbianos en conjunto, lo cual se debe a que estos aprovechan los compuesto más fáciles de metabolizar como la glucosa, evitando sean aprovechados por patógenos oportunistas (Vadstein *et al.*, 2018), y degradan compuestos complejos a más simples, lo cual crea microambientes (nichos) favorables para el desarrollo de otros microorganismos provenientes del ambiente o del organismo cultivado.

2.3 Alimentos fermentados en la acuicultura

La fuente de proteína más común en los alimentos acuícolas es la harina de pescado ya que es altamente digestible, apetecible, contiene los aminoácidos esenciales y nutrientes necesarios para cumplir los requisitos dietéticos de los cultivos (Shiu *et al.*, 2013). La disminución de su producción y su alto costo ha llevado a la búsqueda de alternativas para sustituirla en los alimentos, como lo son las proteínas de fuentes vegetales que, aunque son alternativas prometedoras por su sostenibilidad y precio razonable, su uso en altos niveles resulta en una reducción en la digestibilidad del alimento y el crecimiento de los organismos, lo cual, se debe a su deficiencia en aminoácidos esenciales, alto contenido de fibra y antinutrientes (inhibidores de la tripsina, ácido fítico, taninos, saponinas y lectinas) que además afectan la palatabilidad del alimento (Hu *et al.*, 2019; Hua *et al.*, 2019; McLean *et al.*, 2020). Para solucionar esto, se ha empleado la fermentación microbiana utilizando bacterias (Hamidoghli *et al.*, 2020), hongos (Jannathulla *et al.*, 2018) y levaduras (Kang *et al.*, 2010) lo cual, mejora la calidad nutricional de las fuentes proteicas vegetales, su digestibilidad y el perfil de aminoácidos esenciales, y se disminuyen los anti nutrientes (Jannathulla *et al.*, 2018; Jannathulla *et al.*, 2017). Dependiendo del tipo de microorganismo empleado y la fuente proteica, el nivel de estos compuestos cambia. Jannathulla *et al.* (2017) reportan que de las fuentes proteicas que evaluaron, la harina de colza fermentada con *Aspergillus niger* presentó un mejor índice de aminoácidos esenciales; las fracciones de fibra se redujeron significativamente en las fuentes fermentadas con *A. niger* y *Saccharomyces cerevisiae* pero no en la fermentación natural ni con *Lactobacillus acidophilus*; y la reducción de antinutrientes fue menor en la fermentación natural, siendo mejor *L. acidophilus* en la reducción de ácido fítico.

2.3.1 Alimentos fermentados en el cultivo de camarón

Se han evaluado diferentes proteínas vegetales fermentadas incorporadas a alimentos para el cultivo de camarón, como lo son la harina de soya (McLean *et al.*, 2020), torta de aceite de cacahuate, harina de colza, torta de aceite de girasol (Jannathulla *et al.*, 2018), harina de guar (Jannathulla *et al.*, 2017), harina de soya junto con harina de gluten de maíz y concentrado de proteína de soya (Hamidoghli *et al.*, 2020). Algunas de estas proteínas se han incorporado al

alimento sin recibir tratamiento posterior a la fermentación y en otros casos reciben una esterilización previa a su incorporación. El proceso de fermentación permite que los alimentos que se crean presenten un mejor coeficiente de digestibilidad aparente de la materia seca, proteína cruda y aminoácidos en comparación con sus contrapartes (Jannathulla *et al.*, 2018), por otra parte, se ha descrito que cuando no se aplica un tratamiento de esterilización posterior a la fermentación, se presenta un recuento intestinal de microorganismos significativamente mayor (Hamidoghli *et al.*, 2020). Otras alternativas para mejorar el contenido nutricional en los cultivos, es la adición de fuentes fermentadas ricas en nutrientes y el empleo de desechos orgánicos fermentados para generar proteína microbiana de alto valor. Liñan-Vidriales *et al.* (2021) emplearon salvado de arroz fermentado con consorcios microbianos, debido a su composición equilibrada de aminoácidos, pero implementando como fuente de carbono para el desarrollo de biofloc en cultivos de camarón. Kang *et al.* (2010) emplearon los desechos orgánicos de papaya como sustrato para el crecimiento de levaduras e incorporaron la proteína microbiana a alimento de camarones, reportando la inclusión de un 50% del fermentado al alimento, con relación a una dieta con contenido proteico del 35%.

2.3.2 Beneficios de los alimentos fermentados en el cultivo de camarón

Los beneficios de los alimentos fermentados en el cultivo de camarón son de carácter 1. económico-ambiental, 2. nutricional, 3. productivo y de 4. salud. En el primer punto, estos alimentos permiten el reemplazo total de la harina de pescado en los alimentos (McLean *et al.*, 2020) y el aprovechamiento de desechos orgánicos (McLean *et al.*, 2020; Kang *et al.*, 2010). Nutricionalmente se presenta un mejoramiento de la calidad nutricional de la fuente proteica y del perfil de aminoácidos libres, incremento del contenido de aminoácidos esenciales, reducción de antinutrientes y de la fracción de fibra (Shiu *et al.*, 2013; Jannathulla *et al.*, 2017). Productivamente, permiten el mantenimiento o mejoras en el peso corporal, crecimiento, FCA y tasa de supervivencia, comparado con alimentos con harina de pescado (Hamidoghli *et al.*, 2020; Jannathulla *et al.*, 2018). Por último, permiten el mejoramiento del estado nutricional de los organismos (Liñan-Vidriales *et al.*, 2021), mejoran el ambiente microecológico intestinal, incrementa la actividad de enzimas antioxidantes y digestivas (Zhang *et al.*, 2021) además de

mejorar la tasa de supervivencia ante patógenos como *Vibrio parahaemolyticus* (Hamidoghli *et al.*, 2020; Cheng *et al.*, 2017).

2.4 El microbioma del camarón

El microbioma de un organismo puede definirse como la microbiota que ocupa un hábitat razonablemente definido bio-físico-químicamente en un hospedero, involucrando su actividad y potencial metabólico, lo que da como resultado la formación de nichos ecológicos específicos en la interacción hospedero-microbiota, (Buford, 2017; Prescott, 2017; Schroeder y Bäckhed, 2016; Whipps *et al.*, 1988). Se reporta que el microbioma desempeña un papel importante en el desarrollo y la fisiología de su huésped, previniendo el crecimiento de bacterias patógenas, modulando la respuesta inmune, afectando la absorción de nutrientes, regulando los procesos metabólicos y sintetizando vitaminas (Panigrahi *et al.*, 2018; Buford, 2017; Martínez-Porchas y Vargas-Albores, 2017; Ortiz-Estrada *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2017; Cornejo-Granados *et al.*, 2017). Investigaciones enfocadas en el estudio del microbioma del camarón, reportan algunos factores que afectan su composición y en consecuencia su funcionalidad. Cornejo-Granados *et al.* (2017) reportan que: 1. La microbiota de camarones de vida libre y de cultivo son diferentes, y la predicción de sus respectivas funciones metabólicas también es diferente, 2. Independientemente de si los camarones provienen de cultivo o vida libre, la microbiota de sus hepatopáncreas e intestino es diferente, 3. En el desarrollo temprano de la enfermedad de necrosis hepatopancreática existen cambios en el microbioma intestinal de los camarones y la aparición de bacterias específicas. Zeng *et al.* (2017) investigaron la microbiota intestinal del camarón en diferentes etapas de cultivo (de estado larval a adultos), reportando que su composición, diversidad y función varía significativamente en las diferentes etapas. Duan *et al.* (2018) estudiaron el efecto de la suplementación de *Clostridium butyricum* (CB) en la dieta de camarones, en diferentes concentraciones, reportando que esto provoca cambios en el microbioma intestinal de los organismos, enriqueciendo las Proteobacterias en el tratamiento con mayor concentración de CB y los Bacteroidetes en el resto de tratamientos con CB, además, se enriqueció el filo de los Firmicutes y los géneros de bacterias benéficas en todos los tratamientos con CB, lo cual, pudo contribuir al incremento en la expresión de genes de enzimas digestivas y del sistema inmune en el camarón, como lo reportan. Landsman *et al.* (2019)

estudiaron el efecto de la línea genética (resistente a enfermedades y de rápido crecimiento) en conjunto con la suplementación de probióticos en sistemas acuícolas, reportando que no se presentan diferencias estadísticas en el rendimiento ni en la salud de los organismos por efecto de la línea genética ni por el tratamiento con probiótico, sin embargo, se presentaron diferencias en la composición bacteriana intestinal entre líneas genéticas con y sin adición de probiótico, principalmente en la abundancia relativa de cinco unidades taxonómicas operativas, por lo cual, los autores sugieren que el trasfondo genético del huésped puede influir en la composición bacteriana intestinal; los probióticos empleados en los tratamientos se encontraron en muy poca abundancia o fueron indetectables en el intestino de los camarones, lo que sugiere que no colonizaron eficientemente el intestino, sin embargo, su presencia o ausencia impactó en el desarrollo de las comunidades bacterianas intestinales. Fan et al. (2019) evaluaron el efecto de dietas con diferente fuente de nitrógeno (harina de pescado/salvado de maní o harina de Krill/fertilizante Nutrilite) sobre la microbiota intestinal de camarones durante su crecimiento, reportando que la dieta con harina de krill no cambió significativamente la microbiota intestinal en comparación con el tratamiento con harina de pescado, sin embargo, entre las semanas 6 y 7 se observaron fluctuaciones en la microbiota de camarones alimentados con la dieta de harina de krill, lo cual, coincidió con el aumento de peso corporal de los organismos; en este periodo los grupos *Prevotella* y *Bifidobacterium* fueron más abundantes en el tratamiento con harina de krill, mientras que la abundancia de *Rhodobacteraceae*, *Flavobacteriaceae* y *Vibrionaceae* fue significativamente mayor en el tratamiento con harina de pescado; estos resultados sugieren que la microbiota intestinal puede estar correlacionada con el peso corporal de los camarones, probablemente al influir en la absorción de nutrientes en el intestino.

Las investigaciones reportan que diversas condiciones en el manejo de los sistemas BFT producen cambios en las comunidades bacterianas del biofloc y afectan la microbiota intestinal del camarón (Deng et al., 2019; Liu et al., 2019; Vargas-Albores et al., 2019) por lo tanto, algunos de los beneficios reportados en estos sistemas, pueden estar ligados a cambios en el microbioma intestinal como lo es el crecimiento de los organismos. La información generada sobre el microbioma del camarón hasta el momento, se ha obtenido empleando la secuenciación de amplicones y de alto rendimiento (Duan et al., 2018), y en conjunto con herramientas

bioinformáticas han permitido conocer el perfil de las comunidades bacterianas hasta nivel de género e inferir sus propiedades funcionales, sin embargo, empleando la secuenciación shotgun y las herramientas bioinformáticas actuales y afines a esta tecnología, podemos estudiar el microbioma describiendo su composición hasta nivel de especie y conocer su perfil funcional, lo cual puede permitir una mayor comprensión de sus funciones en el hospedero (Gutierrez-Perez *et al.*, 2022; Panigrahi *et al.*, 2018; Vargas-Albores *et al.*, 2019; Ortiz-Estrada *et al.*, 2019).

2.5 Teoría ecológica en la acuicultura de camarón

Las altas densidades en los sistemas de cultivo y el aumento de residuos causado por los mismos, ha favorecido el brote de enfermedades y un incremento de desechos descargados al ambiente (Prangnell *et al.*, 2019). Las estrategias que se han seguido para evitar estas problemáticas son altas tasas de recambio de agua y tratamientos indiscriminados de desinfección del agua con lo cual, también elimina/afecta la microbiota benéfica dentro de los sistemas acuícolas y dentro de los sistemas digestivos de los organismos (Xiong *et al.*, 2016), generando nichos con elevada disponibilidad de nutrientes, con cierta homogeneidad, los cuales son aprovechados por microorganismos oportunistas de rápido crecimiento como los patógenos. Para prevenir esto y favorecer el desarrollo de los organismos, se ha planteado el desarrollo de sistemas de cultivo que se rijan bajo la teoría ecológica de los estrategas r/K. Esta teoría parte de la premisa que la presión selectiva favorece la selección de microorganismos en dos direcciones generalizadas basadas en las estrategias de crecimiento; las especies seleccionadas “r” presentan altas tasas de crecimiento pero carecen de capacidad competitiva y de especialización, lo cual le permite colonizar entornos no explotados con alta disponibilidad de recursos por bacteria, mientras que las especies seleccionadas “K” son especialistas competitivos con alta afinidad por los recursos lo cual los hace exitosas en ambientes con densidades bacterianas cercanas a la capacidad de carga (Schryver y Vadstein, 2014). Por estas características las especies seleccionadas “r” son generalmente catalogadas como oportunistas y la mayoría de los patógenos se caracterizan como estrategas “r”. Vadstein *et al.* (2018) mencionan que la selección de estrategias “K” en un sistema acuícola se puede lograr asegurando una competencia persistente en el sistema, ya sea manteniendo una alta densidad bacteriana, un bajo suministro de recursos por bacteria y/o reduciendo el suministro de recursos. Por otra parte, es necesario que las estrategias para la

selección de estrategias “K” tengan coherencia ecológica en los niveles taxonómicos superiores (ej. Phylum) con los del ambiente natural del organismo, y que sea acorde a su biogeografía (Philippot *et al.*, 2010), lo cual implica que para cultivar juveniles de camarón, debemos considerar que en este estadio ontológico se desarrollan en sistemas estuarinos y tienen un estilo de vida bentónico (Fischer *et al.*, 1995), y en este ambiente las Alpha-proteobacterias son la clase taxonómica dominante (>30%) (Bouvier y Giorgio, 2002) por lo cual las estrategias de selección de estrategias “K” deben considerar favorecer a este grupo en los cultivos.

2.6 Estabilidad de los sistemas biofloc

La estabilidad de las comunidades microbianas a lo largo del ciclo de cultivo es crucial en la acuicultura, desempeñando un papel fundamental en la prevención de enfermedades y la reducción de pérdidas de producción (Cardona *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2023; Xiong *et al.*, 2015). Identificar los factores que afectan el microbioma en los sistemas de biofloc es esencial para lograr un control y una predicción precisa en estos entornos (Copetti *et al.*, 2021; Pimentel *et al.*, 2023). Los factores estudiados incluyen fuentes de carbono, condiciones ambientales, la relación C/N y las especies de organismos cultivados (Copetti *et al.*, 2021; Khanjani *et al.*, 2022; Martínez-Córdova *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2016). A lo largo de los ciclos de cultivo, estas variables experimentan cambios, a pesar de las tecnologías implementadas para mantener la estabilidad (Emerenciano *et al.*, 2013). No existe una definición clara de la “estabilidad de la comunidad microbiana” en los sistemas de biofloc, pero para comprender, monitorear y promover lo que llamamos estabilidad en los sistemas biofloc, se han implementado dos enfoques: 1. Funcionalidad: Este enfoque se basa en monitorear compuestos orgánicos nitrogenados y establece que un sistema es estable (maduro) cuando han ocurrido picos de nitrógeno total de amoníaco y nitritos (Krummenauer *et al.*, 2020; Meng *et al.*, 2023; Ray y Lotz, 2014; Xu *et al.*, 2016), típicamente alrededor de 30 a 50 días (Chen *et al.*, 2023; Emerenciano *et al.*, 2017); 2. Composición: En este enfoque, el objetivo es identificar y describir la composición de la comunidad microbiana dentro del biofloc. Esto implica descripciones taxonómicas y el análisis de abundancias relativas (Cardona *et al.*, 2016; Emerenciano *et al.*, 2017; Huerta-Rábago *et al.*, 2019; Rajeev *et al.*, 2023). Las comunidades se pueden identificar como r o K (Chen *et al.*, 2023, Vadstein *et al.*, 2018). Ambos enfoques proporcionan aproximaciones para comprender la estabilidad,

pero es importante tener en cuenta que no implican una ausencia de cambios en las comunidades microbianas.

El dinamismo de los sistemas de acuicultura, influenciado por factores estacionales y ambientales, conduce a cambios en la comunidad microbiana. Estos cambios resultan en un estado fluctuante dentro de la estructura y composición de la comunidad microbiana (Prosser *et al.*, 2007). Para obtener ideas directas sobre las covariables causales de la dinámica de la comunidad microbiana, son necesarios estudios longitudinales en lugar de estudios transversales (Chen *et al.*, 2017; Quince *et al.*, 2017; Rungrasamee *et al.*, 2016). La comunidad bacteriana se considera el factor más importante para el sistema de biofloc (Cardona *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2021). La investigación indica consistentemente que un aumento en la diversidad y riqueza microbiana de los sistemas de biofloc contribuye a la estabilidad a lo largo del cultivo (Chen *et al.*, 2023; Huang *et al.*, 2021; Huerta-Rábago *et al.*, 2019; Khanjani *et al.*, 2022; Rajeev *et al.*, 2023). Por lo tanto, realizar estudios de los sistemas, con enfoques en la diversidad alfa y beta, podría proporcionar aún más claridad sobre la estabilidad de la comunidad microbiana en los sistemas de biofloc, lo que ayudaría a mejorar nuestra comprensión de este fenómeno y a guiar futuras investigaciones en este campo.

2.7 La metagenómica como enfoque molecular para el análisis de comunidades microbianas

En la acuicultura, el estudio de la microbiota en los sistemas de cultivo inició con la recuperación de microorganismos que pueden cultivarse en condiciones de laboratorio, sin embargo, el 98-99% de las bacterias del ambiente y del tracto digestivo de los organismos acuáticos no se han podido cultivar (Rappé y Giovannoni, 2003; Lewis *et al.*, 2010) por lo cual, los cultivos microbiológicos no permiten obtener resultados representativos de la diversidad microbiana. Los principales métodos adoptados en la acuicultura para el estudio de la diversidad microbiana son “la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante” con PCR (PCR-DGGE) (Hu *et al.*, 2019), secuenciación de amplicones, y secuenciación de alto rendimiento (Duan *et al.*, 2018). Las primeras dos tecnologías presentan la limitante de proporcionar perfiles taxonómicos de baja resolución por el número limitado de secuencias que se pueden procesar, lo cual no permite calcular adecuadamente la diversidad alfa y beta de las muestras (Ortiz-Estrada *et al.*, 2019), y en

el caso de la técnica DGGE se pueden presentar firmas multibanda por un solo microorganismo, lo cual hace que el patrón de bandeo no tenga correlación con la diversidad alfa (Neilson *et al.*, 2013). El empleo de la secuenciación de alto rendimiento en conjunto con herramientas bioinformáticas ha permitido recuperar el perfil taxonómico de la comunidad microbiana hasta el nivel de género e inferir las propiedades funcionales que presentan las comunidades microbianas, sin embargo, una de las limitantes de esta tecnología es que un solo microorganismo presenta múltiples copias del gen 16S ARNr y este gen puede ser casi idéntico entre especies (Ortiz-Estrada *et al.*, 2018), lo cual puede provocar errores en la estimación de las composiciones bacterianas. Sin embargo, con la tecnología de secuenciación Shotgun podemos superar estas limitantes y obtener información detallada del potencial metabólico y la composición de las comunidades microbianas hasta el nivel taxonómico de especie, lo cual nos puede permitir comprender las funciones de la microbiota asociada a los sistemas de cultivo (Koslicki *et al.*, 2014).

2.8 El “holobioma del sistema acuícola”

Para mejorar la producción de camarones mediante una gestión microbiana efectiva, es esencial adoptar una visión holística del sistema de acuicultura, integrando todos sus elementos bajo el concepto de "holobioma". Con este enfoque buscamos reconocer que cada componente del sistema, desde el plancton hasta el sedimento, influye en los microbiomas que interactúan en él. Estos microbiomas, a su vez, afectan la estabilidad de la comunidad microbiana, la ecoeficiencia, y la producción de las especies cultivadas. Por lo tanto, es crucial entender cómo estos microbiomas se relacionan entre sí y con el entorno en constante cambio.

Para nuestros fines definiremos el concepto de “holobioma del sistema acuícola” como los microbiomas que interactúan en un sistema de cultivo: el microbioma planctónico, el microbioma del sedimento, el microbioma del alimento y el microbioma del huésped, que a su vez son afectadas por los factores endógenos y exógenos del sistema (Fig. 4). Para estudiar el holobioma, se requiere un diseño experimental integral que considere la recuperación de los microbiomas representativos de cada componente, junto con metadatos relevantes sobre las condiciones ambientales. A través de este enfoque, se pueden identificar los componentes del sistema cuyos

microbiomas tienen una influencia significativa en la “estabilidad de la comunidad microbiana” del sistema y en el microbioma intestinal de los camarones cultivados.

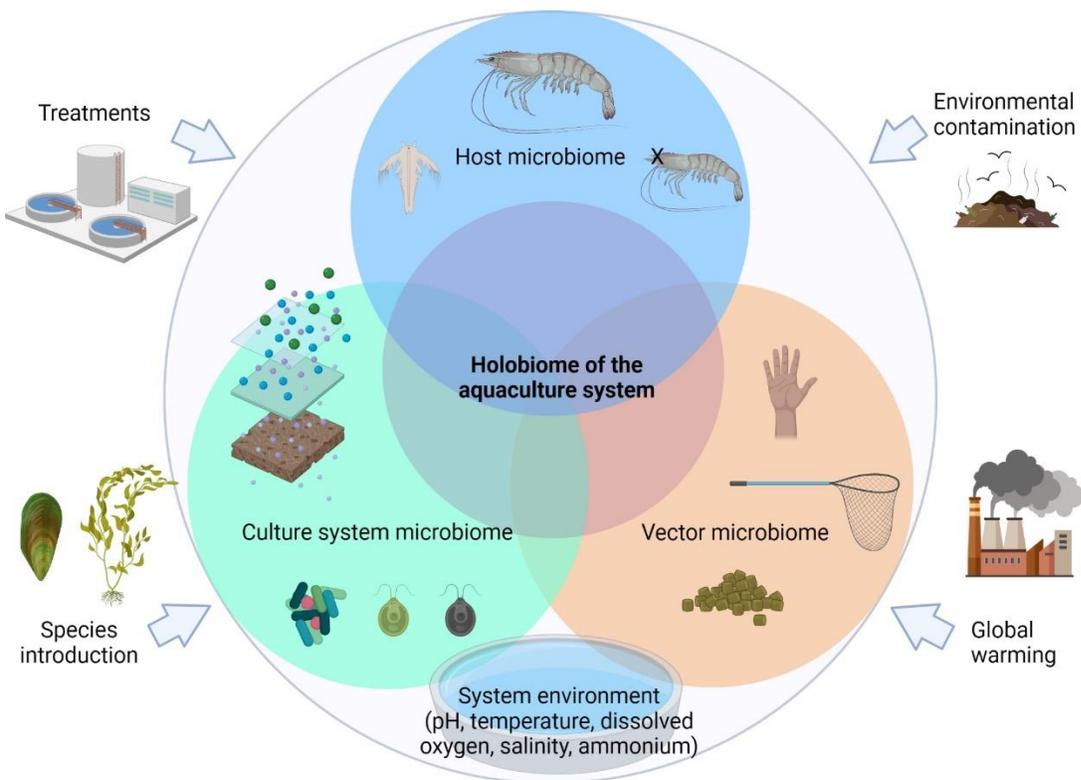


Figura 4. Componentes del "holobioma del sistema acuícola". El "microbioma del sistema de cultivo" implica el microbioma planctónico, el microbioma del sedimento y el microbioma del biofloc; en el "microbioma del huésped" pueden incluirse el microbioma de la piel, el hepatopáncreas y el intestino medio, entre otros; los "microbioma vectores" involucran aquellos componentes que pueden introducir activamente microbiomas exóticos (Gutierrez-Perez *et al.*, 2022).

2.8.1 El “holobioma del sistema acuícola” y su relación con la intensificación, la bioseguridad y la ecoeficiencia de los cultivos

Un buen ejemplo de cómo diferentes partes del sistema tendrán un efecto en el holobioma es el hecho de que la microbiota de los bioflocs se ve afectada no solo por la densidad de población (número de camarones por m²) y el tipo de sistema de biofloc, sino también por la relación C/N. A baja densidad de cultivo (~25-200 camarones•m⁻²), la composición de las comunidades microbianas en el agua afecta pobremente a las comunidades intestinales y sus perfiles metabólicos (Xiong *et al.*, 2015; Cardona *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2018). Sin embargo, al aumentar la densidad (400 m⁻², 600 m⁻² y 800 m⁻²), es posible

afectar la comunidad microbiana del biofloc, lo que podría incidir en su funcionalidad. A su vez, la composición microbiana en los bioflocs podría modificar significativamente el microbioma intestinal de los camarones (Deng *et al.*, 2019). En condiciones de biofloc, Hou *et al.* (2018) reportan que la biota bacteriana intestinal de los camarones comparte la misma composición con la de la columna de agua y el sedimento, pero con proporciones de taxones diferentes. Guo *et al.* (2020) investigaron el impacto de diferentes relaciones C/N, demostrando que las relaciones C/N de 15:1 alteraron la estructura microbiana del intestino, mientras que el volumen de biofloc también aumentó debido al estímulo de carbono de la biomasa microbiana, lo que resultó en un incremento significativo en la abundancia relativa de bacterias beneficiosas, el tamaño de los camarones y la biomasa. Otros factores que también pueden modificar la estructura del microbioma del sistema bajo BFT son el uso de moléculas potenciadoras/inhedoras de la agregación microbiana (Fatimah *et al.*, 2019), la adición de consorcios microbianos a los sistemas de cultivo (Hostins *et al.*, 2017; Huerta-Rábago *et al.*, 2019), diferentes fuentes de carbono y relaciones C/N para el desarrollo del biofloc (Liu *et al.*, 2019; Wei *et al.*, 2020), y diferentes nucleadores de biofloc (Vargas-Albores *et al.*, 2019).

La perspectiva del 'holobioma del sistema acuícola' puede contribuir significativamente a una comprensión más profunda de la dinámica ecológica de las enfermedades, desde los agentes causales hasta los factores de virulencia que estos poseen. Investigaciones recientes han evidenciado que algunas enfermedades surgen como resultado de interacciones entre patógenos de múltiples especies o cepas (Peters *et al.*, 2012; Dai *et al.*, 2018; Yao *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2020b). Además, se ha detectado una variedad de genes de resistencia a antibióticos en el agua, el sedimento y los intestinos de camarones en sistemas acuícolas (Zhao *et al.*, 2018). Esta situación no solo representa un riesgo sanitario, sino también un desafío para el uso efectivo de antibióticos permitidos en la acuicultura, así como el surgimiento de nuevas enfermedades. Dado que la acuicultura depende del agua proveniente de ríos, estuarios o áreas costeras, es especialmente susceptible a la contaminación externa con genes de resistencia a antibióticos y a la presencia de antibióticos liberados al ambiente como resultado de actividades antropogénicas (Pomeroy *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2018).

La industria ha realizado grandes esfuerzos para reducir desperdicios como aguas residuales y alimentos con el fin de lograr la sostenibilidad. El holobioma funciona como un supermetabolismo que va más allá de las especies objetivo de cultivo. Por lo tanto, el uso de alimentos adecuados no solo podría proporcionar nutrición a los camarones, sino que también podría afectar a ciertos grupos que mejorarán la ecoeficiencia, como los estrategas *K*, lo que es crucial. Un ejemplo de esto es la relación C:N; al cambiarla ya sea en el agua o en los alimentos, se afectan a los grupos microbianos representados en un sistema como se ha descrito anteriormente, ya que la materia orgánica se descompone dentro del sistema formando nuevos nichos nutricionales y permitiendo que diferentes grupos construyan una red ecológica compleja entre ellos, y como consecuencia, los flujos de nutrientes seguirán estos cambios. El proceso de fermentación de los alimentos puede reducir los insumos y los desperdicios en los cultivos (Kang *et al.*, 2010; Hamidoghli *et al.*, 2020) e incorpora dos componentes importantes que afectarán "el holobioma del sistema acuícola", el primero es una carga microbiana y el segundo son los subproductos derivados de la fermentación. Tales perturbaciones en los microbiomas del sistema de cultivo son inducidas por la generación de nichos a través de subproductos metabólicos o acumulación de compuestos antimicrobianos, afectando el reciclaje de nutrientes del sistema (Mazon-Suastegui *et al.*, 2020; He *et al.*, 2017; Qiao *et al.*, 2017; Stanton *et al.*, 2005). Hamidoghli *et al.* (2020) evaluaron la implementación de dietas con proteínas a base de fermentación y también la adición de consorcios microbianos para el tratamiento del agua, informando que los tratamientos con proteína de soja-gluten de maíz y proteína de soja concentrada, fermentados por *Bacillus subtilis* y con la adición de consorcios microbianos, presentaron una concentración significativamente menor de amoníaco y nitrito, en comparación con el control.

3. JUSTIFICACIÓN

Para mejorar la producción de camarones mediante una gestión microbiana efectiva, es esencial adoptar una visión holística del sistema de acuicultura, integrando todos sus elementos bajo el concepto de "holobioma". Con este enfoque buscamos reconocer que cada componente del sistema influye en los microbiomas que interactúan en él, sobre todo en sistemas de producción comerciales. Estos microbiomas, a su vez, afectan la estabilidad de la comunidad microbiana, la ecoeficiencia y la producción de las especies cultivadas. Al relacionar el comportamiento de las comunidades microbianas con los conceptos de estrategias r/K , se espera obtener una visión más completa y detallada de la dinámica de estos ecosistemas acuáticos. Además, la validación de un enfoque analítico de la estabilidad microbiológica, basado en la diversidad alfa y beta, contribuirá al desarrollo de herramientas efectivas para monitorear y gestionar la salud de los sistemas acuícolas, promoviendo así prácticas más sostenibles y productivas en la industria acuícola. La integración de la validación de este enfoque en el estudio del holobioma permitirá una comprensión más profunda de cómo las interacciones microbianas dentro de los sistemas acuícolas impactan en la salud y el rendimiento de los cultivos de camarón, facilitando así una gestión más efectiva y sostenible de estos sistemas.

4. HIPÓTESIS

Si se implementa un enfoque integrado que considere la diversidad microbiana (alfa y beta) en los sistemas de cultivo biofloc y su interacción con los factores ambientales, se espera se puedan identificar estrategias más efectivas para promover la estabilidad de la comunidad microbiana y comprender mejor las dinámicas de los microbiomas en el contexto holobiótico, lo que contribuirá a mejorar la gestión sostenible de la producción de camarón.

5. OBJETIVO

5.1 Objetivo general

Determinar el impacto de un enfoque holobiómico, que considera la diversidad microbiana (alfa y beta) y su interacción con los factores ambientales, en la gestión sostenible de la producción de camarón en sistemas acuícolas de cultivo biofloc.

5.2 Objetivos particulares

1. Verificar la validez del enfoque analítico de la estabilidad microbiológica de los sistemas biofloc, basado en métricas de diversidad alfa y beta, mediante el análisis longitudinal de librerías de datos (amplicones del 16S ARNr) provenientes de cultivos de camarón con diferentes sistemas biofloc.
2. Relacionar el comportamiento de los taxones en los sistemas acuícolas utilizando el marco conceptual de estrategias r/K, con el fin de identificar patrones y relaciones que contribuyan a una gestión más eficaz y sostenible de la producción acuícola.
3. Determinar cómo la aplicación de un enfoque holobiómico, con énfasis en la estabilidad de la comunidad microbiológica, puede mejorar la ecoeficiencia, la bioseguridad y la producción de camarón en sistemas acuícolas de cultivo biofloc. Esto se logrará mediante el análisis del holobioma del sistema productivo de postlarvas de una empresa.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Estudio longitudinal de la estabilidad microbiológica de sistemas biofloc (CIBNOR)

Las secciones 6.1.1 a la 6.1.3 forman parte de un proyecto realizado previamente en el año 2018 por la Dra. Paola Magallón Servín y el grupo de trabajo del laboratorio de microbiología ambiental, en el cual evaluaron diferentes consorcios microbianos desarrollados en CIBNOR, para generar sistemas biofloc para el cultivo de camarón. De este proyecto se obtuvieron librerías de datos (amplicones del 16S ARNr) provenientes de cuatro cultivos de camarón con diferentes sistemas biofloc. En el presente estudio, se utilizaron estos datos para verificar la validez del enfoque analítico de la estabilidad microbiológica de los sistemas biofloc, basado en métricas de diversidad, mediante un estudio longitudinal.

6.1.1 Condiciones experimentales

Los sistemas se establecieron en CIBNOR (24° 8' 9" N · 110° 25' 32" W) en invernadero, en tanques de polietileno de alta densidad de 1 m³ (superficie bentónica de 1 m²). Cada tanque se llenó con 1 m³ de agua de mar y se implementaron cuatro tratamientos biofloc mediante la inoculación de tres consorcios microbianos distintos. Los tratamientos fueron los siguientes: A. Probiótico Heterotrófico, B. Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C. Probiótico Quimiotrófico, D. Maduración tradicional sin probiótico específico. Una semana antes de introducir los camarones en los sistemas, se inoculó diariamente durante 3 días los tratamientos B y C. Posteriormente, los 3 inóculos fueron suministrados semanalmente a los tanques correspondientes durante el bioensayo. El bioensayo tuvo una duración de 109 días y se dividió en 3 fases: Fase 1 inició con una densidad de 1500 PL•m⁻² (Siembra de PL de camarón (*L. vannamei*) con peso promedio de 0.04 gr) y duró del día 8 al 42; la Fase 2 ajustó la densidad a 750 PL•m⁻² y duró del día 42 al 77; finalmente, la Fase 3 ajustó la densidad a 325 PL•m⁻² y se extendió del día 80 al 109. La finalidad de las fases fue evitar la competencia por alimento, mejorar la calidad del agua, prevenir el estrés y la mortalidad. Cada tratamiento constó de 4 réplicas, las condiciones del agua de cultivo se mantuvieron en 25-28°C, pH 7.8, 38 UPS, 5.0 mg•L⁻¹ O₂, 2 mL•L⁻¹ de biofloc (medido mediante cono Imhoff), y relación C/N= 20 empleando melaza. Se realizaron muestreos periódicos del agua de cultivo (1L), inicialmente cada día durante los primeros 7 días para los tratamientos B y C, y

una vez sembrados los organismos, se tomaron muestras una vez cada 7 días para todos los tratamientos.

6.1.2 Metadatos

La temperatura del agua, el pH, la salinidad y el oxígeno disuelto se registraron in situ con una sonda multiparamétrica YSI 556 (YSI Inc., Yellow Springs, EE. UU.) a una profundidad de 50 cm. Los niveles de amonio (NH_4^+) se midieron mediante el método Hach 8155 (Ray y Lotz 2014). El volumen del floc se midió utilizando conos Imhoff de 1 L (Modelo 1056, ASONE, Japón) (Meng *et al.*, 2023). El volumen del floculante en 1 L de agua acumulado en el fondo del cono se determinó después del muestreo y al transcurrir 30 minutos (Schweitzer *et al.*, 2020).

6.1.3 Extracción de ADN y secuenciación

En los días de muestreo, aproximadamente 1 L de agua fue prefiltrada a través de malla de nylon (tamaño de poro de 100 μm) y posteriormente filtrada en una membrana de 0,2 μm (Millipore, Boston, MA, EE. UU.) para recoger la biomasa microbiana planctónica (Xiong *et al.*, 2015). Se utilizó el método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) para extraer el ADN de los filtros (Chen *et al.*, 2023). La concentración y pureza (A260/280, A260/230) del ADN se evaluaron con un espectrofotómetro NanoDrop 2000[®] (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EE. UU.), y el ADN se diluyó con agua ultrapura a 1 ng/ μL . La amplificación y secuenciación fue realizada por CIAD, A.C. Se amplificó la región V3 del gen 16S ARNr empleando los primers 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') y 533R (5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3') (García-López *et al.*, 2020). El secuenciamiento fue por extremos emparejados empleando la plataforma MiSeq de Illumina para obtener amplicones de ~190pb.

6.1.4 Análisis de datos

Se procesan y analizan los datos de secuenciación Illumina utilizando el paquete de software QIIME2 (v2020.8.0). Inicialmente, se evalúa la calidad y la profundidad de las secuencias demultiplexadas. Posteriormente, se aplica DADA2 (Callahan *et al.*, 2016) para filtrar aquellas con Phred \geq Q20, eliminando ruido, dereplicando y removiendo quimeras, lo que permite reconstruir

los amplicones originales a partir de las regiones sobrelapadas de las lecturas pareadas. Con el propósito de considerar la estructura evolutiva inherente a los datos en las métricas de diversidad, se genera un árbol filogenético empleando 'iqtree' y 'alineamiento mafft'. Utilizando la función 'diversity' con una profundidad de muestreo de 1357 secuencias, se calculan las métricas de diversidad alfa de Faith y Pielou (Xia y Sun, 2023a). Con el complemento "longitudinal volatility", se realiza un análisis longitudinal de la diversidad alfa para observar las fluctuaciones en la estructura filogenética y la equitabilidad de las comunidades microbiana (Bokulich *et al.*, 2018). Para estimar las diferencias entre muestras (diversidad beta), se utiliza la 'distancia UniFrac no ponderada'. Esta medida considera la historia evolutiva compartida entre los microorganismos al calcular la similitud entre las comunidades. Además, se generan visualizaciones de Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) con la 'distancia UniFrac no ponderada' mediante Emperor (Vázquez-Baeza *et al.*, 2013). Con el complemento "longitudinal volatility", se realiza un análisis longitudinal basado en PCoA para observar patrones de variación en la estructura de la comunidad microbiana a lo largo de los ejes de coordenadas principales (Bokulich *et al.*, 2018). Para examinar la composición taxonómica de las muestras, se emplea el complemento Vsearch (Rognes *et al.*, 2016) para clasificar taxonómicamente los ASVs utilizando la base de datos SILVA versión 138 (Pruesse *et al.*, 2007), con un consenso mínimo de 0.7. Se filtran las muestras que contienen menos características que la profundidad de muestreo y se construye un gráfico de barras de taxonomía mediante el complemento "taxa barplot".

6.1.5 Análisis estadístico

Se evalúa la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y un nivel de significancia igual a 0.05 empleando el software R. Los análisis posteriores se realizan con QIIME2 (v2020.8.0) y se estableció un nivel de significancia de 0.05 para todas las pruebas estadísticas llevadas a cabo en el análisis. Se aplica una prueba de Kruskal-Wallis para evaluar diferencias en los índices de diversidad alfa (Faith y Pielou) en muestras agrupadas por distintas variables: Fase, Mes, Días de cultivo, pH, Floc, Tratamiento, Replicas, Oxígeno, Temperatura, Salinidad, Amonio y NH₃. Luego, se examina el impacto de estas variables sobre las métricas de diversidad alfa mediante análisis de correlación de Spearman. Posteriormente, se lleva a cabo un análisis de abundancia diferencial (ANCOM) (Estaki *et al.*, 2020) a nivel de clase y de características (ASVs)

para detectar diferencias significativas en los datos agrupados por "Fase" y "Tratamiento", explorando así relaciones con la teoría ecológica de estrategias r/K y la identificación de microorganismos relevantes. Se realiza un análisis de volatilidad de características (a nivel de Clase y ASVs) empleando el complemento "longitudinal feature-volatility" (Borsom *et al.*, 2023), generando un modelo de regresión para analizar la variación temporal de cada característica y determinar su consistencia a lo largo del tiempo. Las pruebas de diversidad beta incluyen PERMANOVA con 4000 permutaciones para detectar diferencias significativas en 'UniFrac no ponderado' entre categorías, seguido por PERMDISP con 4000 permutaciones para evaluar la dispersión dentro de grupos. Se emplea la acción ADONIS utilizando la matriz de distancias 'UniFrac no ponderado' para llevar a cabo una prueba PERMANOVA con los datos agrupados por 'Mes' y 'Tratamiento'. Esta prueba crea un modelo multivariado para evaluar su nivel de efecto en la estructura de la comunidad microbiana. Finalmente, se aplica un modelo de efectos mixtos lineales (LME) (Xia y Sun, 2023b) utilizando las distancias 'UniFrac no ponderado' para generar un modelo de correlación entre las fases/tratamientos y la estructura de las comunidades microbianas a lo largo del tiempo, así como su significancia estadística.

6.2 Estudio en el sistema de producción de postlarvas de camarón (Empresa de larvicultura en Sinaloa)

6.2.1 Diagrama del sistema productivo

Por cuestiones de confidencialidad el nombre de la empresa no será mencionado. A través de una interacción con la empresa y en un convenio de confidencialidad, se generó un estudio de FODA/DAFO (Leigh, 2009) para determinar las debilidades, fortalezas, oportunidades y amenazas que presenta una empresa de larvas de camarón blanco del Pacífico con respecto al manejo de la bioseguridad. Este análisis se basó exclusivamente en las variables que la empresa utiliza para el seguimiento de sus protocolos de bioseguridad y se realizó de esta forma con el objetivo de permitir que la empresa y el sector acuícola de camarón puedan realizar sus propios análisis FODA/DAFO utilizando las variables ya incorporadas en sus protocolos. Para ello, se realizó una estancia *in situ* por 20 días y se programaron 10 visitas (una por semana) subsecuentes, con el fin de hacer un levantamiento de todas las etapas productivas desde la perspectiva de la ecología

microbiana. Durante las visitas se hicieron entrevistas individuales a los técnicos responsables con la metodología de investigación-acción participativa (uno a uno) (Zapata y Rondán, 2016).

El sistema productivo de esta empresa se organiza en módulos consecutivos de la siguiente manera (Fig. 5): 1. Maduración (reproductores), 2. Desinfección de Nauplios, 3. Larvario, 4. RW (módulo Raceway), y 5. Pre-engorda.

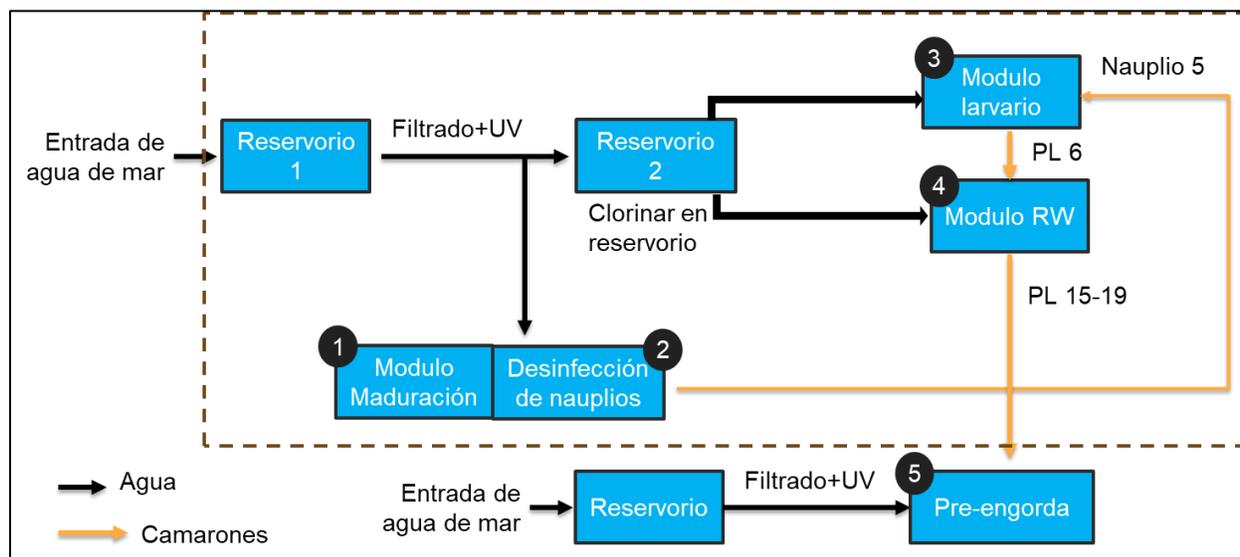


Figura 5. Esquema general de los módulos del sistema productivo de la empresa de larvicultura.

Los módulos 1, 2 y 5 utilizan agua de mar filtrada y desinfectada con luz ultravioleta (UV), mientras que los módulos 3 y 4, adicionalmente, aplican clorinación al agua antes de su uso. La empresa gestiona diversas líneas genéticas de camarón blanco, identificadas en este estudio como Nicaragüense, Ecuatoriana y Texana. Se obtienen nauplios de cada línea de acuerdo con el estado de maduración de los reproductores. Como resultado, se siembran semanalmente líneas genéticas diferentes. En cuanto a los sistemas utilizados en el cultivo, el módulo de reproductores opera con un sistema de agua clara, el de larvario con un sistema biofloc fotoautotrófico-heterotrófico (inoculado con consorcios microbianos 3 días antes de la siembra), RW con un sistema biofloc heterotrófico (inoculado con consorcios microbianos 3 días antes de la siembra), y pre-engorda con un sistema biofloc quimiotrófico-heterotrófico (inoculado con consorcios microbianos 7 días antes de la siembra).

En el análisis DAFO se identificaron diversas amenazas que afectan la bioseguridad del sistema, lo cual tiene efectos directos sobre el holobioma del sistema acuícola. Durante este análisis se identificaron los procesos productivos y todas las entradas de agua en cada módulo, los reservorios de agua, cada proceso de desinfección del agua, el tipo de sistema empleado en cada módulo, así como la línea genética y el estado ontológico de los organismos. Con estas consideraciones, se decidió muestrear las fuentes de agua utilizadas, así como el agua y los organismos al inicio y al final de cada etapa (módulo) de producción para las tres líneas genéticas.

Debido a la ocurrencia de mortalidades en la producción durante las visitas, también se realizaron muestreos microbiológicos (análisis realizados durante las visitas por el personal de la empresa) de las pilas al inicio de los eventos de mortalidad, durante el tratamiento empleado y al final de los eventos de mortalidad, para buscar una relación con cambios en el holobioma del sistema acuícola y la estabilidad de las comunidades microbianas en los sistemas. Además de los análisis microbiológicos, se realizaron análisis de calidad de agua y productividad.

6.2.2 Análisis del agua de cultivo

Se monitorea diariamente la temperatura, el pH, la salinidad y el oxígeno disuelto del agua de cultivo empleando el instrumento multiparamétrico YSI 556 MPS (Fimbres-Acedo *et al.*, 2020). También se toman muestras del agua de los cultivos (1L) una vez por semana para determinar la concentración de amonio disuelto. Además, se toman muestras de agua de 50 mL para realizar análisis microbiológicos por métodos tradicionales. Se evalúa la cantidad de Vibrios (por el personal de la empresa) empleando los medios de cultivo “agar tiosulfato citrato bilis sacarosa” (TCBS) y CHROMagar™ Vibrio.

6.2.3 Determinación de amonio

Para determinar la cantidad de amonio en las muestras de agua se siguió el método 10031 del manual técnico de HACH para lo cual se emplea el espectrofotómetro DR 3900. Para preparar la muestra blanco se adiciona 0.1 mL de agua libre de amonio a un tubo AmVer™, se añade el contenido de una almohadilla en polvo de reactivo de salicilato de amoniaco al vial y

seguidamente se agrega el contenido de una almohadilla en polvo de reactivo de cianurato de amoníaco, se coloca la tapa en al vial y se agita para disolver el polvo, se deja reaccionar por 20 min y posteriormente se inserta el vial en el porta celdas para leer la absorbancia a 655 nm y poner en CERO la lectura. Para la preparación de la muestra problema se ajusta el pH a 7 utilizando una solución estándar de hidróxido de sodio 1 N para muestras ácidas o ácido clorhídrico 1 N para muestras básicas y se sigue el mismo procedimiento que en la muestra blanco, para finalmente obtener la lectura del espectrofotómetro. Los resultados se muestran en el equipo en mg / L.

6.2.4 Productividad del cultivo

Al inicio y al final de cada etapa del cultivo los camarones se cosechan y se cuentan para conocer la producción de cada etapa del cultivo. Con estos datos se calcula el porcentaje de supervivencia (E.1).

$$\text{Supervivencia (\%)} = \frac{\text{Recuento final de organismos vivos}}{\text{Número de organismos inicial}} \times 100 \quad (1)$$

6.2.5 Otros metadatos

Se capturan los metadatos que son relevantes para el estudio como lo son el método de desinfección de los organismos, línea genética, estadio y tratamiento en caso de pasar por algún evento de mortalidad. Así mismo se hicieron muestreos (agua y organismos) y extracción de ADN que se encuentra en proceso de análisis por parte de la empresa.

7. RESULTADOS

7.1 Estudio Longitudinal y Estabilidad de comunidades bacterianas asociadas a bioflocs por el perfil taxonómico del gen 16S ARNr (CIBNOR)

7.1.1 Procesamiento de las secuencias

Se obtuvo un total de 21,007,931 secuencias pareadas demultiplexadas en 323 muestras, de las cuales después del filtrado de calidad (Phred 20), la eliminación del ruido, el ensamble y la eliminación de secuencias quiméricas se obtuvo un total de 2,027,116 secuencias de amplicones reconstruidos no quiméricos en 290 muestras. Posteriormente las secuencias se agruparon en un total de 3756 ASVs con una longitud promedio de 182 pb.

7.1.2 Volatilidad de la diversidad alfa

El análisis de volatilidad del índice de Faith (Fig. 6) revela una variación en los valores, con rangos observados entre 8 y 20 para los cuatro tratamientos evaluados. Destaca que el tratamiento D (maduración tradicional sin probiótico específico) exhibe la menor variabilidad promedio en los valores del índice de Faith (8-16) y con oscilaciones menos pronunciadas, indicando una consistencia mayor en la diversidad taxonómica a través del tiempo. La aparente tendencia oscilante sugiere fluctuaciones dinámicas en la composición taxonómica para cada tratamiento durante el periodo de estudio.

En cuanto al análisis de volatilidad del índice de Pielou (Fig. 7), se revela un rango consistente de valores promedio entre 0.6 y 0.9 para los cuatro tratamientos evaluados. Además, se observa una tendencia similar en la variabilidad a lo largo del tiempo para estos tratamientos. Este patrón sugiere una estabilidad relativa en la diversidad taxonómica dentro de cada tratamiento, con fluctuaciones que no comprometen significativamente la equitabilidad de las comunidades microbianas a lo largo del periodo de estudio.

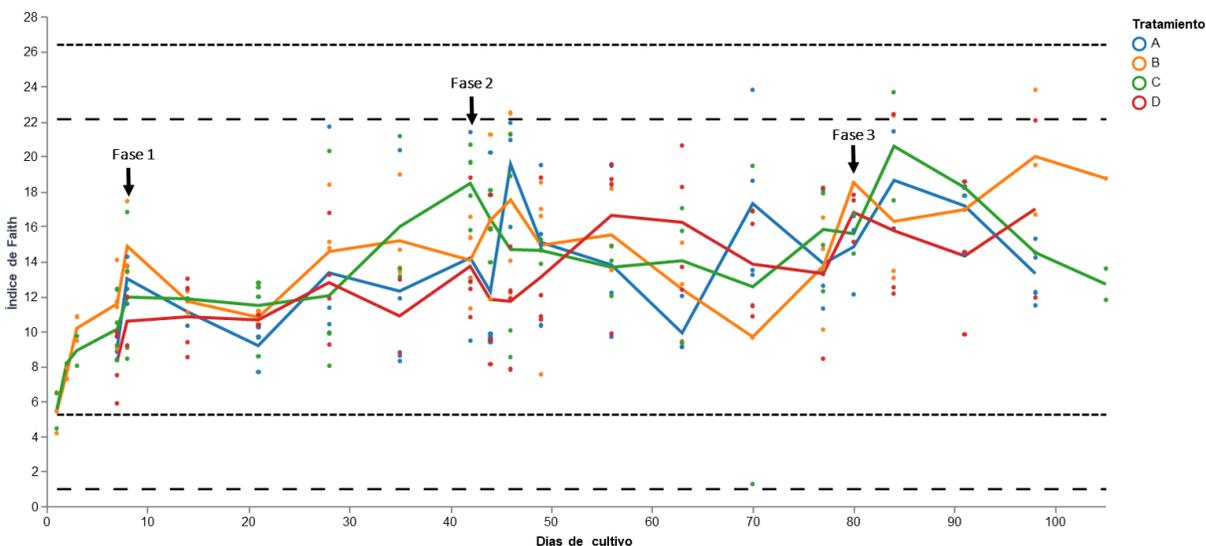


Figura 6. Análisis de volatilidad del índice de diversidad de Faith en cuatro tratamientos biofloc. A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Se señalan con flechas el inicio de cada fase del bioensayo. Los puntos en el gráfico representan la dispersión de los valores, las líneas continuas representan los valores promedio, las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar (+/- 2x y 3x) desde la media global.

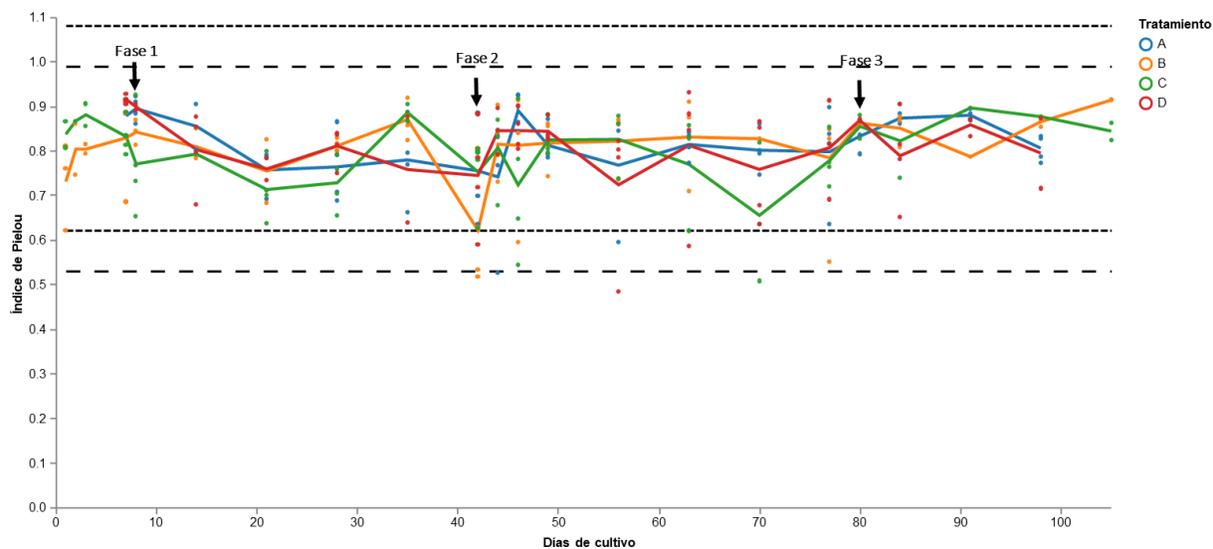


Figura 7. Análisis de volatilidad del índice de uniformidad de Pielou en cuatro tratamientos biofloc. A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Se señalan con flechas el inicio de cada fase del bioensayo. Los puntos en el gráfico representan la dispersión de los valores, las líneas continuas representan los valores promedio, las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar (+/- 2x y 3x) desde la media global.

7.1.3 Estadísticas de diversidad alfa

En el análisis de normalidad de la frecuencia de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk, se obtuvo que los datos no siguen una distribución normal ($W= 0.98725$, p-valor de 0.02458). Se calcularon las métricas de diversidad alfa de Faith y Pielou para las muestras. La prueba de Kruskal-Wallis reveló diferencias estadísticamente significativas entre los datos cuando se agruparon por fase, mes, días de cultivo, pH y Floc (Tabla 1; las variables que no mostraron significancia estadística no se presentan en la tabla).

Tabla 1. Categorías con diferencias significativas en la prueba de Kruskal-Wallis para diversas métricas de diversidad alfa

CATEGORÍA	Métrica diversidad (valor P)	
	Faith	Pielou
Fase	6.42E-10	0.011791086
Mes	1.50E-12	0.047813067
Días de cultivo	6.00E-09	5.80122E-05
pH	5.58E-09	NS
Floc	0.000745927	NS

NS= Valor de P no significativo (>0.05)

Se evaluó el impacto de las covariables en las métricas de diversidad alfa mediante un análisis de correlación de Spearman. Se encontró una relación significativa ($P < 0.05$) entre las covariables y el índice de Faith. Además, se observó una correlación negativa moderada para la covariable temperatura, una correlación débil negativa para el pH, amonio y NH_3 , y una correlación débil positiva para la salinidad, para el mismo índice (Tabla 2; las variables que no mostraron significancia estadística no se presentan en la tabla)

7.1.4 Abundancia diferencial

El análisis ANCOM, al comparar todos los datos por 'fase' a nivel taxonómico de clase (ANEXO Tabla 2), revela diferencias estadísticas significativas en Cyanobacteriia, Acidobacteria, Gammaproteobacteria, Desulfuromonadia, Rhodothermia, Actinobacteria, Kapabacteria, Dadabacteriia, Oligoflexia, Polyangia, Gracilibacteria, Bdellovibrionia, Vampirivibrionia, Alphaproteobacteria, Sumerlaeia y NB1-j (Valor W del estadístico para cada clase respectivamente: 50, 49, 49, 46, 46, 44, 44, 44, 43, 43, 41, 41, 40, 40, 39, 38). Por otro lado, al

realizar este análisis a nivel de ASVs, se identificaron 269, siendo los primeros 10 (ANEXO Tabla 3) pertenecientes a Alteromonadales (Gammaproteobacteria), Beijerinckiaceae (Alphaproteobacteria), Rhodobacteraceae (Alphaproteobacteria), Flavobacteriaceae (Bacteroidia), Rhodobacteraceae (Alphaproteobacteria), Algoriphagus (Bacteroidia) y Flavobacteriaceae (Bacteroidia) (Valor W del estadístico para cada ASV respectivamente: 1984, 1983, 1983, 1983, 1981, 1976, 1974, 1973, 1973, 1971).

En cuanto al análisis ANCOM comparando los datos por 'tratamiento' a nivel taxonómico de clase, solo se observaron diferencias estadísticas significativas en Cyanobacteriia. Sin embargo, al analizar a nivel de ASVs, se identificaron tres que corresponden a la clase Cyanobacteriia (ANEXO Tabla 4).

Tabla 2. Análisis de correlación de Spearman para evaluar la influencia de covariables en los índices de diversidad alfa de Faith y Pielou.

Covariable	Faith			Pielou		
	ρ	Valor P	Tamaño de muestra	ρ	Valor P	Tamaño de muestra
pH	-0.3591	0.0000	236	0.1068	0.1019	236
Floc	0.1642	0.0167	212	-0.0101	0.8839	212
Temperatura	-0.4069	0.0000	249	-0.0881	0.1656	249
Salinidad	0.2523	0.0001	249	-0.0176	0.7826	249
Amonio	-0.2501	0.0125	99	-0.1067	0.2931	99
NH ₃	-0.2542	0.0111	99	-0.0267	0.7929	99

7.1.5 Identificación longitudinal de la volatilidad de características

Se desarrolló un modelo de regresión para identificar taxones/ASVs relevantes y su volatilidad, incluso en presencia de baja abundancia. Los modelos para el nivel taxonómico de clase y los ASVs demostraron significancia estadística ($p < 0.05$), con coeficientes de correlación (valor-r) de 0.74 y

0.91, respectivamente, y coeficientes de determinación (R-cuadrado) de 0.56 y 0.84 para cada modelo.

El modelo de nivel taxonómico de clase identificó 39 clases importantes, mientras que el modelo de ASVs identificó 100. Las cinco clases más destacadas según el modelo fueron Actinobacteria (importancia del 36%), Polyangia (importancia del 11%), Gammaproteobacteria (importancia del 7%), Cyanobacteriia (importancia del 6%) y Bacteroidia (importancia del 4%). Además, se incluyó Alphaproteobacteria (importancia del 1%) (Fig. 8-13).

En cuanto a los ASVs más relevantes, se encontraron Alteromonadales (Gammaproteobacteria, importancia del 20%), que comenzó a aumentar su abundancia relativa a partir del día 28, Flavobacteriaceae (Bacteroidia, importancia del 12%), que también mostró un aumento a partir del día 28, Alteromonadales (Gammaproteobacteria, importancia del 11%), con un aumento en la abundancia relativa desde el día 28, Aeromonas (Gammaproteobacteria, importancia del 6%), cuya abundancia relativa disminuyó del día 1 al 28, y Rhodobacteraceae (Alphaproteobacteria, importancia del 4%), cuya abundancia relativa disminuyó del día 1 al 44.

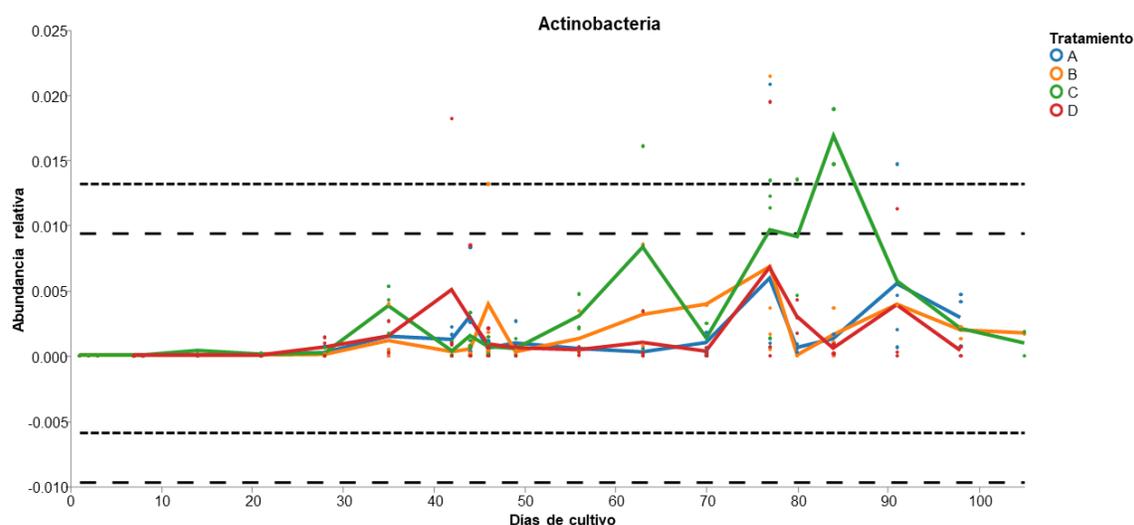


Figura 8. Gráfico de la volatilidad de Actinobacteria por tratamiento. A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Los puntos en el gráfico representan la dispersión de los valores, las líneas continuas representan los valores promedio, las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar (+/- 2x y 3x) desde la media global.

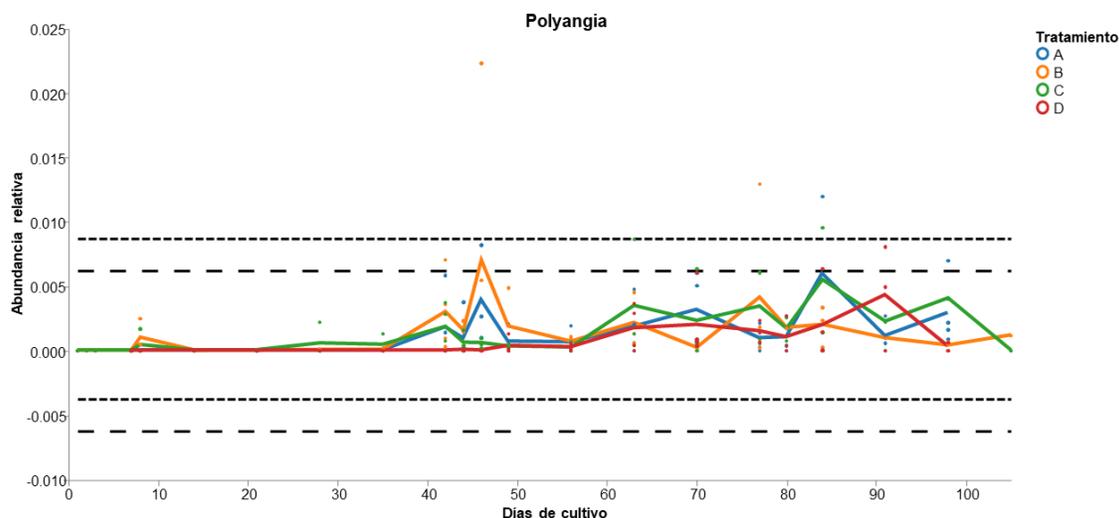


Figura 9. Gráfico de la volatilidad de Polyangia por tratamiento. A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Los puntos en el gráfico representan la dispersión de los valores, las líneas continuas representan los valores promedio, las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar (+/- 2x y 3x) desde la media global.

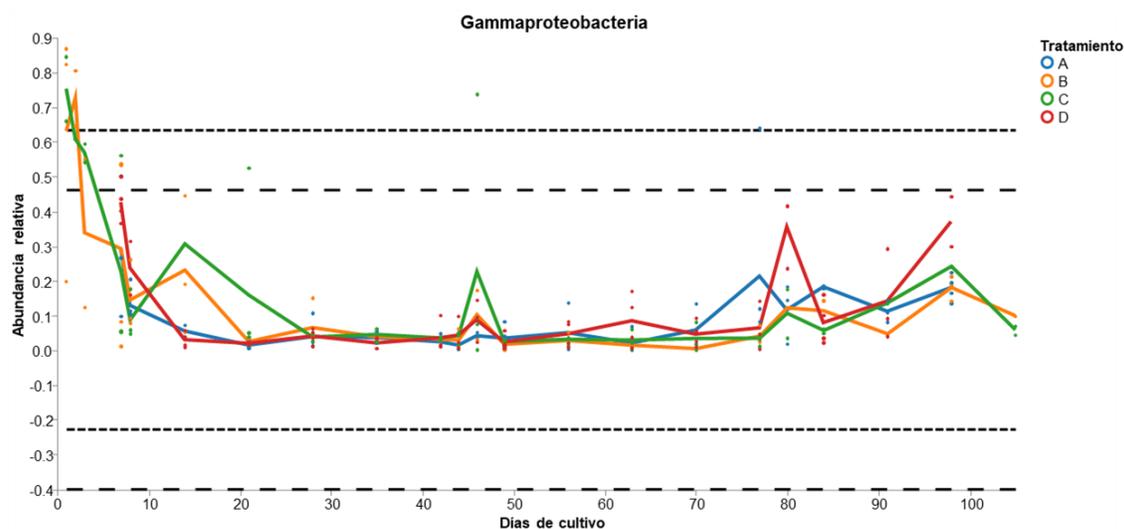


Figura 10. Gráfico de la volatilidad de Gammaproteobacteria por tratamiento. A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Los puntos en el gráfico representan la dispersión de los valores, las líneas continuas representan los valores promedio, las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar (+/- 2x y 3x) desde la media global.

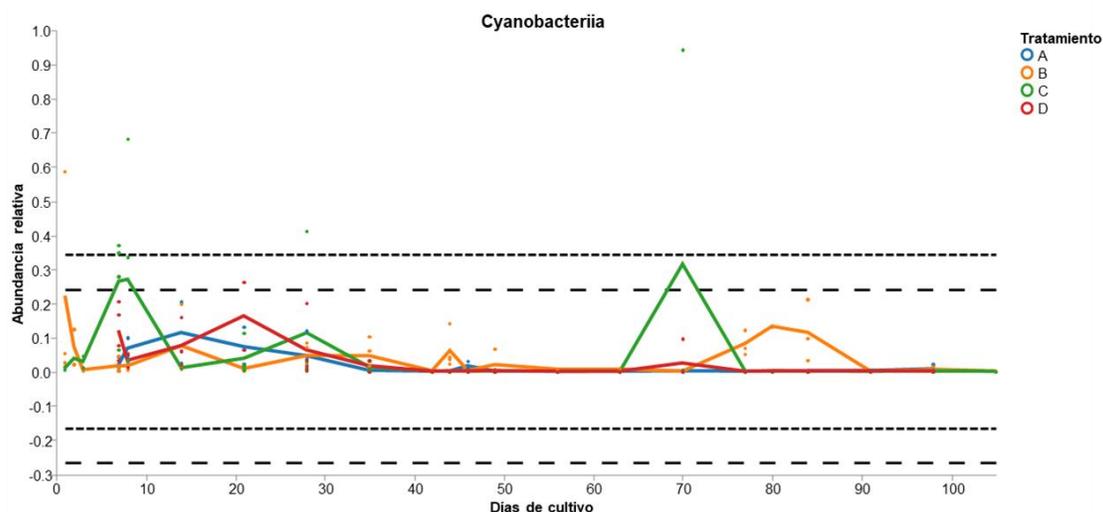


Figura 11. Gráfico de la volatilidad de Cyanobacteria por tratamiento. A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Los puntos en el gráfico representan la dispersión de los valores, las líneas continuas representan los valores promedio, las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar ($\pm 2x$ y $3x$) desde la media global.

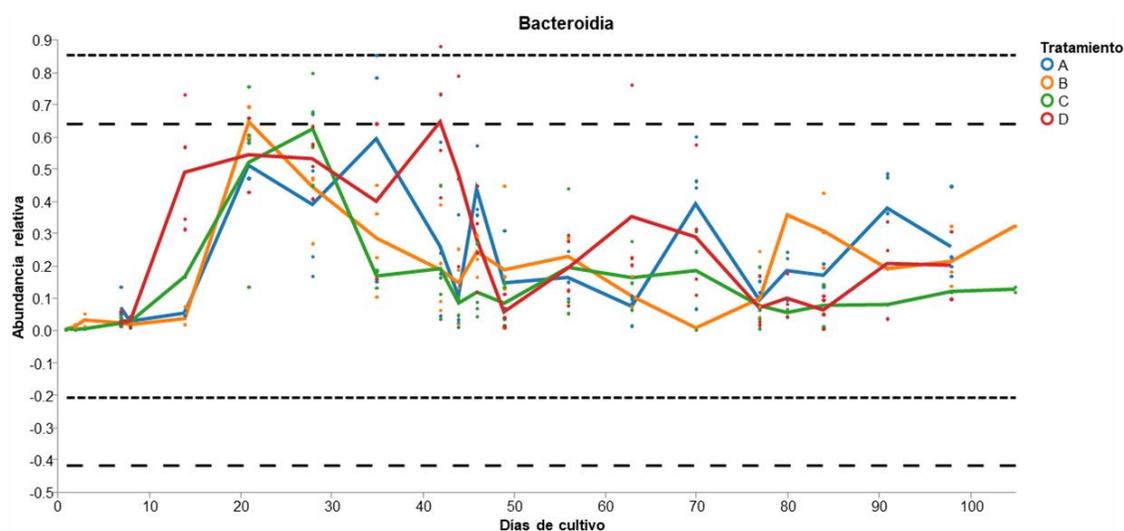


Figura 12. Gráfico de la volatilidad de Bacteroidia por tratamiento. A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Los puntos en el gráfico representan la dispersión de los valores, las líneas continuas representan los valores promedio, las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar ($\pm 2x$ y $3x$) desde la media global.

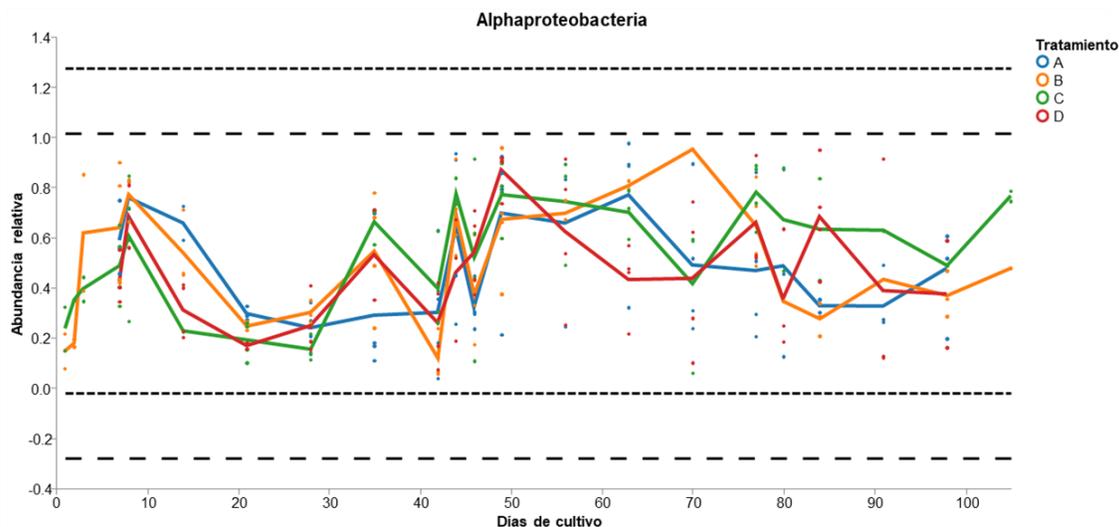


Figura 13. Gráfico de la volatilidad de Alphaproteobacteria por tratamiento. A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Los puntos en el gráfico representan la dispersión de los valores, las líneas continuas representan los valores promedio, las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar ($\pm 2x$ y $3x$) desde la media global.

7.1.6 Diversidad beta

Se generaron gráficos de PCoA para datos agrupados por 'Fase' (Fig. 14) y 'Tratamiento' (Fig. 15), revelando agrupación en el primero y una distribución similar en el segundo. La prueba PERMANOVA indicó diferencias estadísticamente significativas entre las muestras agrupadas por 'Fase', 'Días de cultivo', 'Tratamiento', 'Mes' y 'pH' (Tabla 3). La prueba PERMDISP reveló diferencias estadísticas en la dispersión de datos dentro de los grupos en las categorías 'Fase', 'Mes' y 'Días de cultivo' (Tabla 4). Además, la prueba ADONIS evidenció diferencias significativas en la estructura de la comunidad microbiana entre los grupos 'Mes' y 'Tratamiento', explicando un 8% y 2% de la variabilidad, respectivamente (Tabla 5). El análisis longitudinal basado en PCoA mostró que la diversidad beta presenta una estabilidad aparente a partir del día 44 en los datos analizados por 'Fase' (Fig. 16) y 'Tratamiento' (Fig. 17).

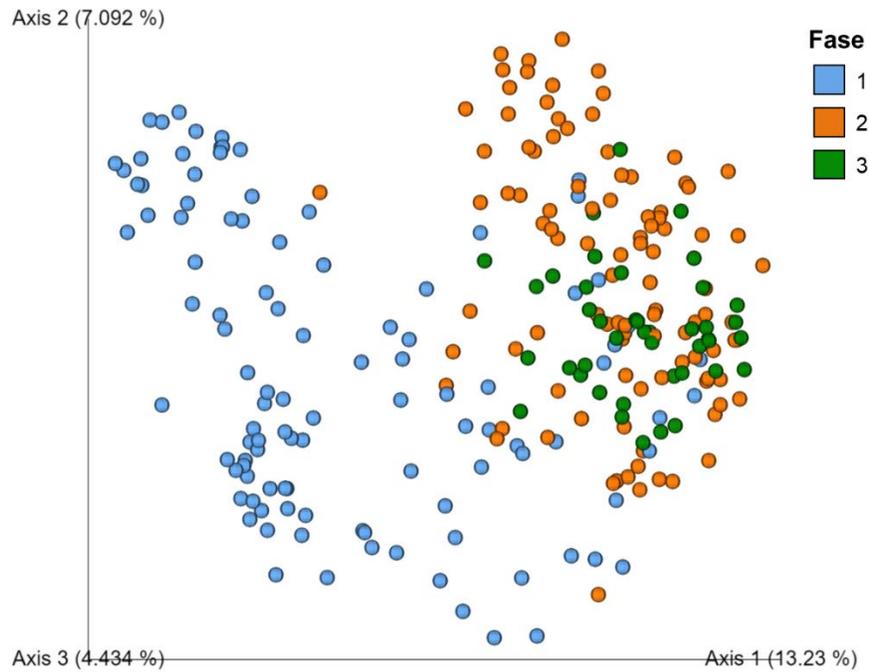


Figura 14. PCoA de UniFrac No Ponderado por fase. Fase 1) 1500 PL•m-2; Fase 2) 750 PL•m-2; Fase 3) 325 PL•m-2.

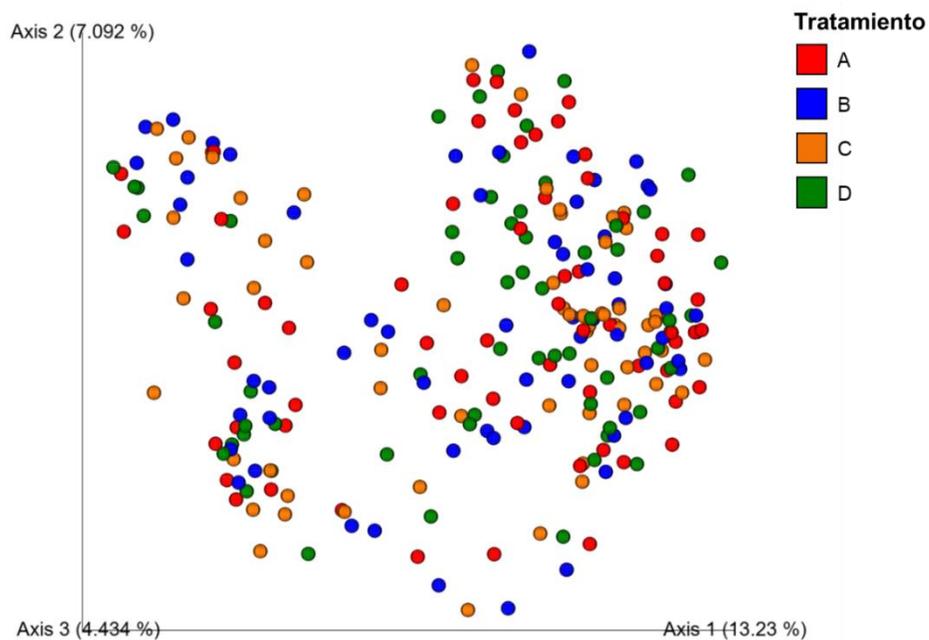


Figura 15. PCoA de UniFrac No Ponderado por tratamiento. A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico.

Tabla 3. Resultados de la prueba PERMANOVA para la métrica “UniFrac no ponderado” para cada categoría de interés.

Categoría	Tamaño de la muestra	N° de grupos	Estadística de prueba	Valor P
Fase	249	3	15.0446	0.000249938
Días de cultivo	249	22	4.94334	0.000249938
Tratamiento	249	4	1.92666	0.000249938
Mes	249	4	13.9972	0.000249938
pH	236	23	2.77113	0.000249938

Tabla 4. Resultados de la prueba PERMDISP para la métrica UniFrac no ponderado para cada categoría de interés.

Categoría	Tamaño de la muestra	N° de grupos	Estadística de prueba	Valor P
Fase	249	3	11.3509	0.000249938
Mes	249	4	7.38018	0.00099975
Días de cultivo	249	22	4.5709	0.000249938
pH	236	23	3.86054	0.99975
Tratamiento	249	4	0.261363	0.856036

Tabla 5. Resultados de la prueba ADONIS para la métrica UniFrac no ponderado para cada categoría de interés.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Estadística F	R2	Pr(>F)
Mes	1	4.977655	4.977655	21.990582	0.080800	0.001
Tratamiento	3	1.396639	0.465546	2.056719	0.022671	0.001
Residual	244	55.230368	0.226354	NaN	0.896529	NaN
Total	248	61.604662	NaN	NaN	1.000000	NaN

NaN: No es un número

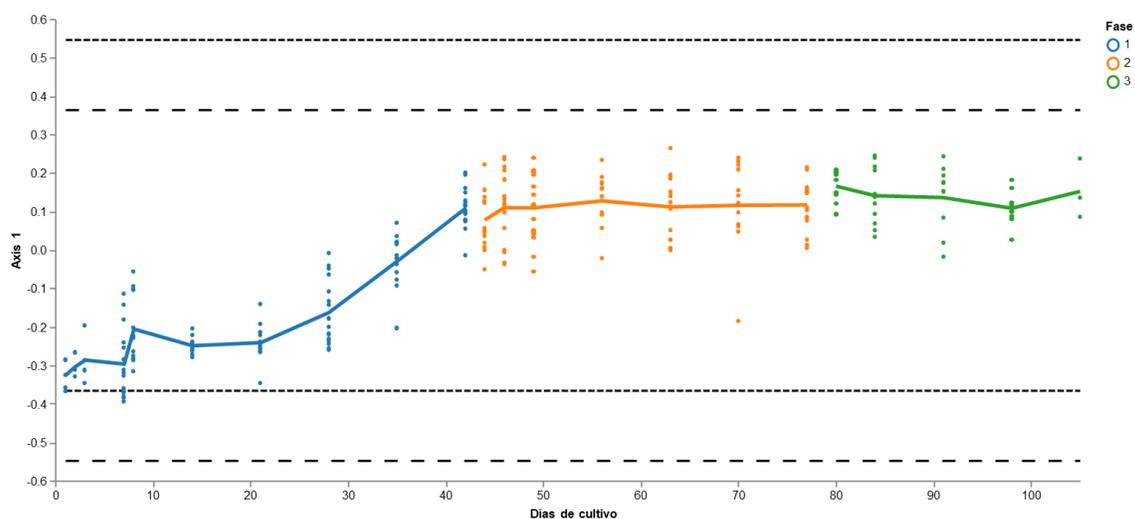


Figura 16. Gráfico de la volatilidad temporal en la estructura de la comunidad microbiana por fase. Fase 1) 1500 PL•m⁻²; Fase 2) 750 PL•m⁻²; Fase 3) 325 PL•m⁻². Los puntos en el gráfico representan la dispersión de los valores, las líneas continuas representan los valores promedio, las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar (+/- 2x y 3x) desde la media global.

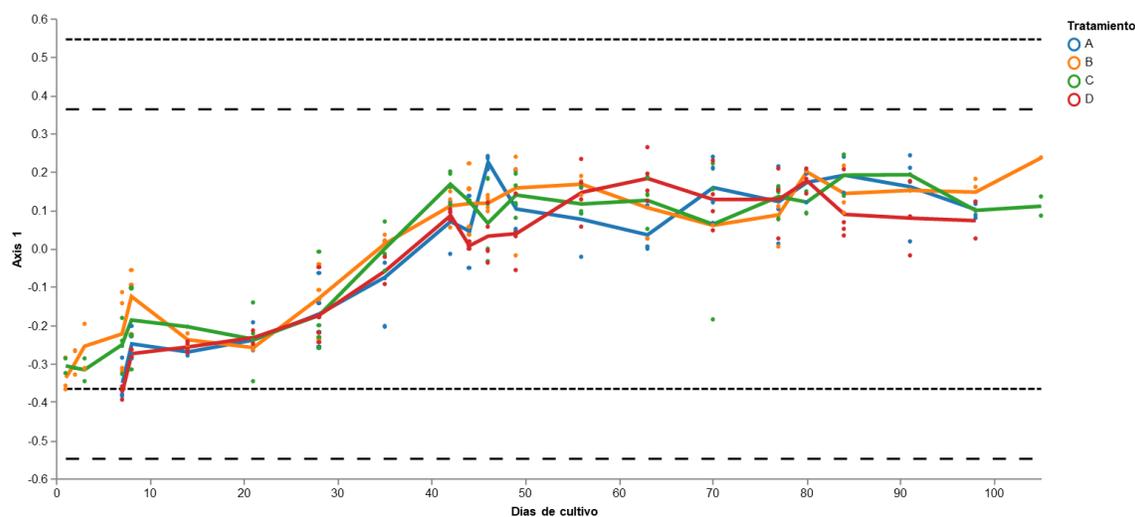


Figura 17. Gráfico de la volatilidad temporal en la estructura de la comunidad microbiana por tratamiento. A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Los puntos en el gráfico representan la dispersión de los valores, las líneas continuas representan los valores promedio, las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar (+/- 2x y 3x) desde la media global.

7.1.7 Efectos mixtos lineales

Los resultados del modelo LME muestran una relación significativa entre los "días de cultivo" y la "Fase" en las comunidades microbianas. No se observa una relación significativa entre "día de cultivo" y "Tratamiento", ni entre "Fase" y "Tratamiento".

Los gráficos generados revelan que las fases 2 y 3 presentan la mayor estabilidad en las comunidades microbianas a lo largo del tiempo (Fig. 18A). Además, se observa que el tratamiento C (Probiótico Quimiotrófico) exhibe mayor estabilidad, evidenciado por un menor cambio en las estructuras de las comunidades microbianas a lo largo del tiempo (Fig. 18B).

7.1.8 Maduración microbiológica de los sistemas biofloc

La inoculación previa de los tratamientos B y C, antes de la siembra de organismos, ejerce un efecto en las comunidades bacterianas a nivel de clase. Se observa una disminución significativa en la abundancia relativa de Gammaproteobacteria (Fig. 10), acompañada de un aumento correspondiente en Alphaproteobacteria (Fig. 13). Además, el tratamiento C muestra un incremento adicional en Cyanobacteria (Fig. 11). Al inicio de la Fase 1 del bioensayo, se evidencia

un aumento exponencial en la abundancia relativa de Bacteroidia (Fig. 12) en todos los tratamientos, mientras que se observa un decremento en la abundancia de Alphaproteobacteria. La inoculación previa de los tratamientos B y C, antes de la siembra de organismos, resultó en un aumento del índice de Faith (Fig. 6). Durante la Fase 1 del bioensayo, se observó que los tratamientos con inóculos (A, B y C) mostraron valores más altos en este índice en comparación con el tratamiento sin inóculo (D). En cuanto al índice de Pielou (Fig. 7), la inoculación de los tratamientos B y C resultó en un aumento inicial durante los primeros 2 días, pero posteriormente el valor para el tratamiento C mostró una tendencia negativa en este índice. Al inicio de la Fase 1 del bioensayo, se observó que los tratamientos con inóculos (A, B y C) presentaban valores más bajos en este índice en comparación con el tratamiento sin inóculo.

El aumento positivo de la diversidad beta en los tratamientos B y C (Fig. 17), antes de la siembra de organismos, indica que estos influyen de manera consistente la estructura de la comunidad microbiana. Sin embargo, al iniciar la Fase 1 del bioensayo, se observan fluctuaciones en la diversidad beta en todos los tratamientos, con un aumento seguido de una disminución posterior. Estas variaciones temporales sugieren una dinámica compleja en la estructura de la comunidad microbiana durante el bioensayo. Es importante destacar que los tratamientos B y C presentan valores más altos en la diversidad beta en comparación con los tratamientos A y D.

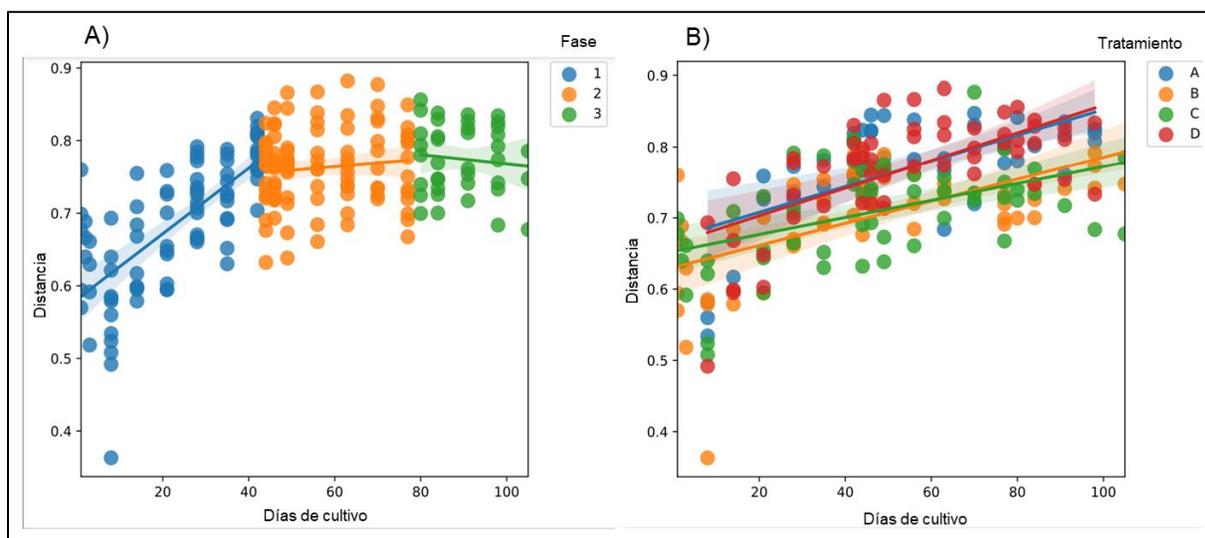


Figura 18. Gráficos de dispersión de regresión que ilustran los efectos de la Fase (A) y el Tratamiento (B) en la comunidad microbiana. Las diferentes fases se definieron por la densidad de siembra: Fase 1) 1500 PL•m⁻²; Fase 2) 750 PL•m⁻²; Fase 3) 325 PL•m⁻². Se muestran los tratamientos A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico

Quimiotrófico, y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Los puntos en los gráficos representan la dispersión de los valores, las líneas continuas representan los valores promedio.

7.2 Estudio en el sistema de producción de postlarvas de camarón

7.2.1 Estudio de DAFO/FODA de la empresa de larvicultura desde la perspectiva de bioriesgo.

En la Tabla 6 se muestra que existe una carga microbiana de *Vibrios* variable entre los nauplios de diferentes líneas genéticas, después de ser desinfectados con yodo-antibiótico y antes de ingresar al módulo de larvario, y esta carga se incrementa en los módulos subsecuentes. No existe carga de *Vibrios* en las muestras de agua inicial de cada módulo y estas presentan una calidad de agua (31°C, 33UPS, 7.4 pH, 6.0 mg.L⁻¹ O₂, 0ppm NH₄ y 0.003ppm NO₂⁻) adecuada para el cultivo, además existe variación en la supervivencia entre fases de cultivo y entre líneas genéticas. Estos datos en combinación con la información recopilada durante las visitas y las entrevistas de acción participativa permitieron elaborar el análisis FODA que se muestra en la Fig. 19.

Tabla 6. Tabla de datos microbiológicos, amoníaco y de producción obtenidos de los muestreos

Muestra	V. <i>alginolyticu</i> s	V. <i>vulnificu</i> s	V. <i>parahaemolyticu</i> s	NH 3	N° Organismo s	Supervivenci a
Texana (N→L*)	2X10 ³ UFC	3X10 ³ UFC	0 UFC	NA	700 M	94 %
Nicaragüenc e (N→L*)	9X10 ¹ UFC	0 UFC	0 UFC	NA	710 M	84 %
Ecuatoriana (N→L*)	6X10 ¹ UFC	0 UFC	0 UFC	NA	710 M	84 %
Texana (PL→RW*)	6X10 ⁴ UFC	6.2X10 ¹ UFC	0 UFC	NA	660 M	60 %
Nicaragüenc e (PL→RW*)	6X10 ⁴ UFC	1X10 ¹ UFC	0 UFC	NA	600 M	48 %
Ecuatoriana (PL→RW*)	6X10 ⁴ UFC	6X10 ¹ UFC	0 UFC	NA	600 M	40 %

Pre-engorda 1 (PL→P*)	7X10 ⁴ UFC	3X10 ¹ UFC	0 UFC	NA	3 M	NA
Pre-engorda 2 (PL→P*)	6X10 ⁵ UFC	2X10 ² UFC	0 UFC	NA	3 M	NA
Agua de reservorio	0 UFC	0 UFC	0 UFC	0.0	NA	NA
Agua- Larvario	0 UFC	0 UFC	0 UFC	0.0	NA	NA
Agua-RW	0 UFC	0 UFC	0 UFC	0.0	NA	NA
Agua Pre- engorda	0 UFC	0 UFC	0 UFC	0.0	NA	NA

Nota: Las muestras de agua presentadas son de antes de introducir a los organismos. N→L*: Nauplios antes ingresar al módulo de larvario; PL→RW*: Postlarva antes de ingresar al módulo de Raceway; PL→P*: Postlarva antes de entrar al módulo de pre-engorda; NA: No aplica

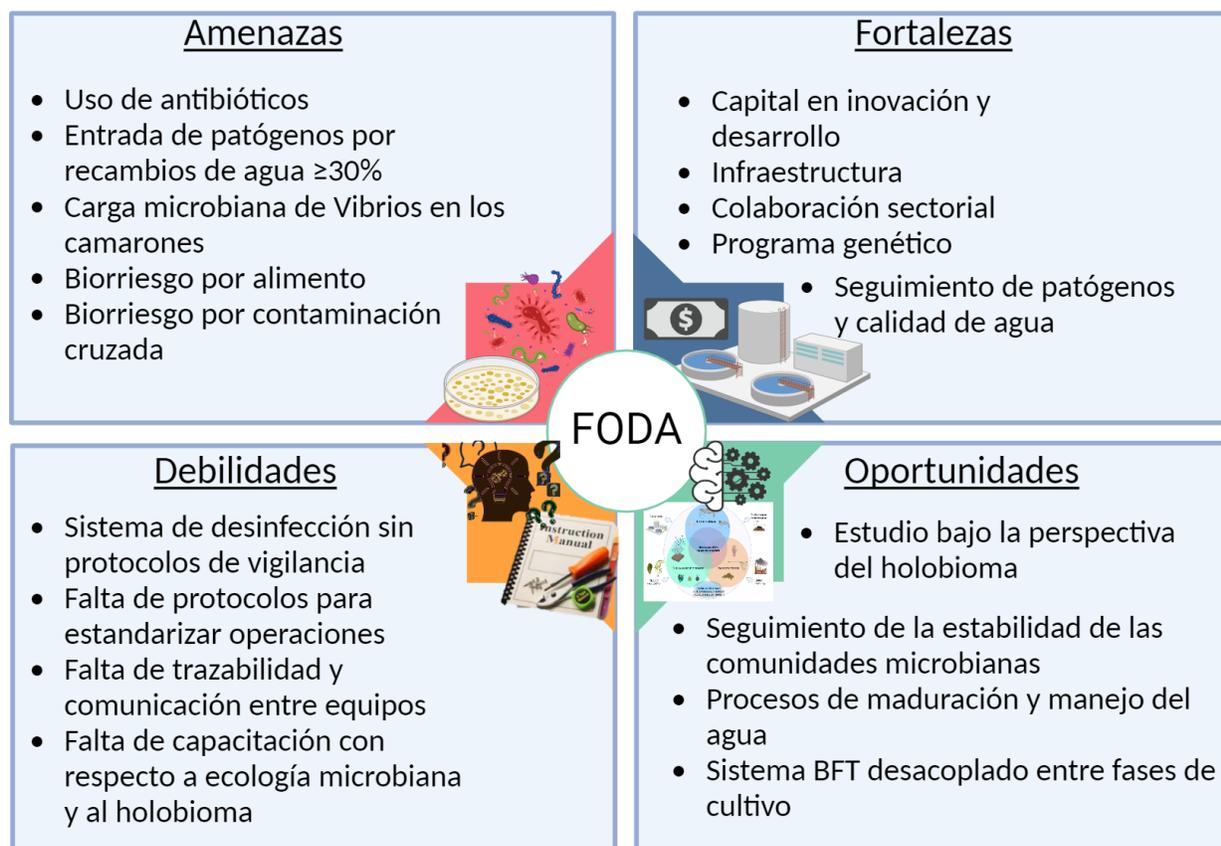


Figura 19. Análisis FODA de la bioseguridad de la empresa de larvicultura

8. DISCUSIÓN

8.1 Estudio Longitudinal y Estabilidad de comunidades bacterianas asociadas a bioflocs por el perfil taxonómico del gen 16S ARNr (CIBNOR)

8.1.1 Diversidad alfa

La volatilidad de la diversidad alfa en los sistemas de cultivo de biofloc para camarones es un aspecto crucial y dinámico que influye en la estabilidad y la composición taxonómica de las comunidades microbianas a lo largo del tiempo.

La variación en los valores del índice de Faith revela patrones oscilantes y con tendencia al incremento en todos los tratamientos, siendo el tratamiento D (maduración tradicional sin probiótico específico) el que exhibe la menor variabilidad, sugiriendo así una mayor estabilidad en la diversidad taxonómica a lo largo del tiempo y podría atribuirse a una no intervención y autorregulación del sistema (Chen *et al.*, 2023), sin embargo el modelo de LME muestra que en cuanto a composición taxonómica los tratamientos B y C presentan mayor estabilidad por lo que no podemos establecer una relación entre los patrones de comportamiento. Los descensos en la diversidad de los tratamientos al iniciar la Fase 1 y 2, muestran un patrón de comportamiento similar con la volatilidad Alphaproteobacteria, en la cual también se observan descensos en esos mismos puntos, y debido a la abundancia relativa que posee muestra ser el taxon que más está influenciando la diversidad taxonómica en los tratamientos. Aunque hay incrementos en la diversidad taxonómica esta es fluctuante en todos los tratamientos y no permite establecer un patrón, como sucede en el “enfoque funcional de la estabilidad” de los sistemas biofloc (Meng *et al.*, 2023; Xu *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2023), que indique que sea deseable una mayor diversidad taxonómica en los sistemas o que sea deseable que esta sea estable en cierto punto.

El análisis del índice de Pielou muestra un rango constante de valores promedio para los cuatro tratamientos, indicando una estabilidad relativa en la equitabilidad de la distribución de las abundancias de especies dentro de cada tratamiento. Este comportamiento en la equitabilidad es comparable con estudios de biofloc donde esta no muestra diferencia estadística en los valores obtenidos al inicio y al final del bioensayo (Huang *et al.*, 2021; Huerta-Rábago *et al.*, 2019). La

consistencia en la variabilidad a lo largo del tiempo sugiere que, aunque pueda haber fluctuaciones, estas no comprometen significativamente la equitabilidad en las comunidades microbianas. Esta estabilidad relativa muestra ser una característica de los sistemas biofloc y es un indicador que puede ser considerada para el mantenimiento de comunidades microbianas saludables.

El análisis de correlación de Spearman indica que la temperatura es la covariable con más influencia en diversidad taxonómica y mantenerla estable durante el cultivo es una vía de estudio para mantener la estabilidad de la diversidad en los sistemas. La temperatura es un factor clave que influye en el crecimiento y el metabolismo de los microorganismos, lo cual tiene un impacto directo en su abundancia. Lo anterior es sustentado por de Almeida *et al.* (2018), describiendo que algunos géneros se ven favorecidos con la disminución de la temperatura, mientras que otros son afectados negativamente, lo que sugiere una mejor adaptación a una temperatura de 25 °C en lugar de 35 °C. Además, a temperaturas óptimas para el crecimiento, los microorganismos son capaces de secuestrar sustratos de su entorno debido al aumento de su afinidad por estos (Nedwell, 1999). La menor correlación que presentan el amonio y NH₃, puede deberse a la eficiencia de los sistemas biofloc ya que eliminan los compuestos tóxicos nitrogenados a través de la asimilación bacteriana heterotrófica, oxidación bacteriana quimioautotrófica (nitrificación) o asimilación fotoautotrófica (Huang *et al.*, 2020a; Martins *et al.*, 2020). Aumentar el monitoreo de las covariables en conjunto con análisis de correlación pueden ayudar a comprender mejor las condiciones que influyen en la estabilidad de los cultivos y guiar a estrategias de manejo de los sistemas biofloc.

La información proporcionada a través del análisis de abundancia diferencial y la identificación longitudinal de la volatilidad de características ofrece una visión detallada de cómo las comunidades microbianas en los sistemas de cultivo de biofloc para camarones están experimentando cambios a lo largo del tiempo y en respuesta a diferentes Fases y tratamientos. Las Fases están influenciadas por la densidad de organismos y el tiempo de cultivo, se ha reportado que al aumentar la densidad de cultivo es posible aumentar la diversidad microbiana del biofloc y del microbioma intestinal de los camarones, debido una mayor acumulación de

nutrientes minerales que permite desencadenar más reacciones microbianas (Deng *et al.*, 2019), de la misma forma al aumentar/transcurrir el tiempo de cultivo (Cardona *et al.*, 2016; Huerta-Rábago *et al.*, 2019) se favorece la acumulación de nutrientes resultando en el mismo efecto. Previo a discutir los resultados obtenidos mediante modelos de regresión, es relevante contextualizar la utilización de estos modelos como herramienta para identificar taxones clave que influyen en la dinámica de la comunidad. Los taxones clave identificados en el modelo incluyen Actinobacteria, Polyangia, Gammaproteobacteria, Cyanobacteriia, Bacteroidia y Alphaproteobacteria, los cuales son consistentes con los hallazgos en el ANCOM y resaltan su relevancia en la dinámica de la comunidad microbiana. Estos grupos no solo han sido reportados en la composición bacteriana del Floc (Huang *et al.*, 2020a; Wei *et al.*, 2020), sino que también se han identificado como taxones clave en las comunidades bacterianas asociadas al floc y a bacterias planctónicas en la acuicultura de camarones, como es el caso de Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria y Bacteroidia (Rajeev *et al.*, 2023).

Actinobacteria, Gammaproteobacteria y Alphaproteobacteria son taxones que se encuentran comúnmente en sistemas dominados por estrategias K, y las proporciones de su abundancia relativa después de la fase dos (<1%, <30% y ~60%, respectivamente) se alinean con las composiciones reportadas para estos sistemas (Vadstein *et al.*, 2018). Por otro lado, la clase Bacteroidia forma parte de la composición del microbioma intestinal del camarón (Fan *et al.*, 2019). Al iniciar la Fase 1 del sistema de cultivo, la siembra de los camarones y el suministro de nutrientes a través del alimento favorece un incremento en la abundancia de Bacteroidia. Esta rápida proliferación en las etapas tempranas del sistema sugiere que Bacteroidia puede clasificarse como un estratega r (Emerenciano *et al.*, 2017; Schweitzer *et al.*, 2020).

8.1.2 Diversidad beta

La exploración de la diversidad beta en los sistemas de cultivo de biofloc para camarones revela patrones significativos en la estructura de las comunidades microbianas. Los gráficos de PCoA, agrupados por Fase y Tratamiento, muestran una diferenciación en la composición microbiana, siendo el primer grupo concordante cronológicamente con los patrones de sucesión descritos por Yang *et al.* (2020). Al examinar los PCoAs de UniFrac No Ponderado, observamos patrones de

agrupamiento por mes de cultivo, día de cultivo y pH (ver ANEXO-A Fig. 1, 2 y 4). Estos patrones, al relacionarlos con la volatilidad de la diversidad beta y el modelo LME, respaldan la idea de que la estabilidad de los sistemas se manifiesta después del día 44, con un pH mantenido entre 7.7 y 6.4. Al considerar estas variables como cualitativas en las pruebas estadísticas, confirmamos diferencias significativas en la estructura de la comunidad para estas agrupaciones y en el caso del pH, este contribuye al entendimiento de la estabilidad de la comunidad microbiana al mostrarnos el rango en que se desarrolla dicha estabilidad.

La estabilidad de la diversidad beta a partir del día 44 se convierte en una característica definitoria de lo que podríamos denominar "estabilidad de la comunidad microbiana" en los sistemas biofloc, coincidiendo con los tiempos reportados para alcanzar la estabilidad funcional (Chen *et al.*, 2023; Meng *et al.*, 2023). Aunque no se identifican patrones claros de estabilidad en la diversidad alfa, sí se observan en la diversidad beta, siendo los tratamientos B y C los que exhiben mayor estabilidad en las estructuras microbianas a lo largo del tiempo y los que presentan la mayor producción promedio de biomasa de camarón (ver ANEXO-A Fig. 7). Por lo tanto, sería importante profundizar en estudios de las comunidades microbianas de estos sistemas una vez alcanzada la estabilidad en términos de diversidad beta. A pesar de que los sistemas biofloc están influenciados por procesos estocásticos (Hou *et al.*, 2021; Zhou y Ning, 2017), el modelo LME de las Fases (Fig. 18-A) muestra que dentro de la estabilidad de la diversidad beta existen diferentes ensamblajes microbianos que pueden ser explorados para favorecer la estabilidad de la comunidad microbiana en los sistemas biofloc y su ecoeficiencia.

8.1.3 Estabilidad de los sistemas biofloc

La volatilidad en la estructura de la comunidad microbiana observadas en los gráficos de fase y tratamiento (Fig. 16-17) así como los gráficos de los modelos de LME (Fig. 18) nos brindan información con soporte suficiente para decir que la Fase 1 de los cultivos se caracteriza por ser la más volátil e inestable, y basado en el análisis ANCOM y de volatilidad de características esta está fuertemente influenciada por las clases Gammaproteobacteria, Cyanobacteria y Bacteroidia (Fig. 10-12).

Antes del inicio de la Fase 1, en los tratamientos B y C se observa que al inocular los tratamientos en los tanques hay un incremento en Alphaproteobacteria (Fig. 13) y un decremento en Gammaproteobacteria (Fig. 8), lo que indica que estos sistemas inicialmente están dominados por estrategias *K* (Vadstein *et al.*, 2018), pero al introducir a los camarones y empezar a suministrar alimento balanceado esta estructura se desequilibra causado principalmente por la clase Bacteroidia. La inestabilidad de la diversidad beta durante la Fase 1 en los tratamientos B y C indica que la maduración microbiológica previo al cultivo no desarrolla una estructura microbiana lo suficientemente resiliente.

Los resultados de volatilidad de características muestran que la estabilidad encontrada en las Fases 2 y 3 (después del día 44) está fuertemente influenciada por la presencia de Actinobacteria, Polyangia, Alphaproteobacteria, y concuerda con bioflocs heterotróficos y quimiotróficos en el primer caso (Ferreira *et al.*, 2021), lo cual en el sentido de la teoría ecológica de los estrategias *r/K* las posicionaría como estrategias *K* (Chen *et al.*, 2023; Salvesen *et al.*, 1999; Schweitzer *et al.*, 2020). Contrastantemente la estabilidad alcanzada en la fase 2 coincide con la disminución y estabilidad del amonio tóxico (ANEXO-A Fig. 6) en los sistemas y se alcanza a aproximadamente a los 44 días de cultivo lo cual concuerda con la bibliografía descrita anteriormente.

Teniendo en cuenta la información para clasificar a los estrategias *r/K* descrita detalladamente en los antecedentes, podemos decir que Actinobacteria, Polyangia y Alphaproteobacteria son estrategias *K*, mientras que Gammaproteobacteria, Cyanobacteria y Bacteroidia son estrategias *r*. Debido a su abundancia en las muestras (ANEXO-A Fig. 12) a lo largo del tiempo, y en las Fases 2 y 3 de los cultivos, podemos decir que la clase Bacteroidia puede clasificarse como estrategia *r* o *K* dependiendo de la estructura de la comunidad microbiológica. Y desde el contexto de la diversidad beta podemos decir que las Fases 2 y 3 de los cultivos biofloc presentan estructuras dominadas por estrategias *K*, siendo la de los tratamientos B y C las que presentan una estructura que favorece el crecimiento como se discutió anteriormente. Esta última aportación puede favorecer a los sistemas biofloc si se replica/aceleran el desarrollo de estos ensamblajes en los cultivos.

Desde la perspectiva de la diversidad, podemos definir la “estabilidad de la comunidad microbiana” en base a tres preceptos fundamentales: 1. La capacidad de una comunidad microbiana para mantener una composición o función similares a lo largo del tiempo, a pesar de las perturbaciones o cambios ambientales; 2. No implica necesariamente la ausencia de cambios en las comunidades microbianas, sino más bien denota una consistencia o equilibrio relativo en su composición y función (Tardy *et al.*, 2014); 3. La composición de la comunidad microbiana en la estabilidad esta dominada por estrategias *K*.

8.2 Estudio en el sistema de producción de postlarvas de camarón

Amenazas: A través de las visitas realizadas en una empresa en condiciones reales de producción se observó que los nauplios antes de ingresar a los módulos de producción presentan una carga microbiana, por lo cual los técnicos emplean antibióticos con una intención profiláctica pero no existe un esquema de rotación de antibióticos, lo cual es una amenaza ya que contribuye al desarrollo de patógenos resistentes (Zhao *et al.*, 2018). En el módulo de Raceway se realizan recambios de agua de $\geq 30\%$ semanalmente, lo cual afecta a las comunidades microbianas benéficas (estrategas *K*) que se han establecido e incrementa los nichos potenciales para microorganismos oportunistas (estrategas *r*) (De Schryver y Vadstein, 2014) alterando la estabilidad de las comunidades microbianas.

Debilidades: No se tiene en la empresa un seguimiento y protocolos claros del manejo de la entrada de agua (lámparas UV rotas, filtros sucios y falta de persona asignada) lo cual es un riesgo para la entrada de patógenos al sistema productivo (Pomeroy *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2018). La falta de protocolos, para el almacenamiento adecuado del alimento balanceado dentro de los módulos de Raceway, es relevante ya que como observamos en los resultados de BFT obtenidos en el estudio longitudinal, todos aquellos factores que ingresan cargas microbianas al sistema afectan la estabilidad de las comunidades microbiológicas, y como se menciona en el estudio de Panigrahi *et al.* (2018) los ratios de C:N son esenciales para la estabilidad microbiana de los sistemas por lo que el almacenamiento adecuado del alimento es necesario. En el caso de las debilidades se pudo observar que estas pueden ser resueltas con un buen liderazgo y el establecimiento de protocolos de sanidad adecuados, así como la implementación del “manual de buenas prácticas acuícolas

para la producción de camarón” emitido por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA).

Fortalezas: Se observó que la más relevante es la disponibilidad que tiene la empresa para tener una interacción transversal con los sectores de investigación y desarrollo para comprender cuales son los cambios internos que debe tener la empresa para mejorar sus procesos productivos.

Oportunidades: La perspectiva del holobioma (Gutiérrez-Pérez et al., 2022) ofrece oportunidades significativas para mejorar la producción de camarones. Al comprender cómo cada componente del sistema influye en los microbiomas que interactúan en él, se pueden identificar factores clave para la estabilidad de la comunidad microbiana. Esta comprensión más profunda de la dinámica ecológica abre nuevas oportunidades para abordar los desafíos de las enfermedades y la resistencia a antibióticos en los sistemas acuícolas de manera más efectiva. Además, el seguimiento continuo de la estabilidad de las comunidades microbianas, como se presentó en el estudio longitudinal, junto con la implementación de bitácoras del manejo del sistema productivo (metadatos), permite identificar los factores que afectan el microbioma en los sistemas de biofloc. Esto contribuye a diseñar estrategias de manejo más efectivas para mantener comunidades microbianas saludables, mejorando así la bioseguridad y la producción en la acuicultura de camarones."

9. CONCLUSIONES

Este estudio destaca la vital importancia de la estabilidad microbiológica en sistemas de cultivo de biofloc para camarones, considerando su impacto directo en la sostenibilidad y eficacia de la acuicultura intensiva. La clasificación de sistemas biofloc y el análisis longitudinal revelan patrones dinámicos en la comunidad microbiana, influenciados por estrategias r/K y cambios significativos durante la fase inicial del cultivo.

La diversidad alfa y beta proporcionan una visión detallada de la variabilidad taxonómica y estructural, destacando tratamientos más estables y fases menos volátiles. La identificación de taxones clave, correlaciones ambientales y factores influyentes contribuye a comprender mejor las condiciones óptimas para la estabilidad microbiológica. Los grupos taxonómicos clave de estrategias K encontrados en las fases 2 y 3, que muestran estabilidad en las comunidades microbianas, incluyen a Actinobacteria, Polyangia, Alphaproteobacteria y Bacteroidia.

Nuestro enfoque utilizando métricas de biodiversidad microbiológica destaca la complejidad y dinámica de estos sistemas. Se espera que esta investigación y enfoque, contribuya al diseño de estrategias de manejo más efectivas para mantener comunidades microbianas saludables en sistemas de cultivo de biofloc, mejorando así la bioseguridad y la producción en la acuicultura de camarones.

El análisis del diseño del sistema productivo, junto con las entrevistas de acción participativa, resultan indispensables para el desarrollo de estrategias destinadas a mejorar la larvicultura. Estos métodos permiten identificar puntos críticos para la bioseguridad mediante un análisis FODA, evaluarlos y darles seguimiento en caso de representar una amenaza potencial para la producción. Y de la misma forma permiten orientar las investigaciones en el contexto del holobioma y de la estabilidad de las comunidades microbianas en los cultivos.

Como parte del artículo de revisión, podemos concluir que el estudio del microbioma intestinal de los organismos acuícolas debe abordarse desde la perspectiva del “holobioma del sistema acuícola”, dada la influencia que cada una de las variables y microbiomas tiene en el cultivo. Se

destaca la importancia de analizar no solo el microbioma intestinal de las especies cultivadas, sino también las comunidades microbianas asociadas al sistema en su conjunto, lo cual incluye procariontes, microeucariontes y virus. Además, se enfatiza la necesidad de emplear tecnologías avanzadas de secuenciación de ADN y herramientas computacionales, como el aprendizaje automático e inteligencia artificial, para comprender la diversidad microbiana y sus funciones en el entorno acuícola.

10. LITERATURA CITADA

- Bentzon-Tilia, M., Sonnenschein, E. C., y Gram, L. (2016). Monitoring and managing microbes in aquaculture—Towards a sustainable industry. *Microbial Biotechnology*, 9(5): 576-584.
- Bokulich, N. A., Dillon, M. R., Zhang, Y., Rideout, J. R., Bolyen, E., Li, H., et al. (2018). q2-longitudinal: longitudinal and paired-sample analyses of microbiome data. *MSystems*, 3(6): 10-1128. doi: 10.1128/msystems.00219-18.
- Borsom, E. M., Conn, K., Keefe, C. R., Herman, C., Orsini, G. M., Hirsch, A. H., et al. (2023). Predicting neurodegenerative disease using Prepathology gut microbiota composition: a longitudinal study in mice modeling Alzheimer's disease pathologies. *MicrobiologySpectrum*, 11(2): e03458-22. doi: 10.1128/spectrum.03458-22.
- Bouvier, T. C., y del Giorgio, P. A. (2002). Compositional changes in free-living bacterial communities along a salinity gradient in two temperate estuaries. *Limnology and Oceanography*, 47(2): 453-470. doi: 10.4319/lo.2002.47.2.0453.
- Brito, C., do Valle, B., Interaminense, J., Peixoto, S., Lima-Filho, J. V., y Soares, R. (2016). Microbiological quality of *Litopenaeus vannamei* culture using conventional and biofloc systems. *Aquaculture Research*, 47(10): 3098-3108.
- Buford, T. W. (2017). (Dis) Trust your gut: the gut microbiome in age-related inflammation, health, and disease. *Microbiome*, 5(1): 1-11.
- Cardona, E., Gueguen, Y., Magré, K., Lorgeoux, B., Piquemal, D., Pierrat, F., et al. (2016). Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. *BMC Microbiology*, 16: 1-9. doi: 10.1186/s12866-016-0770-z.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., y Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13: 581-583. doi: 10.1038/nmeth.3869.
- Cavalcanti Nery, R., Costa, C. B., Rodrigues, F., Soares, R., Bezerra, R. D. S., y Peixoto, S. (2019). Effect of feeding frequency on growth and digestive enzyme activity in *Litopenaeus vannamei* during the grow-out phase in biofloc system. *Aquaculture Nutrition*, 25(3): 577-584.
- Chen, S., Sun, X., Tian, X., Jiang, W., Dong, X., y Li, L. (2023). Influence of ammonia nitrogen management strategies on microbial communities in biofloc-based aquaculture systems. *Science of The Total Environment*, 903: 166159. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.166159.
- Chen, W. Y., Ng, T. H., Wu, J. H., Chen, J. W., y Wang, H. C. (2017). Microbiome dynamics in a shrimp grow-out pond with possible outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease. *Scientific Reports*, 7(1): 9395.
- Cheng, A. C., Lin, H. L., Shiu, Y. L., Tyan, Y. C., y Liu, C. H. (2017). Isolation and characterization of antimicrobial peptides derived from *Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal and its use for preventing *Vibrio* infection in shrimp aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, 67: 270-279.
- CONAPESCA. Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. 2017. Obtenido de Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca: https://www.conapesca.gob.mx/work/sites/cona/dgppe/2017/ANUARIO_ESTADISTICO_2017.pdf.
- CONAPESCA. Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca: Documentos. 2018. Recuperado el 20 de Febrero de 2021, de Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca: https://www.conapesca.gob.mx/work/sites/cona/dgppe/2018/ANUARIO_2018.pdf.

- CONAPESCA. Datos abiertos de México. 2014. Recuperado el Mayo de 2020, de <https://datos.gob.mx/busca/dataset/produccion-pesquera>.
- Copetti, F., Gregoracci, G. B., Vadstein, O., y Schweitzer, R. (2021). Management of biofloc concentrations as an ecological strategy for microbial control in intensive shrimp culture. *Aquaculture*, 543: 736969. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.736969.
- Cornejo-Granados F., Gallardo-Becerra L., Leonardo-Reza M., Ochoa-Romo J. P., y Ochoa-Leyva A. (2018). A meta-analysis reveals the environmental and host factors shaping the structure and function of the shrimp microbiota. *PeerJ*, 6: e5382. doi: 10.7717/peerj.5382.
- Cornejo-Granados, F., Lopez-Zavala, A. A., Gallardo-Becerra, L., Mendoza-Vargas, A., Sánchez, F., Vichido, R., et al. (2017). Microbiome of Pacific Whiteleg shrimp reveals differential bacterial community composition between Wild, Aquacultured and AHPND/EMS outbreak conditions. *Scientific Reports*, 7(1): 11783.
- Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P., y Verstraete, W. (2007). Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*, 270(1-4): 1-14. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.05.006.
- Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P., y Verstraete, W. (2012). Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*, 356: 351-356.
- Dai, W., Yu, W., Xuan, L., Tao, Z., y Xiong, J. (2018). Integrating molecular and ecological approaches to identify potential polymicrobial pathogens over a shrimp disease progression. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102: 3755–3764. doi: 10.1007/s00253-018-8891-y.
- Dauda, A. B. (2020). Biofloc technology: a review on the microbial interactions, operational parameters and implications to disease and health management of cultured aquatic animals. *Reviews in Aquaculture*, 12(2): 1193-1210.
- de Almeida-Fernandes, L., Pereira, A. D., Leal, C. D., Davenport, R., Werner, D., Mota Filho, C. R., et al. (2018). Effect of temperature on microbial diversity and nitrogen removal performance of an anammox reactor treating anaerobically pretreated municipal wastewater. *Bioresour Technol*, 258: 208-219.
- Deng, Y., Xu, X., Yin, X., Lu, H., Chen, G., Yu, J., y Ruan, Y. (2019). Effect of stock density on the microbial community in biofloc water and Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) gut microbiota. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103: 4241-4252.
- Dittmann, K. K., Rasmussen, B. B., Castex, M., Gram, L., y Bentzon-Tilia, M. (2017). The aquaculture microbiome at the centre of business creation. *Microbial Biotechnology*, 10(6): 1279.
- Duan, Y., Wang, Y., Dong, H., Ding, X., Liu, Q., Li, H., et al. (2018). Changes in the intestine microbial, digestive, and immune-related genes of *Litopenaeus vannamei* in response to dietary probiotic *Clostridium butyricum* supplementation. *Frontiers in Microbiology*, 9: 2191.
- Ekasari, J., Angela, D., Waluyo, S. H., Bachtiar, T., Surawidjaja, E. H., Bossier, P., y De Schryver, P. (2014). The size of biofloc determines the nutritional composition and the nitrogen recovery by aquaculture animals. *Aquaculture*, 426: 105-111.
- Emerenciano, M. G. C., Martínez-Córdova, L. R., Martínez-Porchas, M., y Miranda-Baeza, A. (2017). Biofloc technology (BFT): a tool for water quality management in aquaculture. *Water Quality*, 5: 92-109. doi: 10.5772/66416.
- Emerenciano, M., Gaxiola, G., y Cuzon, G. (2013). Biofloc technology (BFT): a review for aquaculture application and animal food industry. En: *Biomass now-cultivation and utilization*. IntechOpen, pp. 301-328. doi: 10.5772/53902.

- Estaki, M., Jiang, L., Bokulich, N. A., McDonald, D., González, A., Kosciolk, T., et al. (2020). QIIME 2 enables comprehensive end-to-end analysis of diverse microbiome data and comparative studies with publicly available data. *Current Protocols in Bioinformatics*, 70(1): e100. doi: 10.1002/cpbi.100.
- Fan, J., Chen, L., Mai, G., Zhang, H., Yang, J., Deng, D., y Ma, Y. (2019). Dynamics of the gut microbiota in developmental stages of *Litopenaeus vannamei* reveal its association with body weight. *Scientific Reports*, 9(1): 734.
- FAO. (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018. Meeting the sustainable development goals. Rome. Obtenido de <http://www.fao.org/3/ca0191en/ca0191en.pdf>
- FAO. (2020). The state of world fisheries and aquaculture. Sustainability in action. Rome. doi:<https://doi.org/10.4060/ca9229en>.
- Fatimah, N., Pande, G. S. J., Natrah, F. M. I., Meritha, W. W., Sucipto, A., y Ekasari, J. (2019). The role of microbial quorum sensing on the characteristics and functionality of bioflocs in aquaculture systems. *Aquaculture*, 504: 420-426.
- Ferreira, G. S., Santos, D., Schmachtl, F., Machado, C., Fernandes, V., Boegner, M., et al. (2021). Heterotrophic, chemoautotrophic and mature approaches in biofloc system for Pacific white shrimp. *Aquaculture*, 533: 736099. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.736099.
- Fimbres-Acedo, Y. E., Magallón-Servín, P., Garza-Torres, R., Emerenciano, M. G., Servín-Villegas, R., Endo, M., et al. (2020). *Oreochromis niloticus* aquaculture with biofloc technology, photoautotrophic conditions and *Chlorella* microalgae. *Aquaculture Research*, 51(8): 3323-3346. doi: 10.1111/are.14668.
- Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., Carpenter, K. E., y Niem, V. H. (1995). Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental. (Vol. I. *Plantas e invertebrados*). FAO, Roma.
- García-López, R., Cornejo-Granados, F., Lopez-Zavala, A. A., Sánchez-López, F., Cota-Huizar, A., Sotelo-Mundo, R. R., et al. (2020). Doing more with less: A comparison of 16S hypervariable regions in search of defining the shrimp microbiota. *Microorganisms*, 8(1): 134. doi: 10.3390/microorganisms8010134.
- Guemez-Sorhouet, E., Villarreal, H., Racotta, I. S., Naranjo, J., y Mercier, L. (2019). Zootechnical and physiological responses of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae reared in bioflocs and subjected to stress conditions during nursery phase. *Aquaculture Research*, 50(4): 1198-1211.
- Guo, H., Huang, L., Hu, S., Chen, C., Huang, X., Liu, W., et al. (2020). Effects of carbon/nitrogen ratio on growth, intestinal microbiota and metabolome of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Frontiers in Microbiology*, 11. doi: 10.3389/fmicb.2020.00652.
- Gutiérrez-Pérez, E. D., Vazquez-Juarez, R., Magallon-Barajas, F. J., Martinez-Mercado, M. A., Escobar-Zepeda, A., & Magallón-Servín, P. (2022). How a holobiome perspective could promote intensification, biosecurity and eco-efficiency in the shrimp aquaculture industry. *Frontiers in Marine Science*, 9: 975042. doi: 10.3389/fmars.2022.975042.
- Hamidoghli, A., Won, S., Farris, N. W., Bae, J., Choi, W., Yun, H., y Bai, S. C. (2020). Solid state fermented plant protein sources as fish meal replacers in whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Animal Feed Science and Technology*, 264: 114474.
- He, W., Rahimnejad, S., Wang, L., Song, K., Lu, K., y Zhang, C. (2017). Effects of organic acids and essential oils blend on growth, gut microbiota, immune response and disease resistance of pacific

- white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 70: 164–173. doi: 10.1016/j.fsi.2017.09.007.
- Hostins, B., Lara, G., Decamp, O., Cesar, D. E., y Wasielesky, J. W. (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. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.07.036.
- Hou, D., Huang, Z., Zeng, S., Liu, J., Weng, S., y He, J. (2018). Comparative analysis of the bacterial community compositions of the shrimp intestine, surrounding water and sediment. *Journal of Applied Microbiology*, 125: 792–799. doi: 10.1111/jam.13919.
- Hou, D., Zhou, R., Zeng, S., Wei, D., Deng, X., Xing, C., et al. (2021). Stochastic processes shape the bacterial community assembly in shrimp cultural pond sediments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(12): 5013-5022. doi: 10.1007/s00253-021-11378-9.
- Hu, X., Yang, H. L., Yan, Y. Y., Zhang, C. X., Ye, J. D., Lu, K. L., et al. (2019). Effects of fructooligosaccharide on growth, immunity and intestinal microbiota of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed diets with fish meal partially replaced by soybean meal. *Aquaculture Nutrition*, 25(1): 194-204. doi: 10.1111/anu.12843.
- Hua, K., Cobcroft, J. M., Cole, A., Condon, K., Jerry, D. R., Mangott, A., et al. (2019). The future of aquatic protein: implications for protein sources in aquaculture diets. *One Earth*, 1(3): 316-329.
- Huang, F., Pan, L., Song, M., Tian, C., y Gao, S. (2018). Microbiota assemblages of water, sediment, and intestine and their associations with environmental factors and shrimp physiological health. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102: 8585–8598. doi: 10.1007/s00253-018-9229-5.
- Huang, H. H., Luo, T., Lei, Y. J., Kuang, W. Q., Zou, W. S., y Yang, P. H. (2021). Water quality, shrimp growth performance and bacterial community in a reusing-water biofloc system for nursery of *Penaeus vananmei* rearing under a low salinity condition. *Aquaculture Reports*, 21: 100894. doi: 10.1016/j.aqrep.2021.100894.
- Huang, L., Guo, H., Chen, C., Huang, X., Chen, W., Bao, F., et al. (2020a). The bacteria from large-sized bioflocs are more associated with the shrimp gut microbiota in culture system. *Aquaculture*, 523: 735159. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735159.
- Huang, Z., Li, X., Wang, L., y Shao, Z. (2016). Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 47: 1737–1746. doi: 10.1111/are.12628.
- Huang, Z., Zeng, S., Xiong, J., Hou, D., Zhou, R., Xing, C., et al. (2020b). Microecological Koch's postulates reveal that intestinal microbiota dysbiosis contributes to shrimp white feces syndrome. *Microbiome*, 8: 1-13. doi: 10.1186/s40168-020-00802-3.
- Huerta-Rábago, J. A., Martínez-Porchas, M., Miranda-Baeza, A., Nieves-Soto, M., Rivas-Vega, M. E., y Martínez-Córdova, L. R. (2019). Addition of commercial probiotic in a biofloc shrimp farm of *Litopenaeus vannamei* during the nursery phase: Effect on bacterial diversity using massive sequencing 16S rRNA. *Aquaculture*, 502: 391-399. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.12.055.
- Inoguchi, S., Ohashi, Y., Narai-Kanayama, A., Aso, K., Nakagaki, T., y Fujisawa, T. (2012). Effects of non-fermented and fermented soybean milk intake on faecal microbiota and faecal metabolites in humans. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(4): 402-410.
- Instituto Nacional de Pesca. (9 de Septiembre de 2013). Instituto Nacional de Pesca: Acuicultura comercial. Obtenido de Camarón blanco del Pacífico: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/308082/02camaron_blanco_pacifico.pdf.

- Instituto Sinaloense de Acuicultura. Gobierno de México. 2009. Obtenido de CONAPESCA: https://cadenasproductivas.conapesca.gob.mx/pdf_documentos/comites/csp/Programa_Maestro_Estatal_CamaronAltamar_Sinaloa.pdf.
- Jannathulla, R., Dayal, J. S., Vasanthakumar, D., Ambasankar, K., y Muralidhar, M. (2017). Effect of fermentation methods on amino acids, fiber fractions and anti-nutritional factors in different plant protein sources and essential amino acid index for *Penaeus vannamei* Boone, 1931. *Indian Journal of Fisheries*, 64(2): 40-47.
- Jannathulla, R., Dayal, J. S., Vasanthakumar, D., Ambasankar, K., y Muralidhar, M. (2018). Effect of fungal fermentation on apparent digestibility coefficient for dry matter, crude protein and amino acids of various plant protein sources in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 24(4): 1318-1329.
- Kang, H. Y., Yang, P. Y., Dominy, W. G., y Lee, C. S. (2010). Bioprocessing papaya processing waste for potential aquaculture feed supplement—Economic and nutrient analysis with shrimp feeding trial. *Bioresource Technology*, 101(20): 7973-7979.
- Khanjani, M. H., Mohammadi, A., y Emerenciano, M. G. C. (2022). Microorganisms in biofloc aquaculture system. *Aquaculture Reports*, 26: 101300. doi: 10.1016/j.aqrep.2022.101300.
- Koslicki, D., Foucart, S., y Rosen, G. (2014). WGSQuikr: fast whole-genome shotgun metagenomic classification. *PLOS ONE*, 9(3): e91784.
- Krummenauer, D., Abreu, P. C., Poersch, L., Reis, P. A. C. P., Suita, S. M., dos Reis, W. G., y Wasielesky Jr, W. (2020). The relationship between shrimp (*Litopenaeus vannamei*) size and biofloc consumption determined by the stable isotope technique. *Aquaculture*, 529: 735635. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735635.
- Lai, L. R., Hsieh, S. C., Huang, H. Y., y Chou, C. C. (2013). Effect of lactic fermentation on the total phenolic, saponin and phytic acid contents as well as anti-colon cancer cell proliferation activity of soymilk. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115(5): 552-556.
- Landsman, A., St-Pierre, B., Rosales-Leija, M., Brown, M., y Gibbons, W. (2019). Investigation of the potential effects of host genetics and probiotic treatment on the gut bacterial community composition of aquaculture-raised Pacific whiteleg shrimp, *litopenaeus vannamei*. *Microorganisms*, 7(8): 217.
- Leigh, D. (2009). SWOT analysis. En: *Handbook of improving performance in the workplace*. Wiley, San Francisco, CA. pp. 115-140. doi: 10.1002/9780470592663.ch24.
- Lewis, K., Epstein, S., D'onofrio, A., y Ling, L. L. (2010). Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 63(8): 468-476.
- Liu, G., Deng, Y., Verdegem, M., Ye, Z., y Zhu, S. (2019). Using poly (β -hydroxybutyrate- β -hydroxyvalerate) as carbon source in biofloc-systems: Nitrogen dynamics and shift of *Oreochromis niloticus* gut microbiota. *Science of the Total Environment*, 694: 133664.
- Liñan-Vidriales, M. A., Peña-Rodríguez, A., Tovar-Ramírez, D., Elizondo-González, R., Barajas-Sandoval, D. R., Ponce-Gracia, E. I., et al. (2021). Effect of rice bran fermented with *Bacillus* and *Lysinibacillus* species on dynamic microbial activity of Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 531: 735958.
- Luo, G., Chen, X., Tan, J., Abakari, G., y Tan, H. (2020). Effects of carbohydrate addition strategy and biofloc levels on the establishment of nitrification in biofloc technology aquaculture systems. *Aquaculture*, 514: 734441.

- Martins, M. A., Poli, M. A., Legarda, E. C., Pinheiro, I. C., Carneiro, R. F. S., Pereira, S. A., et al. (2020). Heterotrophic and mature biofloc systems in the integrated culture of Pacific white shrimp and Nile tilapia. *Aquaculture*, 514: 734517.
- Martínez-Porchas, M., y Vargas-Albores, F. (2017). Microbial metagenomics in aquaculture: a potential tool for a deeper insight into the activity. *Reviews in Aquaculture*, 9(1): 42-56.
- Martínez-Córdova, L. R., Martínez-Porchas, M., y Cortés-Jacinto, E. (2014). Alimentos y estrategias de alimentación para una acuicultura sustentable. Universidad de Sonora-AGT Editor, México.
- Martínez-Córdova, L. R., Vargas-Albores, F., Garibay-Valdez, E., Ortíz-Estrada, Á. M., Porchas-Cornejo, M. A., Lago-Lestón, A., y Martínez-Porchas, M. (2018). Amaranth and wheat grains tested as nucleation sites of microbial communities to produce bioflocs used for shrimp culture. *Aquaculture*, 497: 503-509. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.08.031.
- Mazon-Suastegui, J. M., Salas-Leiva, J. S., Medina-Marrero, R., Medina-García, R., y García-Bernal, M. (2020). Effect of *Streptomyces* probiotics on the gut microbiota of *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *MicrobiologyOpen* 9: e967. doi: 10.1002/mbo3.967.
- McLean, E., Barrows, F. T., Craig, S. R., Alfrey, K., y Tran, L. (2020). Complete replacement of fishmeal by soybean and poultry meals in Pacific whiteleg shrimp feeds: Growth and tolerance to EMS/AHPND and WSSV challenge. *Aquaculture*, 527: 735383.
- Meng, L. J., Hu, X., Wen, B., Liu, Y. H., Luo, G. Z., Gao, J. Z., y Chen, Z. Z. (2023). Microplastics inhibit biofloc formation and alter microbial community composition and nitrogen transformation function in aquaculture. *Science of The Total Environment*, 866: 161362. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.161362.
- Nedwell, D. B. (1999). Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. *FEMS Microbiology Ecology*, 30: 101-111.
- Neilson, J. W., Jordan, F. L., y Maier, R. M. (2013). Analysis of artifacts suggests DGGE should not be used for quantitative diversity analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 92: 256-263.
- Ortiz-Estrada, Á. M., Gollas-Galván, T., Martínez-Córdova, L. R., y Martínez-Porchas, M. (2019). Predictive functional profiles using metagenomic 16S rRNA data: a novel approach to understanding the microbial ecology of aquaculture systems. *Reviews in Aquaculture*, 11: 234-245.
- Palmonari, A., Cavallini, D., Sniffen, C. J., Fernandes, L., Holder, P., Fagioli, L., et al. (2020). Characterization of molasses chemical composition. *Journal of Dairy Science*, 103: 6244-6249.
- Panigrahi, A., Saranya, C., Ambiganandam, K., Sundaram, M., y Sivakumar, M. R. (2020). Evaluation of biofloc generation protocols to adopt high density nursery rearing of *Penaeus vannamei* for better growth performances, protective responses and immuno modulation in biofloc based technology. *Aquaculture*, 522: 735095.
- Panigrahi, A., Saranya, C., Sundaram, M., Kannan, S. V., Das, R. R., Kumar, R. S., et al. (2018). Carbon: Nitrogen (C: N) ratio level variation influences microbial community of the system and growth as well as immunity of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in biofloc based culture system. *Fish & Shellfish Immunology*, 81: 329-337.
- Peters, B. M., Jabra-Rizk, M. A., O'May, G. A., Costerton, J. W., y Shirliff, M.E. (2012). Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 25: 193-213. doi: 10.1128/CMR.00013-11.
- Philippot, L., Andersson, S., Battin, T., Prosser, J., Schimel, J., Whitman, W., y Hallin, S. (2010). The ecological coherence of high bacterial taxonomic ranks. *Nature reviews microbiology*, 8: 523-529.

- Philippot, L., Andersson, S. G., Battin, T. J., Prosser, J. I., Schimel, J. P., Whitman, W. B., y Hallin, S. (2010). The ecological coherence of high bacterial taxonomic ranks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(7): 523-529. doi: 10.1038/nrmicro2367.
- Pimentel, O. A. L. F., Amado, A. M., y They, N. H. (2023). Biofloc colors as an assessment tool for water quality in shrimp farming with BFT systems. *Aquacultural Engineering*, 101: 102321. doi: 10.1016/j.aquaeng.2023.102321.
- Pomeroy, R., Dey, M. M., y Plesha, N. (2014). The social and economic impacts of semi-intensive aquaculture on biodiversity. *Aquaculture Economics & Management*, 18: 303–324. doi: 10.1080/13657305.2014.926467.
- Prangnell, D. I., Lupatsch, I., Treece, G. D., y Samocha, T. M. (2019). Shrimp biology. En: *Sustainable biofloc systems for marine shrimp*. Academic Press, pp. 19-27. doi: 10.1016/B978-0-12-818040-2.00002-2.
- Prescott, S. L. (2017). History of medicine: Origin of the term microbiome and why it matters. *Human Microbiome Journal*, 4: 24-25. doi: 10.1016/j.humic.2017.05.004.
- Prosser, J. I., Bohannan, B. J., Curtis, T. P., Ellis, R. J., Firestone, M. K., Freckleton, R. P., et al. (2007). The role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology*, 5(5): 384-392. doi: 10.1038/nrmicro1643.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B. M., Ludwig, W., Peplies, J., y Glöckner, F. O. (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*, 35: 7188-7196. doi: 10.1093/nar/gkm864.
- Qiao, F., Liu, Y. K., Sun, Y. H., Wang, X. D., Chen, K., Li, T. Y., et al. (2017). Influence of different dietary carbohydrate sources on the growth and intestinal microbiota of *Litopenaeus vannamei* at low salinity. *Aquaculture Nutrition*, 23: 444–452. doi: 10.1111/anu.12412.
- Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., y Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature Biotechnology*, 35(9): 833-844. doi: 10.1038/nbt.3935.
- Rajeev, M., Jung, I., Song, J., Kang, I., y Cho, J. C. (2023). Comparative microbiota characterization unveiled a contrasting pattern of floc-associated versus free-living bacterial communities in biofloc aquaculture. *Aquaculture*, 577: 739946. doi: 10.1016/j.aquaculture.2023.739946.
- Rappé, M. S., y Giovannoni, S. J. (2003). The uncultured microbial majority. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1): 369-394.
- Ray, A. J., y Lotz, J. M. (2014). Comparing a chemoautotrophic-based biofloc system and three heterotrophic-based systems receiving different carbohydrate sources. *Aquacultural Engineering*, 63: 54-61.
- Ray, B., y Bhunia, A. (2010). *Fundamentos de microbiología de los alimentos*. McGraw Hill, México.
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., y Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4: e2584. doi: 10.7717/peerj.2584.
- Rungrassamee, W., Klanchui, A., Maibunkaew, S., y Karoonuthaisiri, N. (2016). Bacterial dynamics in intestines of the black tiger shrimp and the Pacific white shrimp during *Vibrio harveyi* exposure. *Journal of Invertebrate Pathology*, 133: 12-19. doi: 10.1016/j.jip.2015.11.004 .
- Salvesen, I., Skjermo, J., y Vadstein, O. (1999). Growth of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) during first feeding in relation to the proportion of r/K-strategists in the bacterial community of the rearing water. *Aquaculture*, 175(3-4): 337-350. doi: 10.1016/S0044-8486(99)00110-6.
- Samocha, T. M. (2019). *Sustainable biofloc systems for marine shrimp*. Academic press, San Diego, CA.
- Schroeder, B. O., y Bäckhed, F. (2016). Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nature Medicine*, 22(10): 1079-1089.

- De Schryver, P., y Vadstein, O. (2014). Ecological theory as a foundation to control pathogenic invasion in aquaculture. *The ISME Journal*, 8(12): 2360-2368.
- Schweitzer, R., Fonseca, G., Orteney, N., Menezes, F. C. T., Thompson, F. L., Thompson, C. C., y Gregoracci, G. B. (2020). The role of sedimentation in the structuring of microbial communities in biofloc-dominated aquaculture tanks. *Aquaculture*, 514: 734493. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734493.
- Shiu, Y. L., Wong, S. L., Guei, W. C., Shin, Y. C., y Liu, C. H. (2015). Increase in the plant protein ratio in the diet of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone), using *Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal as a replacement. *Aquaculture Research*, 46(2): 382-394.
- SIAP. 2020. Panorama agroalimentario. Obtenido de Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera: https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2020/Atlas-Agroalimentario-2020.
- SIAP. 2019. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Obtenido de Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera: https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2019/Atlas-Agroalimentario-2019.
- Simoës, N., Jones, D., S., S.-R., Roque, A., y Gómez-Gil, B. (2002). Las bacterias en el inicio de la alimentación exógena en larvas de camarones peneidos: efectos de la calidad del agua, tasas de ingestión y rutas de colonización del tracto digestivo. En L. E. Cruz-Suárez, D. Rique-Marie, M. Tapia-Salazar, M. G. Gaxiola-Cortés, & N. Simoës, *Avances en Nutrición Acuícola VI*. Cancún, Quintana Roo, México: Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.
- Skjermo, J., Salvesen, I., Øie, G., Olsen, Y., and Vadstein, O. (1997). Microbially matured water: a technique for selection of a non-opportunistic bacterial flora in water that may improve performance of marine larvae. *Aquaculture International*, 5: 13-28. doi: 10.1007/BF02764784.
- Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., y Van Sinderen, D. (2005). Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(2): 198-203.
- Su, H., Hu, X., Xu, Y., Xu, W., Huang, X., Wen, G., et al. (2018). Persistence and spatial variation of antibiotic resistance genes and bacterial populations change in reared shrimp in south China. *Environment International*, 119: 327–333. doi: 10.1016/j.envint.2018.07.007.
- Tardy, V., Mathieu, O., Lévêque, J., Terrat, S., Chabbi, A., Lemanceau, P., et al. (2014). Stability of soil microbial structure and activity depends on microbial diversity. *Environmental Microbiology Reports*, 6(2): 173-183. doi: 10.1111/1758-2229.12126.
- Vadstein, O., Attramadal, K. J., Bakke, I., y Olsen, Y. (2018). K-selection as microbial community management strategy: a method for improved viability of larvae in aquaculture. *Frontiers in Microbiology*, 9: 2730. doi: 10.3389/fmicb.2018.02730.
- Vargas-Albores, F., Martínez-Córdova, L. R., Gollas-Galván, T., Garibay-Valdez, E., Emerenciano, M. G. C., Lago-Leston, A., et al. (2019). Inferring the functional properties of bacterial communities in shrimp-culture bioflocs produced with amaranth and wheat seeds as fouler promoters. *Aquaculture*, 500: 107-117. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.10.005.
- Vázquez-Baeza, Y., Pirrung, M., Gonzalez, A., y Knight, R. (2013). EMPEROR: a tool for visualizing high-throughput microbial community data. *Gigascience*, 2: 2047-217X. doi: 10.1186/2047-217X-2-16
- Verstraete, W., y De Vrieze, J. (2017). Microbial technology with major potentials for the urgent environmental needs of the next decades. *Microbial Biotechnology*, 10(5): 988-994.
- Wang, H., Huang, J., Wang, P., y Li, T. (2020). Insights into the microbiota of larval and postlarval Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) along early developmental stages: a case in pond level. *Molecular Genetics and Genomics*, 295(6): 1517-1528. doi: 10.1007/s00438-020-01717-2

- Wei, Y. F., Wang, A. L., y Liao, S. A. (2020). Effect of different carbon sources on microbial community structure and composition of ex-situ biofloc formation. *Aquaculture*, 515: 734492. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734492.
- Whipps, J. M., Lewis, K., y Cooke, R. C. (1988). Mycoparasitism and plant disease control. En: *Fungi in biological control systems*. Manchester University Press, UK. pp. 161-187.
- Xia, Y., y Sun, J. (2023a). Alpha diversity. En: *Bioinformatic and statistical analysis of microbiome data*. Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-031-21391-5_9.
- Xia, Y., y Sun, J. (2023b). Linear mixed-effects models for longitudinal microbiome Data. En: *Bioinformatic and statistical analysis of microbiome data*. Springer: Cham. doi: 10.1007/978-3-031-21391-5_15.
- Xiong, J., Dai, W., y Li, C. (2016). Advances, challenges, and directions in shrimp disease control: the guidelines from an ecological perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100: 6947-6954.
- Xiong, J., Wang, K., Wu, J., Qiuqian, L., Yang, K., Qian, Y., y Zhang, D. (2015). Changes in intestinal bacterial communities are closely associated with shrimp disease severity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99: 6911-6919. doi: 10.1007/s00253-015-6632-z.
- Xu, W. J., Morris, T. C., y Samocho, T. M. (2016). Effects of C/N ratio on biofloc development, water quality, and performance of *Litopenaeus vannamei* juveniles in a biofloc-based, high-density, zero-exchange, outdoor tank system. *Aquaculture*, 453: 169-175. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.11.021.
- Yang, W., Zhu, J., Zheng, C., Lukwambe, B., Nicholaus, R., Lu, K., y Zheng, Z. (2020). Succession of phytoplankton community during intensive shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultivation and its effects on cultivation systems. *Aquaculture*, 520: 734733. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734733.
- Yao, Z., Yang, K., Huang, L., Huang, X., Qiuqian, L., Wang, K., et al. (2018). Disease outbreak accompanies the dispersive structure of shrimp gut bacterial community with a simple core microbiota. *AMB Express*, 8: 120. doi: 10.1186/s13568018-0644-x.
- Zapata, F., y Rondán, V. (2016). La investigación-acción participativa. Instituto de Montaña, Perú, 1-58.
- Zeng, S., Huang, Z., Hou, D., Liu, J., Weng, S., y He, J. (2017). Composition, diversity and function of intestinal microbiota in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at different culture stages. *PeerJ*, 5: e3986.
- Zhang, M., Pan, L., Fan, D., He, J., Su, C., Gao, S., y Zhang, M. (2021). Study of fermented feed by mixed strains and their effects on the survival, growth, digestive enzyme activity and intestinal flora of *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 530: 735703.
- Zhao, Y., Zhang, X. X., Zhao, Z., Duan, C., Chen, H., Wang, M., et al. (2018). Metagenomic analysis revealed the prevalence of antibiotic resistance genes in the gut and living environment of freshwater shrimp. *Journal of Hazardous Materials*, 350: 10–18. doi: 10.1016/j.jhazmat.2018.02.004.
- Zhou, J., y Ning, D. (2017). Stochastic community assembly: does it matter in microbial ecology? *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(4): 10-1128. doi: 10.1128/MMBR.00002-17.

11. ANEXO

Anexo A.-Estudio Longitudinal y Estabilidad de comunidades bacterianas asociadas a bioflocs por el perfil taxonómico del gen 16S ARNr.

Tabla 1. Resultados del modelo de efectos mixtos lineales

	Coef.	Std.Err.	z	P> z 	[0.025	0.975]
Intercept	0.52	0.049	10.713	0	0.425	0.615
Pond_group[T.B]	0.023	0.061	0.372	0.71	-0.098	0.143
Pond_group[T.C]	0.082	0.062	1.333	0.182	-0.039	0.203
Pond_group[T.D]	0.025	0.066	0.38	0.704	-0.104	0.154
Culture_day	0.005	0.001	5.293	0	0.003	0.007
Culture_day:Pond_group[T.B]	-0.001	0.001	-1.022	0.307	-0.004	0.001
Culture_day:Pond_group[T.C]	-0.001	0.001	-1.147	0.251	-0.004	0.001
Culture_day:Pond_group[T.D]	0.001	0.001	0.413	0.679	-0.002	0.003
Phase	0.09	0.036	2.488	0.013	0.019	0.162
Pond_group[T.B]:Phase	-0.032	0.048	-0.678	0.498	-0.126	0.061
Pond_group[T.C]:Phase	-0.081	0.048	-1.705	0.088	-0.175	0.012
Pond_group[T.D]:Phase	-0.038	0.05	-0.756	0.45	-0.135	0.06
Culture_day:Phase	-0.002	0	-3.971	0	-0.003	-0.001
Culture_day:Pond_group[T.B]:Phase	0	0.001	0.781	0.435	-0.001	0.002
Culture_day:Pond_group[T.C]:Phase	0.001	0.001	1.469	0.142	0	0.002
Culture_day:Pond_group[T.D]:Phase	0	0.001	0.214	0.831	-0.001	0.001
Group Var	0.001	0.009				

Tabla 2. ANCOM: Abundancia percentil de taxones a nivel de género por fase.

Fase	1					2					3				
	0.0	25.0	50.0	75.0	100.0	0.0	25.0	50.0	75.0	100.0	0.0	25.0	50.0	75.0	100.0
Cyanobacteria	1.0	18.0	100.5	249.25	4153.0	1.0	1.0	3.0	28.0	11058.0	1.0	3.00	10.0	16.75	818.0
Acidobacteriae	1.0	1.0	1.0	2.00	56.0	1.0	6.0	13.0	27.0	178.0	1.0	2.00	8.0	15.75	45.0
Gammaproteobacteria	16.0	119.0	328.5	1023.75	4111.0	1.0	84.0	234.0	483.0	7146.0	96.0	435.0	780.0	1566.00	3965.0
Desulfuromonada	1.0	1.0	6.5	37.50	13633.0	1.0	2.0	39.0	379.0	7216.0	1.0	49.50	257.5	1129.00	3598.0
Rhodothermia	1.0	1.0	5.5	60.00	1736.0	1.0	1.0	2.0	9.0	2763.0	1.0	1.00	5.0	16.00	120.0
Actinobacteria	1.0	1.0	1.0	1.00	129.0	1.0	3.0	7.0	16.0	256.0	1.0	5.00	9.5	40.75	214.0
Kapabacteria	1.0	1.0	1.0	4.00	518.0	1.0	1.0	6.0	32.0	451.0	1.0	3.25	10.5	42.00	2631.0
Dadabacteriia	1.0	1.0	1.0	2.75	42.0	1.0	1.0	1.0	1.0	4.0	1.0	1.00	1.0	1.00	1.0
Oligoflexia	1.0	1.0	1.0	1.00	23.0	1.0	1.0	1.0	1.0	23.0	1.0	1.00	1.0	6.75	180.0
Polyangia	1.0	1.0	1.0	1.00	124.0	1.0	1.0	6.0	19.0	127.0	1.0	2.25	10.0	17.75	111.0
Gracilibacteria	1.0	1.0	1.0	4.00	520.0	1.0	3.0	10.0	28.0	218.0	1.0	1.00	7.5	16.75	142.0

Bdellovibrionia	1.0	3.0	14.0	63.00	650.0	1.0	13.0	35.0	101.0	848.0	1.0	32.25	65.5	157.0	1158.0
Vampirivibrionia	1.0	1.0	1.0	1.00	4635.0	1.0	1.0	4.0	28.0	16304.0	1.0	1.00	1.0	9.75	222.0
Alphaproteobacteria	168.0	1046.5	1608.5	2484.50	10522.0	608.0	2277.0	4275.0	8938.0	22906.0	269.0	1723.50	2818.5	5022.25	13034.0
Sumerlaeia	1.0	1.0	1.0	3.00	246.0	1.0	1.0	8.0	23.0	421.0	1.0	3.25	6.5	11.00	87.0
NB1-j	1.0	1.0	1.0	1.00	61.0	1.0	1.0	4.0	13.0	81.0	1.0	1.00	3.5	6.75	41.0

Tabla 3. ANCOM: Abundancia percentil de taxones a nivel de ASVs por fase.

Fase	1					2					3				
	0.0	25.0	50.0	75.0	100.0	0.0	25.0	50.0	75.0	100.0	0.0	25.0	50.0	75.0	100.0
Alteromonadales	1	1	1	1	19	1	1	1	9	187	1	20	51.5	118.75	459
Alteromonadales	1	1	1	1	41	1	1	3	16	393	13	54.25	138.5	293.75	1064
Alteromonadales	1	1	1	1	30	1	1	1	17	302	10	42.5	103.5	234.5	922
Beijerinckiaceae	1	1	10	47.5	521	1	1	11	30	590	1	1	1	1	23
Rhodobacteraceae	1	1	1	1	58	1	4	14	50	656	1	3.5	9	22.75	323
Rhodobacteraceae	1	1	1	1	222	1	6	20	38	1825	1	1	1	5.5	25
Flavobacteriaceae	1	1	1	6	60	1	7	16	36	360	1	12.25	26	69.75	678

Rhodobacteraceae	1	1	1	1	402	1	1	12	80	1253	1	1	1	7.25	139
Algoriphagus	1	1	4	129.25	1726	1	1	1	1	248	1	1	1	1	1
Flavobacteriaceae	1	1	1	2.75	40	1	1	14	38	308	1	12	25	69.25	625

Nota: para una mayor comprensión se sustituyó el ID del ASV por la clasificación taxonómica correspondiente. Se muestran los principales (10) resultados de 269.

Tabla 4. ANCOM: Abundancia percentil de taxones a nivel de ASVs por tratamiento.

Tratamiento	A					B					C					D					
	Percentil	0	25	50	75	100	0	25	50	75	100	0	25	50	75	100	0	25	50	75	100
Cyanobacterii a	1. 0	1. 0	1. 0	1. 0	70.0	1. 0	1. 0	9.0	57.5	494.0	1. 0	1. 0	1. 0	1. 0	2274. 0	1. 0	1. 0	1. 0	1. 0	1. 0	392. 0
Cyanobacterii a	1. 0	1. 0	1. 0	1. 0	157. 0	1. 0	1. 0	16. 0	134. 5	1623. 0	1. 0	1. 0	1. 0	1. 0	5075. 0	1. 0	1. 0	1. 0	1. 0	1. 0	771. 0
Cyanobacterii a	1. 0	1. 0	1. 0	1. 0	126. 0	1. 0	1. 0	11. 0	101. 5	1397. 0	1. 0	1. 0	1. 0	1. 0	3711. 0	1. 0	1. 0	1. 0	1. 0	1. 0	631. 0

Nota: para una mayor comprensión se sustituyó el ID del ASV por la clasificación taxonómica correspondiente

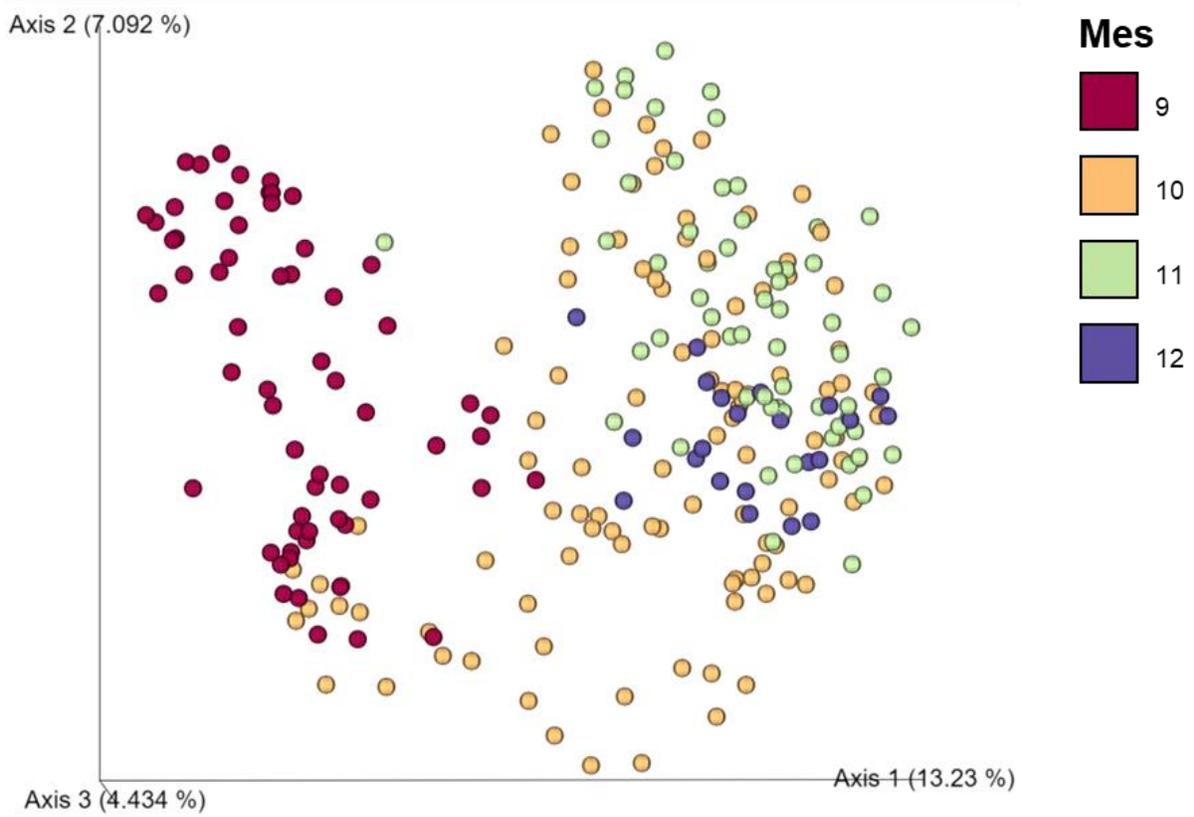


Figura 1. PCoA de Unweighted UniFrac por 'Mes'. 9) septiembre, 10) octubre, 11) noviembre y 12) diciembre.

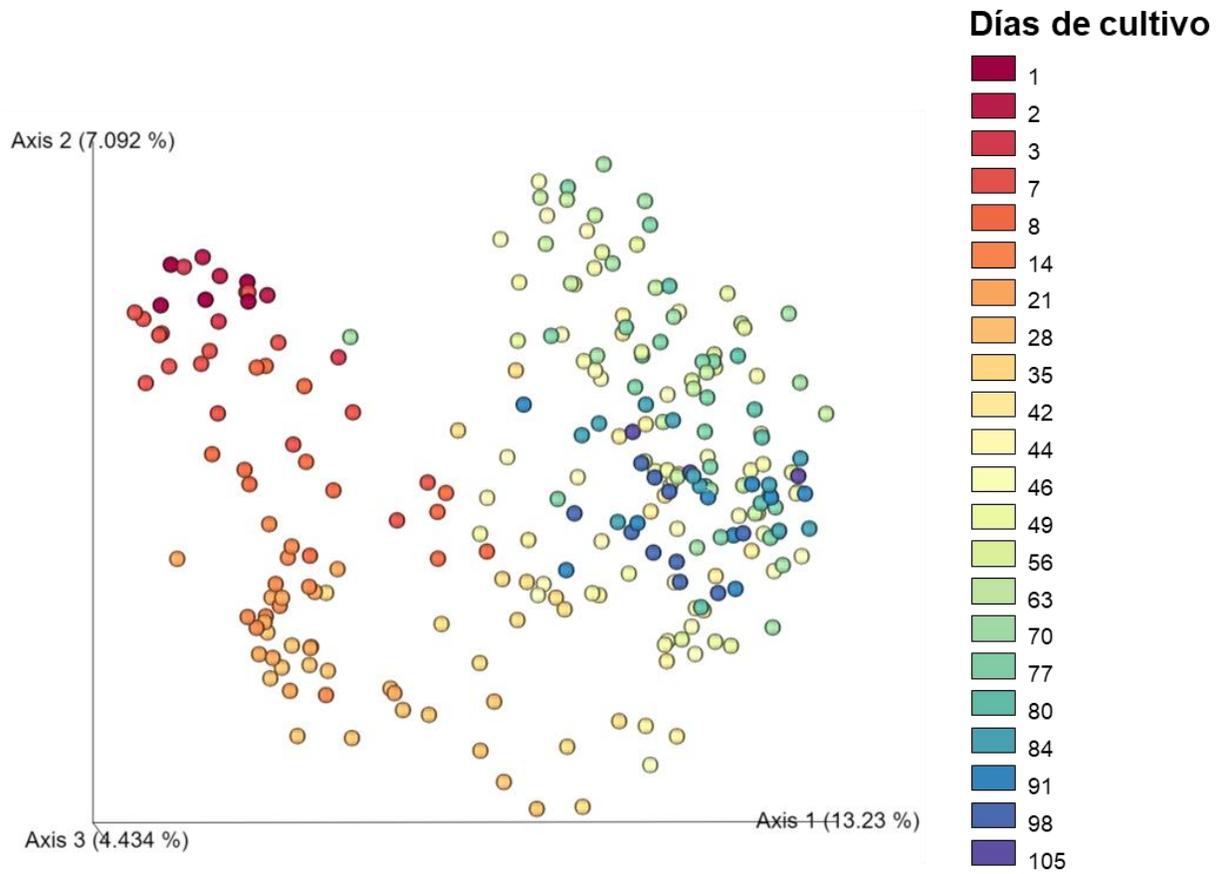


Figura 2. PCoA de Unweighted UniFrac por 'Día de cultivo'.

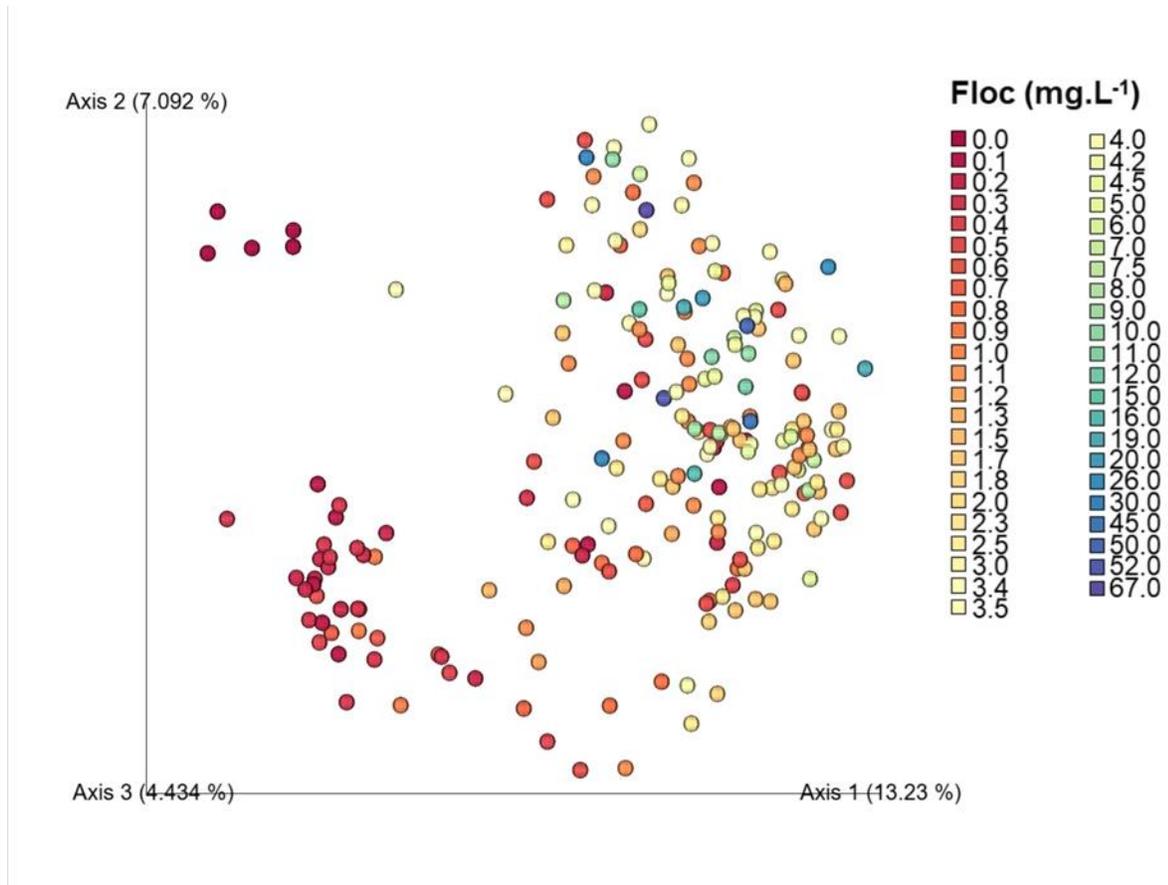


Figura 3. PCoA de Unweighted UniFrac por 'concentración de Floc'.

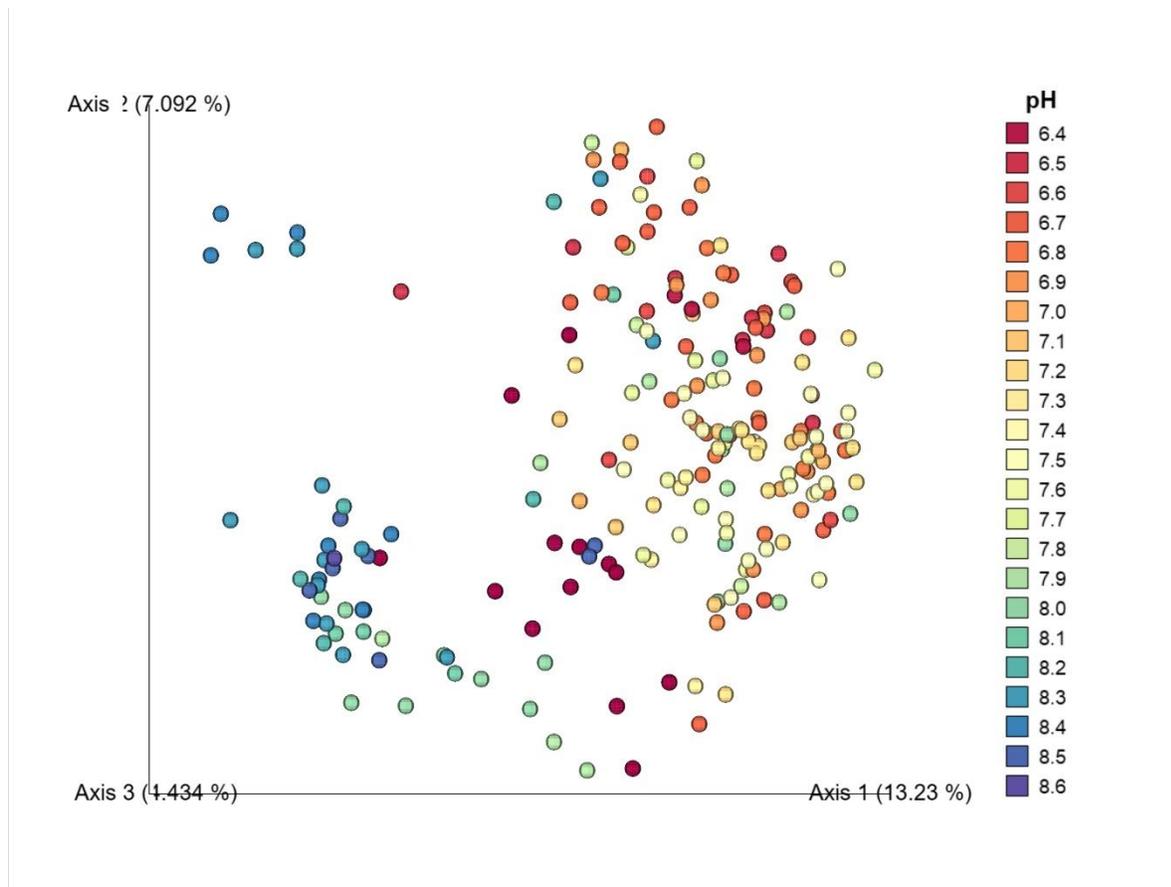


Figura 4. PCoA de Unweighted UniFrac por 'pH'.

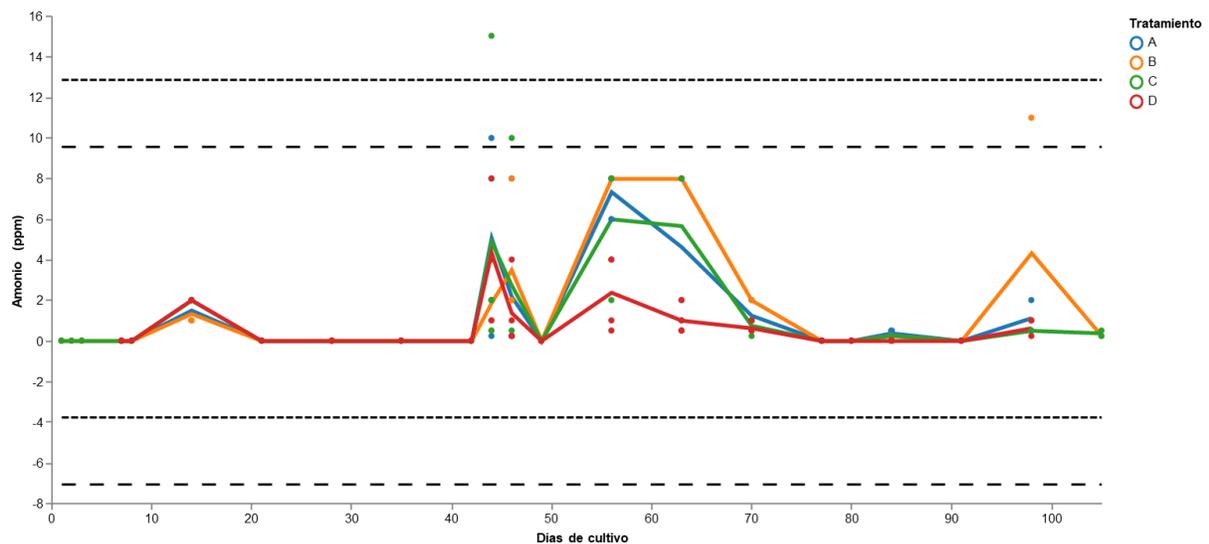


Figura 5. Gráfico de la volatilidad temporal del amonio por "Tratamiento". A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar (+/- 2x y 3x) de la media general.

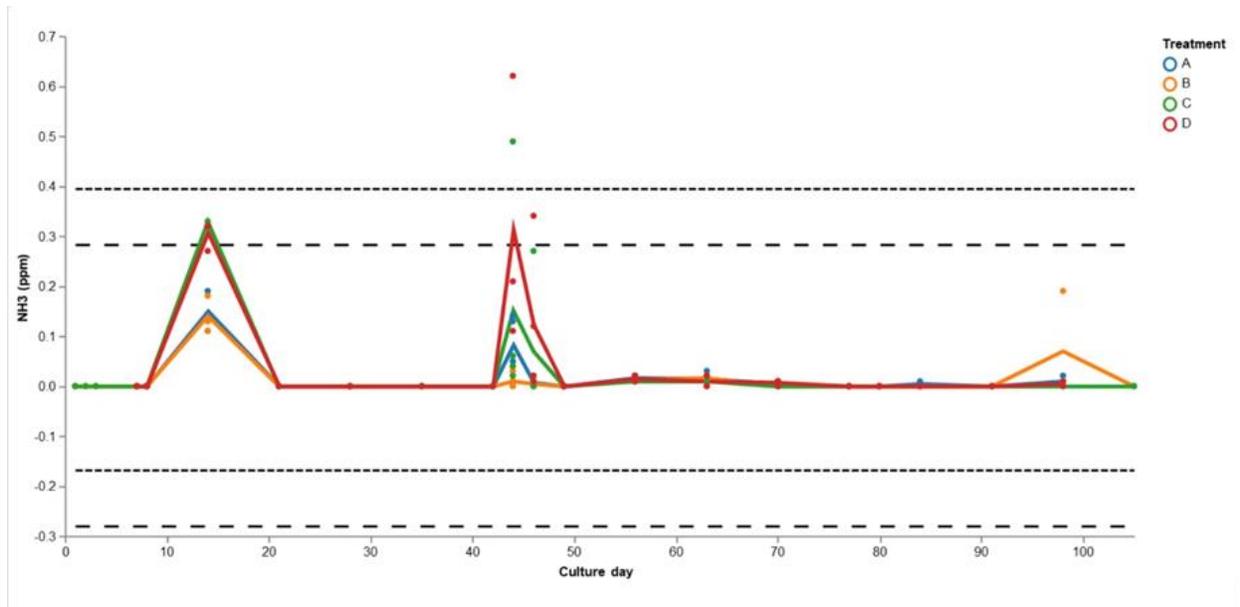


Figura 6. Gráfico de la volatilidad temporal del nitrógeno tóxico por "Tratamiento". A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar (+/- 2x y 3x) de la media general.

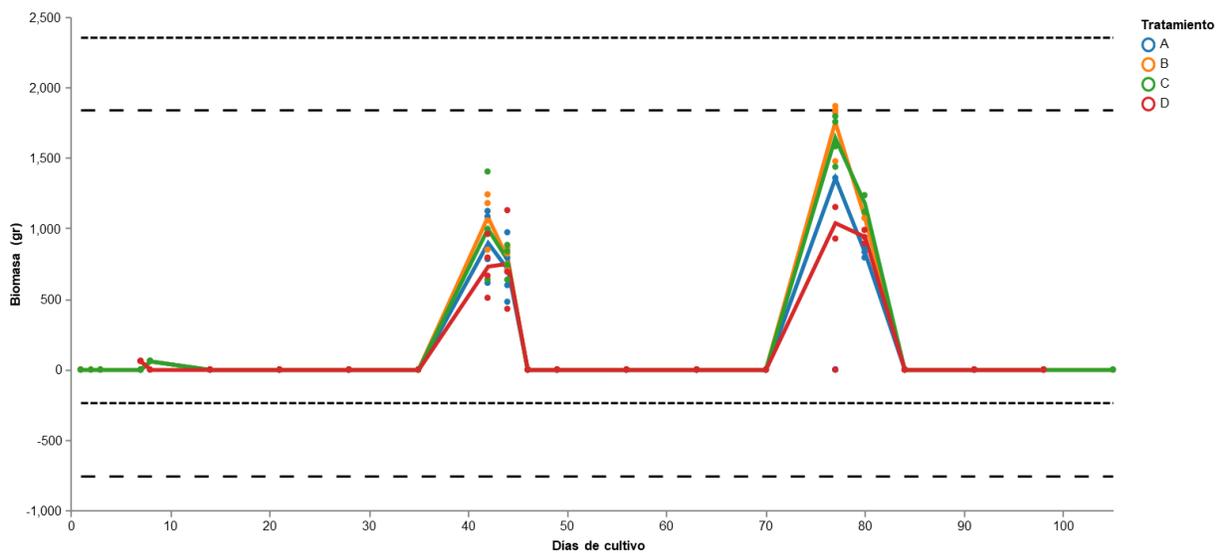


Figura 7. Gráfico de la volatilidad temporal de la biomasa de organismos según el "Tratamiento". A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar (+/- 2x y 3x) respecto a la media general.

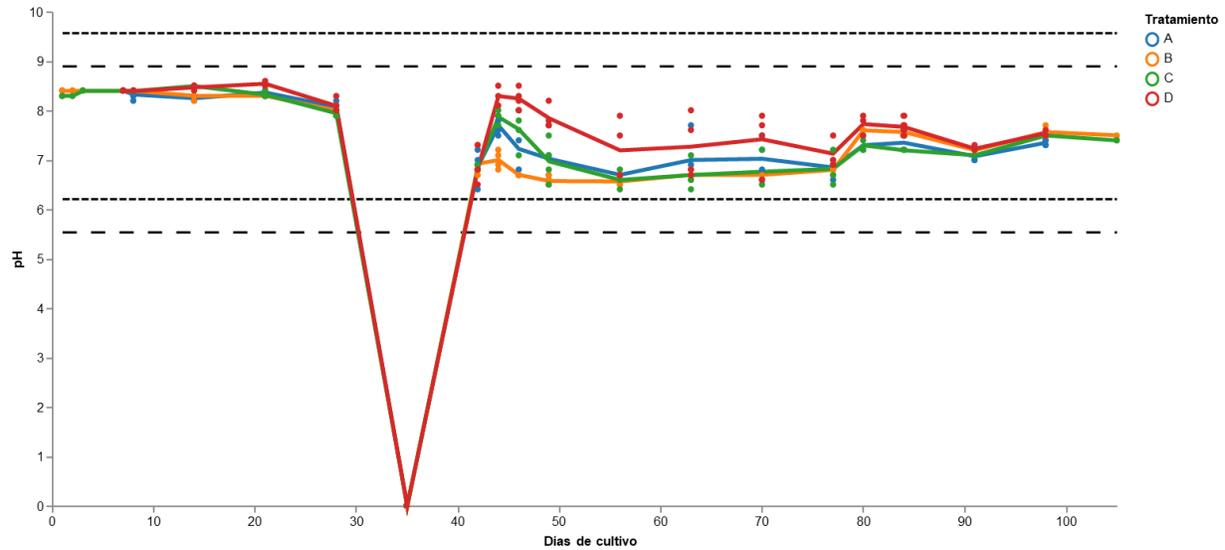


Figura 8. Gráfico de la volatilidad temporal del pH por "Tratamiento". A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar (+/- 2x y 3x) respecto a la media general.

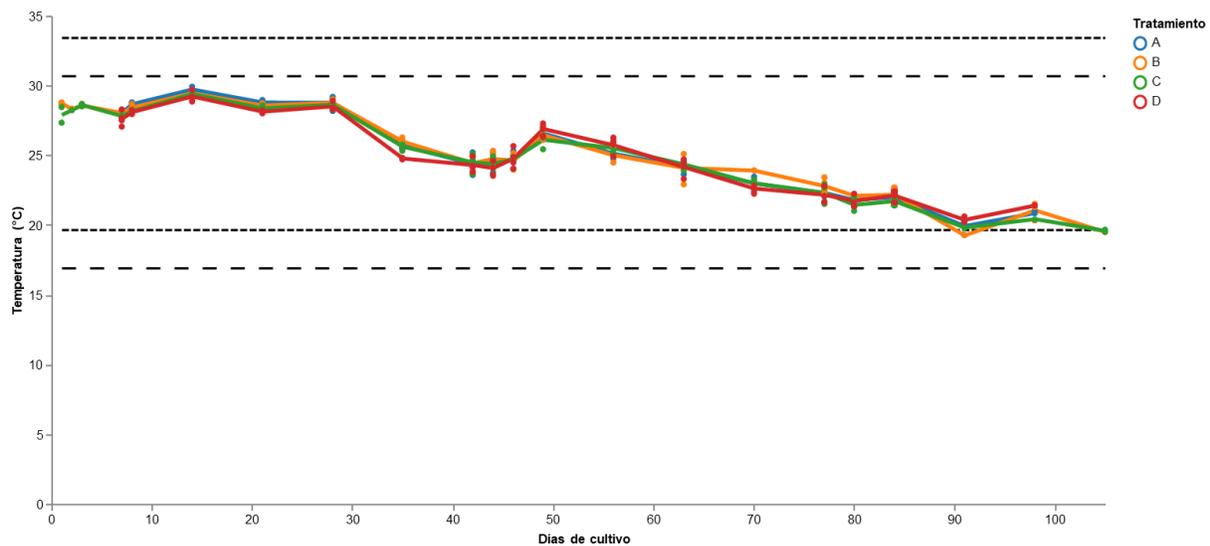


Figura 9. Gráfico de la volatilidad temporal de la temperatura según el "Tratamiento". A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar (+/- 2x y 3x) respecto a la media general.

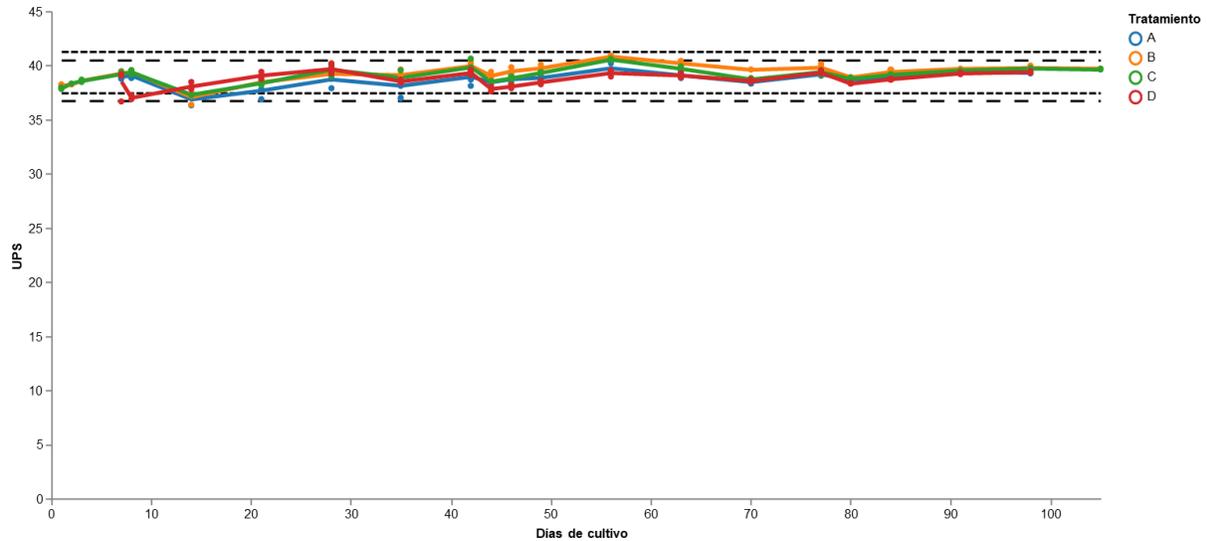


Figura 10. Gráfico de la volatilidad temporal de la salinidad por "Tratamiento". A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar ($\pm 2x$ y $3x$) respecto a la media general.

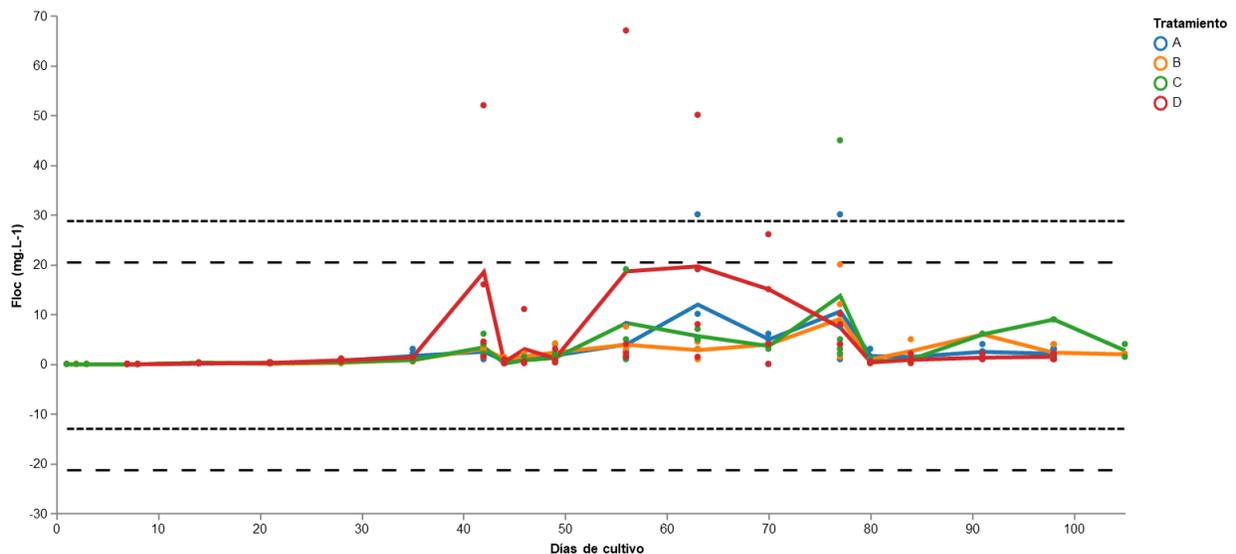


Figura 11. Gráfico de la volatilidad temporal de la cantidad de floc por "Tratamiento". A) Probiótico Heterotrófico, B) Probiótico Quimiotrófico-Microalga, C) Probiótico Quimiotrófico y D) Maduración tradicional sin probiótico específico. Las líneas punteadas indican múltiplos de la desviación estándar ($\pm 2x$ y $3x$) respecto a la media general.

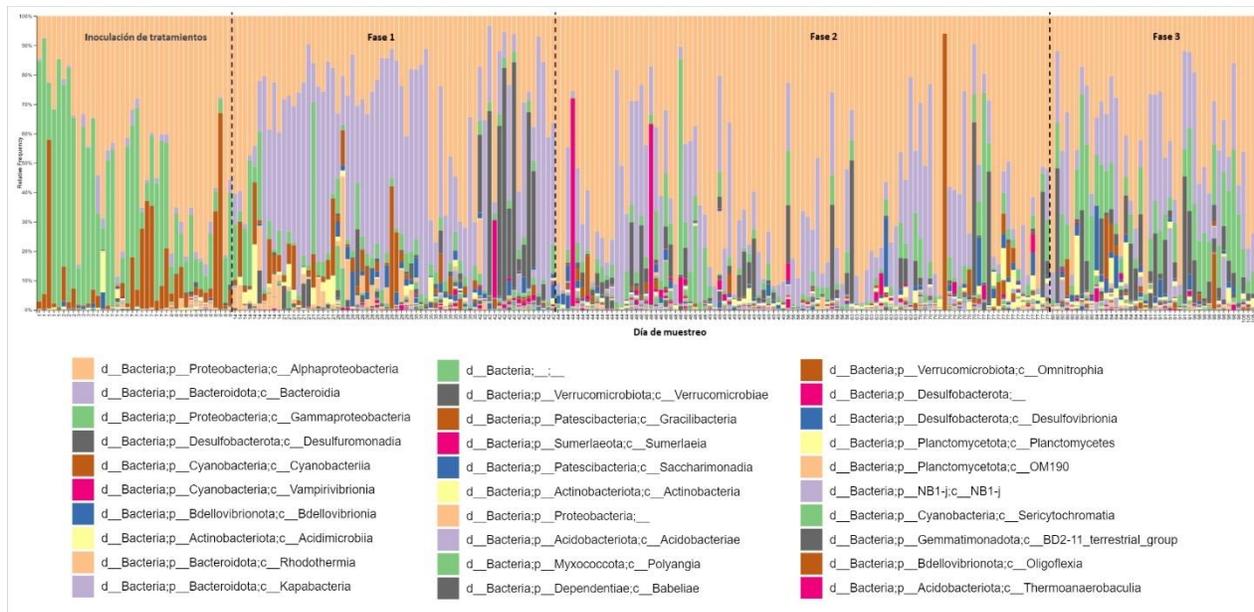


Figura 12. Abundancia relativa de taxones ordenada por días de cultivo muestreados.

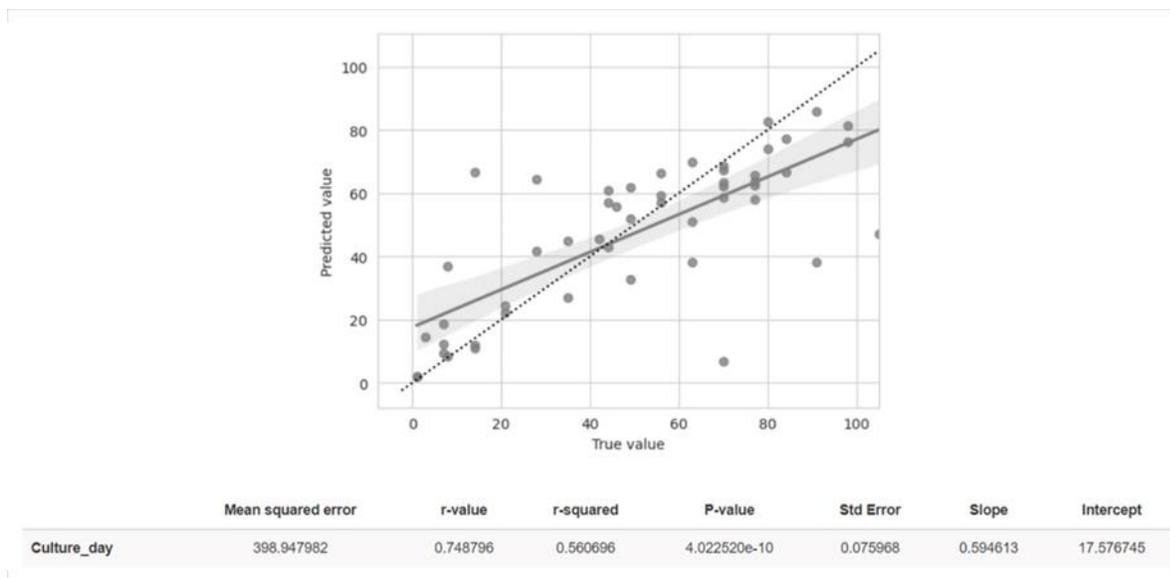
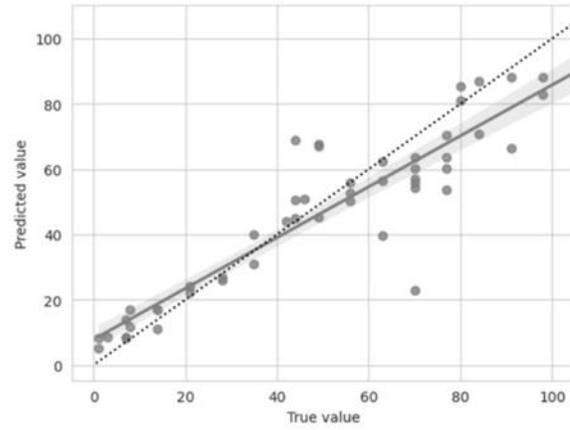


Figura 13. Modelo de volatilidad de características a nivel taxonómico de Clase.



	Mean squared error	r-value	r-squared	P-value	Std Error	Slope	Intercept
Culture_day	155.976546	0.916628	0.840207	9.564077e-21	0.04906	0.779409	7.854326

Figura 14. Modelo de volatilidad de características a nivel ASV.