

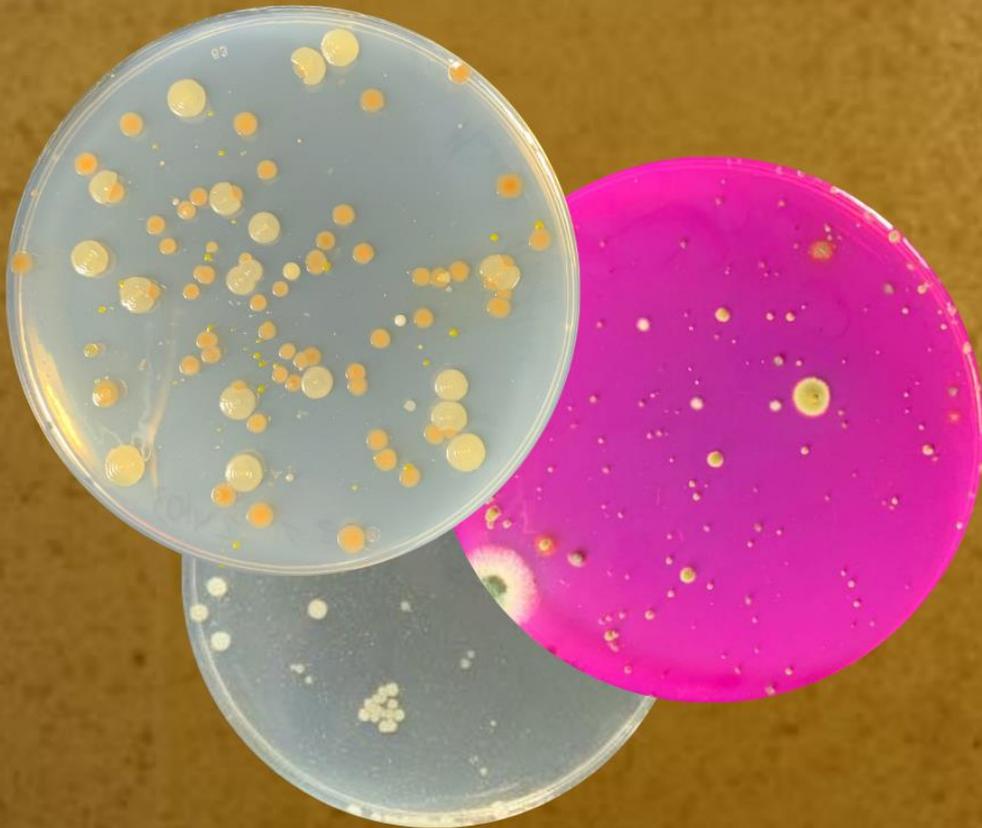


UNIVERSIDAD  
DE ALMERÍA



**TRABAJO FIN DE GRADO**

# **Impacto de las condiciones de conservación sobre la viabilidad y biodiversidad microbiana del Biofloc**



**Autora:** María Barbero Martínez

**Grado en Biotecnología. Curso 2021/22**

**Facultad de Ciencias Experimentales**

**Universidad de Almería**

**Directores:**

**Juan Antonio López González**

**Ana Josefa Toribio Gallardo**

**Departamento de Biología y Geología**

**Área de Microbiología**

*I believe that walking through a bunch of rainstorms  
gets you clean  
— T.S.*

## AGRADECIMIENTOS

No hubiera llegado hasta este punto, sentada frente al ordenador intentando pensar en cómo agradecer a aquellos que me han acompañado en el camino que ha sido esta carrera, si mi profesor de secundaria, Alberto Iriondo Lapeyra, no me hubiese hecho ver que la Biología era bonita y que mi lugar podía estar en algo relacionado. Por poner la primera baldosa, mis primeras gracias son para él.

El papel de poner la segunda lo tuvo Joaquín Moreno Casco. Desde su primera clase sembró en mí curiosidad por el pequeño gran mundo de la microbiología, y no dejó de alimentarla cada vez que se ponía frente a nosotros tanto en clase como a través de una pantalla. Siempre tendrá un hueco especial en mi recuerdo y en mi corazón no solo por su labor docente, sino también por la persona tan especial que era. Por la preocupación, la pasión y la dedicación; por todo lo que le hizo ser capaz de marcar a cada persona que le conoció.

Me gustaría agradecer infinitamente a M<sup>a</sup> José López, responsable del Área de Microbiología, por haberme brindado la oportunidad de realizar mi trabajo de fin de grado dentro de esta rama y haber puesto a mi disposición sus conocimientos para un buen desempeño de este. Gracias por haberme acogido y por ser un referente como mujer y microbióloga.

Muchas, muchísimas gracias a Juan Antonio López González, mi tutor. Gracias por todas las clases de prácticas impartidas a lo largo de la carrera, esas dos horas semanales en las que sabía que iba a aprender, pero también a disfrutar (aunque siempre me dolerá que no pudiésemos llegar a hacer cerveza en el laboratorio). Le doy las gracias por haberme acogido este curso para la realización de este trabajo y por haberse embarcado en la aventura de los Bioflocs y los camarones conmigo de esta forma. Gracias por la alegría que me ha transmitido cada una de las veces que hemos hablado y, sobre todo, gracias por la confianza que me ha hecho sentir que tenía en mí. Veía el TFG como algo muy grande, muy serio, muy distinto a cualquier cosa que hubiese hecho y algo en lo que era muy fácil liarla, pero ha hecho que disfrute del viaje. Por todo esto y por la persona que es, nunca me olvidaré de él.

A Ana Toribio, por las horas compartidas mano a mano en el laboratorio, por su alegría, su energía y todas las conversaciones. Desde que nos conocimos me ha hecho sentir muy a gusto, me proporcionó confianza en mis primeros días en el laboratorio, ha sido una guía y, en días que lo he necesitado, me ha dado un chute de energía sin saberlo. Gracias por todos los consejos que me ha dado y por haber estado siempre presente (y por completar mi look para la graduación).

No puedo dejar de agradecer al resto de miembros del Área de Microbiología. Agradecer a mis profesoras, Paqui Suárez y Macarena Jurado. Son tanto a nivel profesional como personal dos mujeres increíbles, y he disfrutado de cada una de sus clases y prácticas. Me gustaría mencionar y agradecer a Fran Moyano, por su implicación, ser el punto de unión Almería-Valencia, y por estar siempre disponible para resolver juntos cada duda que iba surgiendo. Gracias a todo aquel con quien he compartido horas de laboratorio y a Celia, junto a quien he trabajado mano a mano en cada siembra y en cada cosa que había que hacer. Dudo haber podido encontrar mejor ambiente de trabajo y calidad de personas en cualquier otro lugar. Quería hacer una última mención a M<sup>a</sup>

José Estrella, quien me vio encender por primera vez el mechero en el laboratorio hace cuatro años, y que me ha visto hacerlo por última vez. Por su dulzura, su cercanía, y su buen humor.

Unas gracias enormes van dirigidas a mis compañeros de viaje: mi olimpo de Dioses particular. Llegar a un sitio nuevo no es fácil y conseguir encajar lo es aún menos, pero cada uno de nosotros era una pieza de puzzle que acabaría encajando a la perfección con todas las demás. Gracias por las risas, por la complicidad, por hacer más amenas las horas de biblioteca, y por hacer de un parque y una casa (que después descubrimos que se llamaba como una cucurbitácea) lugares especiales llenos de recuerdos creados y por crear. Pero, sobre todo, gracias por haberme hecho sentir parte de algo.

Todos hemos oído hablar de una leyenda oriental que cuenta que hay personas conectadas por un hilo rojo, y aquí he encontrado motivos para creer en ella. Por muchos enredos o desvíos que pueda haber tenido, uno de ellos nos unía a Lucía y a mí. Gracias por estar y por ser, por haber llegado y cambiado todo para bien. Por la vida que hemos compartido y por seguir haciéndolo, por vernos crecer y lograr cosas y seguir formando parte de la otra. Eres la persona que espero tener siempre en mis fracasos y en mis celebraciones de la misma forma en la que quiero estar yo en todos los tuyos; el abrazo que más me llena y la sonrisa más sincera.

A los cerebros que juntos creamos cervezas Alcazaba, esa empresa que podría llegar a ser millonaria si alguien nos quisiese financiar. Las risas que compartimos durante los ocho meses que duró nuestra locura cervecera siempre se quedarán conmigo. A mis amigos de siempre, por hacer las vueltas a casa más amenas, por no dejar que el tiempo pase y por cuidarnos y ser apoyo a pesar de la distancia. Y a Fran, por la ilusión que me hace sentir y por hacer más bonitos estos últimos meses.

Gracias a mi familia, las personas que siempre han estado detrás y que han soportado en la distancia multitud de cosas, buenas y malas, durante estos cuatro años. Por el apoyo y por la paciencia, por facilitarme el camino y por creer en mí desde que era pequeña. A Pilar, mi hermana, por no solo mantener nuestra relación estos años que he estado fuera sino por reforzarla. Por todas las conversaciones que hemos tenido, las llamadas y los mensajes. Estoy muy orgullosa de mi mini yo.

Por último, gracias a la estrella que me lleva cuidando desde 2018, esa que brilla un poquito más con cada logro que tengo y que lo hace incluso más con cada fallo. A mi abuelo Manolo, que siempre vivirá en mi corazón y del que dejo una pequeña marca en cada trabajo, en cada escrito, y en cada cosa que hago. Siento tu orgullo y tu cariño en todo.

**ÍNDICE**

RESUMEN .....	7
ABSTRACT .....	8
1. INTRODUCCIÓN .....	9
1.1. Sistemas de acuicultura.....	9
1.1.1. Diversidad de especies en acuicultura .....	10
1.1.2. Tipos de sistemas de cultivo.....	10
1.2. Acuicultura tradicional frente a tecnología Biofloc.....	11
1.3. Bioflocs en sistemas de acuicultura .....	13
1.3.1. Integración de la tecnología Biofloc .....	13
1.3.2. Grupos microbianos en el Biofloc.....	14
1.4. Tecnología Biofloc en acuicultura del langostino.....	14
1.4.1. Parámetros fisicoquímicos a evaluar .....	15
1.5. Métodos de conservación de inóculos microbianos .....	17
2. OBJETIVOS .....	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1. Colección de muestras .....	19
3.2. Medios de cultivo .....	19
3.3. Diseño experimental .....	23
3.4. Evaluación de la presencia o ausencia de microorganismos patógenos humanos .....	23
3.5. Estudio de la tolerancia a la salinidad .....	24
3.6. Evaluación de la microbiota presente en los Bioflocs.....	24
3.6.1. Dilución y siembra en medios de cultivos.....	24
3.6.2. Diversidad microbiana en los Bioflocs.....	26
3.7. Estudio de metataxonomía.....	26
3.7.1. Secuenciación de DNA. Creación de librerías.....	26
3.7.2. Análisis metataxonómico de los datos.....	26
3.8. Análisis estadístico .....	27
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	27
4.1. Evaluación de la presencia o ausencia de microorganismos patógenos humanos .....	27
4.2. Estudio de la tolerancia a la salinidad .....	28
4.3. Evaluación de la microbiota presente en los Bioflocs.....	29

4.3.1. Recuentos microbianos en medios de cultivo.....	29
4.3.1.1. Evaluación de la presencia de microorganismos psicrótrofos .....	34
4.3.2. Diversidad microbiana.....	35
4.4. Estudio de metataxonómica.....	39
5. CONCLUSIONES .....	44
6. FINANCIACIÓN.....	44
7. BIBLIOGRAFÍA .....	45

## RESUMEN

La acuicultura intensiva es una práctica que viene acompañada de importantes impactos ambientales. Las descargas excesivas de agua debidas a los recambios de los tanques de cultivo son, a la vez, una fuente de contaminantes al depositar desechos de materia orgánica al medio y un desperdicio de este recurso. El sector de la acuicultura debe prosperar garantizando parámetros ecológicos óptimos en relación a la calidad del agua y al crecimiento de los animales. Una forma de reducir las necesidades de agua y mejorar las densidades de población, es mediante un tratamiento natural del agua aplicando la tecnología Biofloc, que consiste en agregados microbianos con acción probiótica y con capacidad para convertir los productos de excretados en el agua por acción del cultivo, en alimento para los animales, evitando así los recambios continuados de agua.

Bajo esta perspectiva, este trabajo se ha centrado en evaluar la efectividad de la refrigeración y la congelación como métodos de conservación de muestras de Biofloc. Para ello, se conservaron a tres temperaturas diferentes, a 4 °C, -20 °C y -80 °C y se realizaron tres muestreos a T<sub>0</sub>, T7 días y 1 mes, mediante siembras y recuentos de los tres grupos microbianos principales constituyentes del Biofloc (bacterias aerobias mesófilas, bacterias nitrificantes y hongos mesófilos) junto con estudios de tolerancia a la salinidad y evaluación de fluctuaciones en la diversidad microbiana de las muestras. El análisis se completó con un estudio de metataxonómica para estudiar los grupos microbianos mayoritarios presentes.

Los resultados mostraron que, la refrigeración como método de conservación era capaz de mantener una mayor diversidad microbiana del estudio. Por otra parte, los tratamientos de congelación sufrían una pérdida enorme de biodiversidad y únicamente favorecieron la proliferación de bacterias con capacidad psicrótrofa, cuya densidad microbiana fue aumentando a lo largo del tiempo de muestreo. Pese a lo anterior, la evolución de los Biofloc a lo largo del tiempo, en condiciones de refrigeración suponen una importante pérdida de biodiversidad que resulta notable en menos de un mes. Este hecho pone de manifiesto que la estabilidad microbiana de los Biofloc es limitada y requiere de mejoras de conservación que garanticen la viabilidad y complejidad del microbioma existente en ellos.

**Palabras clave:** Biofloc, BFT, acuicultura, conservación, bacterias aerobias mesófilas y bacterias nitrificantes.

## ABSTRACT

Intensive aquaculture is a practice that is accompanied by significant environmental impacts. Excessive water discharges due to the replacement of culture tanks are both a source of pollutants by depositing organic matter waste into the environment and a waste of this resource. The aquaculture sector must prosper by ensuring optimal ecological parameters in terms of water quality and animal growth. One way to reduce water needs and improve stocking densities is through natural water treatment by applying Biofloc technology, which consists of microbial aggregates with probiotic action and with the capacity to convert the products excreted in the water by the action of the culture into food for the animals, thus avoiding continuous water replacement.

Under this perspective, this work has focused on evaluating the effectiveness of refrigeration and freezing as methods of preservation of Biofloc samples. For this purpose, they were preserved at three different temperatures, at 4 °C, -20 °C and -80 °C and three samplings were carried out at T<sub>0</sub>, T<sub>7</sub> days and 1 month, by means of seeding and counts of the three main microbial groups constituting the Biofloc (aerobic mesophilic bacteria, nitrifying bacteria, and mesophilic fungi) together with salinity tolerance studies and evaluation of fluctuations in the microbial diversity of the samples. The analysis was completed with a meta-taxonomic study to observe the major microbial groups present.

The results showed that refrigeration as a preservation method was able to maintain a higher microbial diversity. On the other hand, freezing treatments suffered an enormous loss of biodiversity and only favored the proliferation of bacteria with psychrotrophic capacity, whose microbial density increased throughout the sampling time. Despite the above, the evolution of Biofloc over time, under refrigeration conditions, represents a significant loss of biodiversity that is noticeable in less than a month. This fact shows that the microbial stability of Biofloc is limited and requires conservation improvements to guarantee the viability and complexity of the microbiome existing in them.

**Key words:** Biofloc technology, BFT, aquaculture, preservation, mesophilic aerobic bacteria, nitrifying bacteria.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Sistemas de acuicultura

La acuicultura se define, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (2014), como la cría de organismos acuáticos entre los que se encuentran peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas. El cultivo de organismos acuáticos a gran escala es un suceso relativamente reciente, aunque, a pequeña escala, esta actividad ha existido desde tiempos antiguos en varios países, muy probablemente, desde los orígenes del pastoreo y de la agricultura. Cabe resaltar China, considerada una de las primeras zonas donde fue documentada la producción combinada de arroz y de peces, hace ya unos 4.000 años (FAO, 2020).

Desde su origen hasta nuestros días, la acuicultura ha sido una actividad que ha ido aumentando su producción de forma progresiva, debido a que la pesca extractiva cubre con dificultad la demanda mundial de pescado. De esta forma y tal y como se representa en la Figura 1, la acuicultura muestra una tasa de crecimiento anual del 8,8% (FAO, 2020). A título ilustrativo, se indica que más de la mitad del conjunto de los productos acuáticos consumidos actualmente por la población mundial, procede de granjas de acuicultura.

Hay que mencionar, además, que el pescado y los crustáceos son una fuente importante de alimento en nuestra sociedad, debido principalmente a su alto contenido en proteínas, ácidos grasos (omega-3), vitaminas (vitamina D) y macronutrientes minerales (fósforo). En 2018, se estimó que la producción mundial de peces, crustáceos y moluscos llegó a alcanzar los 179 millones de toneladas, de las cuales, 156 millones fueron destinadas al consumo humano. El resto de la producción derivan en la obtención de piensos hechos a base de pescado o en la elaboración de productos farmacéuticos. De igual modo, otra finalidad de la actividad acuícola está relacionada con el cultivo de especies ornamentales, el control de plagas o enfermedades que puedan afectar a la cría o a los humanos a la hora del consumo y la recuperación de suelos.

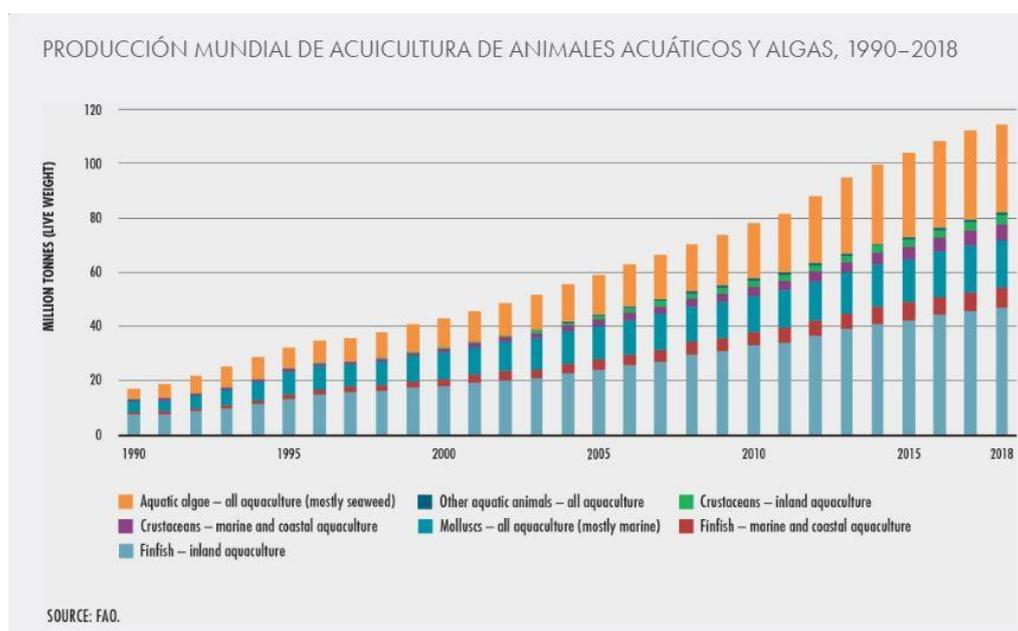


Figura 1: Crecimiento de la producción acuícola mundial entre los años 1990 y 2018 (FAO, 2020)

De todos estos datos se desprende que la acuicultura no va a sustituir a la pesca, pero sí puede ayudar a aliviar la sobreexplotación de los recursos pesqueros, garantizando el suministro de estos productos saludables a una población cada vez mayor. Su desarrollo resulta necesario para cumplir una serie de objetivos entre los que destacan, la obtención de una mayor producción sin explotar de manera excesiva los recursos disponibles, que sea considerada una práctica sostenible y que los sistemas empleados para su ejecución resulten económicamente rentables (Crab et al., 2012).

### 1.1.1. Diversidad de especies en acuicultura

Desde una perspectiva general, los peces son el producto obtenido de la acuicultura que predomina en el mercado, representando un 47,41% de la producción acuícola total. Les siguen en importancia las plantas acuáticas, mientras que los crustáceos se colocan en cuarto lugar, representando sólo un 6,19% del total (FAO, 2020).

En España, hasta los años 80, la acuicultura era una práctica que sólo se daba en tres lugares principalmente: Galicia, con el mejillón y Asturias y Cádiz, con la trucha arcoíris (JACUMAR, 2006). Años después, esta práctica entró en expansión, cultivándose una mayor variedad de especies. El dato aportado por MARM en 2010, demuestra la implantación de la acuicultura en nuestra sociedad, comparando la producción en España de dorada y lubina que supone la cantidad de 20.400 y 12.500 toneladas respectivamente, frente a las 1.200 y 700 toneladas obtenidas por la pesca. Siguiendo esta línea, entre las especies más cultivadas y de las que se obtiene una mayor rentabilidad se encuentran el salmón, el rodaballo, la dorada y la lubina. Hay que mencionar, además, que actualmente se están llevando a cabo estudios para conseguir máximos en los cultivos acuícolas de besugo y lenguado y rentabilizarlos al igual que las especies anteriormente mencionadas.

### 1.1.2. Tipos de sistemas de cultivo

Para el desarrollo de los diferentes sistemas de cultivo, éstos se realizan en ambiente marino o en agua dulce, para el cultivo de una amplia variedad de organismos acuáticos. Los sistemas pueden ser de base terrestre (comprenden principalmente estanques, arrozales y otras instalaciones construidas sobre tierra firme) o de base acuática (incluyen recintos, corrales, jaulas y balsas, situados en costas protegidas o aguas interiores). Se pueden encontrar tres tipos de sistemas de cultivo en acuicultura, atendiendo a criterios como densidad de la siembra, número de animales por unidad de superficie o el tipo de alimento. Teniendo en cuenta estas consideraciones se clasifican en:

- I. Sistemas extensivos: caracterizados por utilizar tecnologías poco sofisticadas y normalmente, sólo una parte del ciclo de vida es controlado. Son sistemas cuyos cultivos se encuentran a merced del clima, emplean alimentos naturales producidos por el propio medio (plancton y bentos) y usan una baja proporción de insumos por unidad de producto (fertilizantes orgánicos e inorgánicos y suplementos alimenticios). El acuicultor no interviene en las condiciones del agua, ni suministra un extra de alimento y todo se realiza con el objetivo de sacar el máximo partido de las condiciones naturales. Los sistemas extensivos suelen emplearse cuando se trabaja con policultivos.

- II. Sistemas semiintensivos: A medida que la intensidad de la producción del cultivo aumenta, los peces son confinados y la producción de alimentos naturales es mejorada, incorporando alimento exógeno y fertilizantes a las aguas. Por lo tanto, se obtienen mayores rendimientos y productividades superiores a los que proporciona un sistema extensivo. Suelen practicarse en estanques de tierra o micropresas.
- III. Sistemas intensivos: este tipo de sistema busca máximos de rendimiento, productividad y beneficio económico para el acuicultor, todo ello en el menor espacio y tiempo posible. Para ello, se requiere un alto nivel tecnológico y de gestión, para mantener el buen estado sanitario de los peces. Entre las medidas necesarias destacan tratamientos con productos químicos y control de la calidad del agua a través del empleo de filtros, purificadores, bombas y aireadores. Los sistemas intensivos pueden adecuarse tanto a monocultivos como a policultivos, aunque preferentemente para monocultivos.

Existen diferentes modelos productivos en acuicultura, definidos por la Normativa del Cultivo Acuícola:

- I. Modelo ecológico: se define como el modelo que cumple tanto la normativa obligatoria para la producción acuícola, esto es, el Reglamento (CE) Nº 710/2009 de la comisión del 5 de agosto de 2009, como las normas de producción ecológica.
- II. Modelo convencional: cumple únicamente la normativa obligatoria para la producción acuícola.
- III. Modelo mixto: son instalaciones en las que se combinan aspectos de ambos modelos anteriormente mencionados.

Atendiendo a las relaciones tróficas, encontramos diferentes interacciones entre las especies a cultivar:

- I. Monocultivos: el acuicultor produce una sola especie por unidad de cultivo.
- II. Policultivos: se cultivan varias especies en una sola unidad del cultivo, todas siguiendo la misma técnica. Las especies a cultivar pueden o no pertenecer al mismo nivel trófico.
- III. Multitrófico: se cultivan más de una especie pertenecientes a diferentes niveles tróficos, en igual o diferente unidad de cultivo. Su interés reside en un mayor aprovechamiento de los recursos del medio, ya que uno de los cultivos es capaz de utilizar la materia orgánica que se origina como producto de otro.

## 1.2. Acuicultura tradicional frente a tecnología Biofloc

El rápido y creciente aumento poblacional supone un incremento en la demanda de alimentos, que va acompañada de un aumento en la producción acuícola. La intensificación de la acuicultura deriva, como cualquier actividad industrial, en un aumento de contaminantes orgánicos tóxicos, y el reto está en minimizar estos efectos. Una solución son los recambios de agua, que generan a su vez otro problema, debido al gran consumo de este recurso. Como ejemplo, son necesarios 20 m<sup>3</sup> de agua para producir cada kilogramo de langostinos, los cuales son difíciles de afrontar (Ahmad et al., 2017). Todo ello ha desencadenado una búsqueda de soluciones basadas en criterios de

sostenibilidad ambiental y mejora de la calidad del producto. Mediante un uso eficiente de los recursos y el aprovechamiento de los residuos generados.

Por tanto, como alternativa a la acuicultura tradicional surge la tecnología Biofloc. Según el Glosario de la Librería Nacional de Agricultura de Estados Unidos, la tecnología Biofloc se define como “el uso de agregados bacterianos, algas o protozoos, unidos por una matriz con materia orgánica, con el objetivo de mejorar la calidad del agua, el tratamiento de residuos y prevención de enfermedades en sistemas intensivos de acuicultura” (National Academy of Science, 2022).

La tecnología Biofloc se basa en combinar altos niveles de microbiota en suspensión, una aireación constante y un aporte de carbohidratos que permiten la descomposición aerobia de materia orgánica (Ahmad et al., 2017). Además, supone una dualidad: mantiene ratios adecuados de C:N mejorando la calidad del agua y por otro lado, los residuos nitrogenados que se producen, se convertirán en biomasa aprovechable por la microbiota existente y empleándose como alimento para el animal en cultivo (Crab et al., 2012).

En la Tabla 1 se observa cómo, según la técnica implementada, se afrontan diferentes aspectos referentes al cultivo acuícola.

	Acuicultura tradicional	Tecnología Biofloc
Eliminación de sustancias de desecho	Recambios de agua del tanque de cultivo al medio.	El microbioma del Biofloc es capaz de transformar las sustancias de desecho del medio en sustancias aprovechables por los animales del cultivo, como proteína y alimento.
Condiciones sanitarias	El acuicultor debe añadir de forma exógena antibióticos, químicos o productos de carácter fungicida y/o bactericida.	Las bacterias del Biofloc son heterótrofas, hecho que contribuye a que el cultivo crezca en condiciones sanitarias mejoradas.  Presencia de bacterias con acción probiótica que mejora el sistema inmune de los animales.

	Acuicultura tradicional	Tecnología Biofloc
		Evita los recambios de agua reduciendo la entrada de patógenos a los tanques.
<b>Impacto medioambiental</b>	Los recambios de agua suponen deposiciones de materia orgánica tóxica en el medio, siendo potenciales puntos de contaminación ambiental.	Es una tecnología verde que, a su vez, evita desechar grandes cantidades de agua con elementos contaminantes el medio y además reduce el uso de agua, que no deja de ser un recurso valioso.

Tabla 1: Comparativa entre la acuicultura tradicional y la tecnología Biofloc

Con respecto al primer ítem de la Tabla 1, entre las sustancias tóxicas que han de tratarse se encuentran amonio y amoniaco. Los microorganismos nitrificantes son aquellos que son capaces de realizar la transformación de amonio a nitritos, y éstos a nitratos (Celdrán, 2018).

### 1.3. Bioflocs en sistemas de acuicultura

En los últimos 20 años, la tecnología Biofloc se ha ido extendiendo por diferentes localizaciones geográficas y bajo diferentes condiciones. Esta tecnología requiere una preparación previa a la siembra, en la que se añaden sustancias que permiten el crecimiento bacteriano esperado, tras el cual, comienzan a excretarse exopolisacáridos que permiten la aglutinación de bacterias, microalgas, resto de materia orgánica y zooplancton en bioflóculos que resultan muy convenientes, ya que prestan ciertos servicios beneficiosos a la calidad del agua, la alimentación y a la salud de los organismos del cultivo (Emerenciano et al., 2021).

#### 1.3.1. Integración de la tecnología Biofloc

Los Bioflocs proporcionan el servicio crítico de mantener la calidad del agua, de forma similar a la función de un biofiltro empleado en los sistemas de acuicultura de recirculación (Schryver et al., 2008). Esta tecnología puede establecerse en un sistema de acuicultura de diversas formas, tal y como se observa en la Figura 2. Por un lado, el Biofloc puede integrarse proporcionando al animal alimentos de bajo contenido en nitrógeno, junto con una fuente de carbono exógena (A). Esto sucede porque los microorganismos del Biofloc, aprovechan los compuestos de nitrógeno procedentes de las heces del animal junto con el carbono del medio, para producir biomasa rica en proteínas, que actuarían como alimento.

Otra manera de incluirlo en tanques de acuicultura usando reactores separados (B). Por un lado, está el tanque llamado “unidad de cultivo”, al que se añade pienso animal con compuestos de

nitrógeno. El agua residual del mismo es redirigida a otro tanque denominado reactor del Biofloc. En él, hay tanto aireación como una fuente de carbono exógena, que estimula la actividad microbiana. El agua del reactor del Biofloc es redirigida al tanque de cultivo y el Biofloc se cosecha para usarlo como alimento.

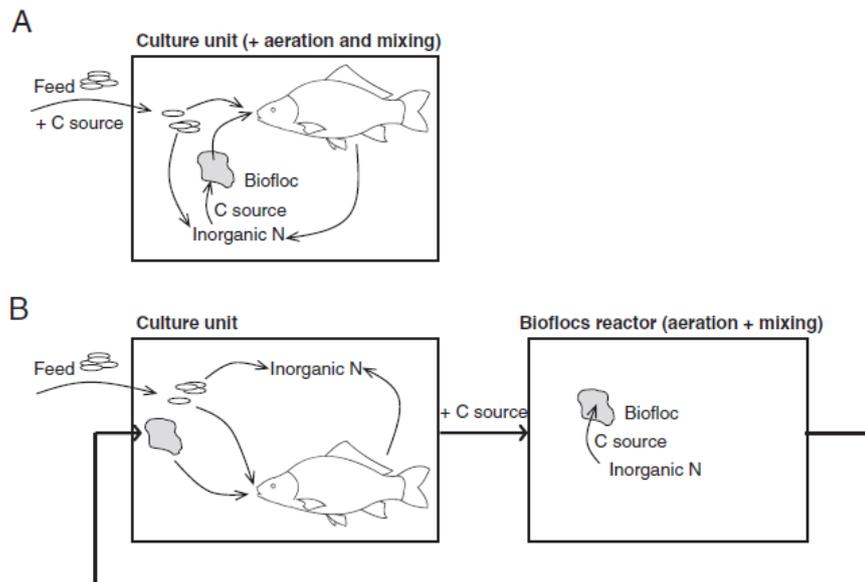


Figura 2: Diferentes métodos de integración de la tecnología Biofloc en tanques acuícolas (Crab et al., 2012)

### 1.3.2. Grupos microbianos en el Biofloc

A grandes rasgos, entre los microorganismos conformantes del Biofloc se encuentran comunidades de fitoplancton, bacterias, y agregados de materia orgánica (Hargreaves, 2006). Además, de su contenido total, se cree que la fracción viva oscila entre un 2 y un 20%, mientras que el resto serían restos de materia orgánica y materia inorgánica.

En particular, existen dos grupos principales de bacterias dentro del microbioma del Biofloc, bacterias heterótrofas y bacterias nitrificantes (Ebeling et al. 2006). Entre los microorganismos mayoritarios destacan individuos del género *Bacillus*, proteobacterias y actinobacterias (Zhao et al. 2012). Las proteobacterias llegan a conformar hasta un 60% de la microbiota total del Biofloc, siendo un grupo microbiano importante para la mineralización de compuestos orgánicos (Cardona et al., 2016).

### 1.4. Tecnología Biofloc en acuicultura del langostino

El langostino es una especie animal que se cultiva a gran escala en el mundo, debido a una alta tasa de demanda. Es por esto por lo que, hoy en día, se buscan alternativas a la cría de crustáceos fuera de ecosistemas acuáticos ya que, de otra forma, no sería posible atender a las necesidades mundiales de demanda de estos productos sin dañar los ecosistemas.

El cultivo intensivo de langostinos se lleva a cabo en piscinas circulares a las que se les incorporan sistemas de aireación que buscan que el agua se encuentre en movimiento, que exista circulación para que el langostino pueda nadar a contracorriente. Además, han de incluirse mecanismos que impidan el efecto toro que sufren los langostinos, esto es, que haya machos adultos sexualmente

maduros que impidan el crecimiento de aquellos más jóvenes (Jayachandran, 2001), lo cual contribuiría a aumentar la productividad del cultivo.

Existen cuatro etapas a la hora de desarrollar el cultivo de langostinos: producción de postlarvas, siembra, engorde y cosechado. La primera etapa es la producción de postlarvas, en la cual se capturan individuos en etapa reproductiva y se añaden a las piscinas acuícolas que tienen las condiciones óptimas para que se suceda la fecundación. Una vez fecundadas, las hembras son transportadas a piscinas diseñadas para la puesta de huevos, que eclosionan a las pocas horas.

Seguidamente, ocurre la siembra, en la que las crías se llevan a estanques con agua madura en los que se añade alimento específico para que ocurra su correcto crecimiento, antes de que pasen a la siguiente etapa: el engorde. En esta etapa, los langostinos se llevan a estanques con corriente en los que se les proporciona alimento rico en proteínas y nutrientes y donde se les deja crecer hasta que alcanzan un tamaño comercial. Alcanzado éste, el acuicultor los deja unos días en ayuno con el objetivo de limpiar sus intestinos y así no tener que desvenarlos previo a la venta.

El proceso culmina con una fase de cosechado, en la que se pescan los langostinos de tamaño y peso adecuados, la cual puede durar unos dos meses, tiempo suficiente para que todos los langostinos alcancen estas características.

La tecnología Biofloc, ha resultado ser una novedad exitosa en la acuicultura del langostino, ya que ha supuesto doblar su producción y, hoy en día, representa un 53% de la producción total de crustáceos cultivados (FAO, 2020).

#### 1.4.1. Parámetros fisicoquímicos a evaluar

Existen una serie de parámetros, bióticos y abióticos, que afectan a la productividad y eficiencia del Biofloc (Esparza-Leal et al. 2020), que un acuicultor debe tener en cuenta a la hora de iniciar una producción de langostinos (Ver Tabla 2).

##### Densidad animal

Se debe tener en cuenta que más animales por unidad de área suponen mayores requerimientos alimenticios y acumulaciones de nutrientes, que pueden derivar en eutrofización, cosa que solo puede solucionarse con abundante aireación. Con el cultivo de langostinos sucede que cuanto mayor densidad animal, disminuye la supervivencia y la salud de los animales (Liu et al. 2017).

<b>C/N</b>	Mantener el ratio C/N es importante para la inmovilización de compuestos tóxicos del nitrógeno para su posterior transformación en compuestos proteicos. Es necesaria una relación C/N superior a 10, para que puedan crecer los microorganismos responsables de la nitrificación (Ahmad et al., 2017).
<b>pH</b>	Debe encontrarse rigurosamente entre 6,5 y 9, por lo que es muy importante evitar que el cultivo se desarrolle en un medio ácido (Avnimelech, 2015). Además, valores de pH fuera de ese rango, podrían causar daños importantes en los animales, a nivel reproductivo o minimizando la actividad metabólica originando la muerte del cultivo e impidiendo los cambios de muda de los crustáceos.
<b>Aireación</b>	Los sistemas de aireación difusa proporcionan mejores resultados tanto en la formación de bioflóculos como en el crecimiento del langostino (Lara et al, 2017)
<b>Temperatura</b>	Los langostinos son capaces de vivir en medios que cuentan con temperaturas entre 12 °C y 30 °C, si bien su temperatura óptima son los 25 °C. Por encima del rango de temperatura indicado, el langostino presentará un metabolismo muy rápido y, por otro lado, por debajo de éste, ocurrirá lo contrario

<b>Salinidad</b>	Los langostinos se desarrollan con normalidad en un rango de salinidad entre 0 y 50 ppm, ya que altas concentraciones de sales son capaces de disminuir la toxicidad presente en el ambiente al reducir la proporción de amonio en el medio.
------------------	--

Tabla 2: Parámetros físicoquímicos que afectan al crecimiento del langostino en el Biofloc

### 1.5. Métodos de conservación de inóculos microbianos

Existen una serie de técnicas de conservación microbianas cuyo fin es mantener los cultivos lo más similares posibles al aislamiento original, es decir, puros y sin contaminar. Esta finalidad se consigue reduciendo los ritmos metabólicos de los microorganismos bien por retención de nutrientes, de temperatura o de una combinación de ambos y consiguiendo una tasa de supervivencia que ronde el 75% (Juarros et al., 2000).

Los métodos de conservación de inóculos a evaluar se clasifican en a largo plazo, a corto plazo, o métodos alternativos.

Los métodos de conservación a largo plazo son aquellos que proporcionan mayor estabilidad genética, es decir, que evitan que aparezcan nuevas generaciones en el cultivo, representadas por dos metodologías: liofilización y congelación.

La conservación por congelación, los microorganismos se suspenden en medio líquido al que se le añade un crioprotector, que son sustancias que se encargan de proteger el material, deshidratándolo para evitar que sufra daños. Esta metodología propicia mayor viabilidad celular y estabilidad genética, además de que permiten mayores tiempos de supervivencia al reducir el metabolismo microbiano, llegando a sobrevivir más de 30 años. Además, permite una recuperación rápida del inóculo simplemente elevando la temperatura (Hill y Kirsop, 2000).

Hay una serie de parámetros que hay que tener en cuenta a la hora de congelar microorganismos, como son: la edad celular (conviene conservar células que se encuentren al inicio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento), la velocidad de congelación y descongelación (ha de ser lo más rápida posible para evitar daños), la temperatura de almacenamiento (los inóculos a la temperatura más baja posible, por lo que se recomienda su conservación en nitrógeno líquido o bien en armarios congeladores que alcancen preferentemente los  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), y el uso de crioprotectores (siendo los más utilizados glicerol e inositol) (Arencibia, 2008). Sin embargo, este método también cuenta con algunos inconvenientes, como pueden ser el coste de los equipos, y el cuidado que ha de tenerse al manipular nitrógeno líquido.

Otro método destacado de este grupo es la liofilización, que se basa en eliminar el agua existente en la muestra por sublimación del hielo mediante vacío. Para liofilizar, primero se congela el agua que se encuentra libre en el material celular, seguido de un secado primario por sublimación, y un último secado secundario que elimina el resto remanente de agua que pudiese haber quedado tras

la primera sublimación. Este método de conservación permite el almacenaje de los liófilos a temperatura ambiente, en lugar de en congeladores como es el caso anterior, y por periodos de tiempo ligeramente más largos, llegando a los 40 años (García y Uruburu, 2002).

En cuanto a los métodos de conservación a corto plazo, usados cuando no es posible aplicar métodos de conservación a largo plazo, debido a que la cepa a conservar no es capaz de resistir las condiciones o porque no se disponen de los equipos necesarios para llevarlas a cabo. Entre este tipo de técnicas destacamos el subcultivo y la suspensión en agua destilada. La primera, consiste en mantener al microorganismo en forma activa e ir transfiriéndolo a cultivos frescos de manera periódica para mantener su viabilidad. Por otra parte, la suspensión en agua destilada consiste en, como su propio nombre indica, suspender en agua destilada estéril células del microorganismo que buscamos conservar. De entre las dos metodologías a corto plazo, la suspensión en agua destilada muestra mayores porcentajes de viabilidad, hasta 5 años (Hill y Kirsop, 2000).

Por último, como métodos alternativos destacan la desecación en bolitas de alginato, que detienen la actividad microbiana mediante la eliminación del agua del medio y están basados principalmente en el secado, por lo que requieren la adición de agentes protectores tales como la leche descremada o el glutamato sódico. La técnica consiste en añadir el inóculo bacteriano a una matriz de alginato, seguida de una eliminación del 70% del agua total del medio. Las bolitas resultantes se conservan a temperaturas entre 4 °C y 18 °C, por lo que es un proceso eficaz y de baja dificultad (Washington, 1999), adecuado para procesos de fermentación que requieren volúmenes pequeños de inóculo.

## 2. OBJETIVOS

Este Trabajo Fin de Grado está integrado dentro del Proyecto BIOFLANGO “Efecto de la composición de la dieta y manejo de la alimentación en el rendimiento del camarón”, con el código PID2020-114574RB-C21. Este proyecto está financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad. En él, participan grupos de investigación de la Universidad de Almería, el grupo BIO-175 (Desarrollo Tec. Microbiológicas para Mejora de Suelos de Interés Agrícola) de Microbiología y el grupo AGR152 (Modelización Digestiva).

El objetivo principal de este trabajo es el estudio de la refrigeración y la congelación como métodos de conservación del microbioma presente en las muestras de Biofloc maduro y su nivel de afectación al microbioma del Biofloc.

Para alcanzar este objetivo, se plantearon una serie de objetivos específicos:

- I. Estudiar cuantitativamente los grupos microbianos de interés del Biofloc maduro mediante técnicas cultivares.
- II. Estudiar la evolución del microbioma del Biofloc durante la conservación en el tiempo bajo distintos formatos mediante recuentos en medios de cultivo.
- III. Realizar estudios de metataxonomía para conocer las diferentes familias microbianas que formaban parte de las muestras de Biofloc en las diferentes temperaturas de conservación.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Colección de muestras

Para alcanzar los objetivos establecidos en este trabajo, se emplearon muestras de Biofloc maduro, constituidas por bioflóculos que no han estado en contacto con las crías de langostino.

Este Biofloc se generó en tanques de 80 L de capacidad, con condiciones de salinidad al 21‰ y manteniendo una temperatura de 28 °C (Figura 3). Como fuente de carbono se añadió melaza diluida en agua en una proporción aproximada de 1:3, esto es, 317 g de melaza por litro de agua. Por cada gramo de pienso con el que se alimenta al Biofloc, se emplean 5,4 mL de melaza diluida. Estos tanques productores de Biofloc se encuentran en las instalaciones de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural de la Universidad Politécnica de Valencia, centro que encabeza y coordina el proyecto desarrollado.



Figura 3: Tanques de 80 L con sistema de aireación en los que se ha generado el Biofloc

A pesar de que comparten el mismo origen, las muestras con las que se ha trabajado en este trabajo difieren en cuanto a sus temperaturas de conservación. Para ser más específicos, las muestras se conservaron en refrigeración a 4 °C y en congelación a -20 °C y a -80 °C.

#### 3.2. Medios de cultivo

Para el cultivo y recuentos de bacterias aerobias mesófilas, hongos mesófilos y bacterias nitrificantes presentes en nuestras muestras de Biofloc, se emplearon los siguientes medios de cultivo, cuyos componentes están descritos en las siguientes Tablas 3 a 10.

## - Medio APHA

Componente	Cantidad por Litro
<b>Digerido enzimático de caseína</b>	5 g
<b>Extracto de Levadura</b>	2,5 g
<b>D(+)-Glucosa</b>	1 g
<b>Agar</b>	15 g
<b>pH 7,0 ± 0,2</b>	

Tabla 3: Componentes del medio APHA (Buchbinder et al., 1951)

Para su preparación, se pesaron 23,5 g de un preparado comercial (PanReac AppliChem, 413799.1210) y se añadió a 1L de agua destilada. Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Finalmente, una vez esterilizados, fueron repartidos en placas de Petri estériles a razón de 20 mL/placa. Este medio se empleó para realizar el recuento de bacterias aerobias mesófilas tras 48 h de incubación a 30 °C. Este medio también se utilizó para evaluar la presencia de microorganismos psicrófilos. Para ello, se incubaron aislamientos de los morfotipos sospechosos a 4 °C.

## - Rosa de Bengala

Componente	Cantidad por Litro
<b>Rosa de Bengala</b>	0,05 g
<b>D(+)-Glucosa</b>	10 g
<b>Peptona Bacteriológica</b>	5 g
<b>Agar</b>	15 g
<b>Cloranfenicol</b>	0,1 g
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	0,5 g
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	1 g

Tabla 4: Componentes del medio Rosa de Bengala (Smith y Dawson, 1944)

Para su preparación, se pesaron 24 g de un preparado comercial de Rosa de Bengala (PanReac AppliChem, 414855.1210) y se añadieron a 750 mL de agua. Se procedió a su esterilización en autoclave, a 121 °C durante 20 minutos. Una vez estéril, fue repartido en placas de Petri estériles a razón de 20 mL/placa. Este medio se utilizó para realizar el recuento de los hongos mesófilos tras 96 h de incubación a 30 °C.

## - Medio Nitrificantes

Componente	Cantidad por Litro
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> * 3 H<sub>2</sub>O</b>	0,66 g
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	1 g
<b>NaSO<sub>4</sub></b>	2 g
<b>MgSO<sub>4</sub> * 7 H<sub>2</sub>O</b>	0,2 g
<b>Agar</b>	15 g
<b>pH 7,5</b>	

Tabla 5: Componentes del medio en placa para nitrificantes (Abad, 2017)

Para su preparación, se pesaron cada uno de sus componentes y se adicionó 1 L de agua destilada. El matraz con todos los componentes se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121 °C. Una vez estéril, fue repartido en placas de Petri estériles a razón de 20 mL/placa. Este medio se empleó

para realizar el recuento de bacterias nitrificantes tras 10 días de incubación a Temperatura ambiente.

- Marine Broth

Componente	Cantidad por Litro
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,022 g
CaCl <sub>2</sub>	1,8 g
Extracto de levadura	1 g
MgCl <sub>2</sub>	8,8 g
KBr	0,08 g
NaCl	19,4 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,16 g
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	0,004 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,0016 g
SrCl <sub>2</sub>	0,034 g
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> FeO	0,1 g
Peptona	5 g
KCl	0,55 g
NaF	0,0024 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,008 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,24 g
Agar	15 g

Tabla 6: Componentes del Marine Broth (Zobell, s.f)

Para su preparación, se pesó 30 g del medio comercial (PanReac AppliChem, 414698,1210), 15g de agar bacteriológico y se le añaden 750 mL de agua destilada. El matraz con todos los componentes se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121 °C. Una vez estéril, fue repartido en placas de Petri estériles a razón de 20 mL/placa. Este medio permite el crecimiento de bacterias propias del medio marino.

- Hektoen

Componente	Cantidad por Litro
Citrato férrico de amonio	1,5 g
Extracto de Levadura	3 g
Lactosa	12 g
Sacarosa	12 g
D(-)-Salicina	2 g
Sodio Tiosulfato	5 g
Azul de Bromotimol	0,065 g
Fucsina Ácida	0,1 g
Peptona de Carne	12 g
Sales Biliares	9 g
Sodio Cloruro	5 g
Agar	14 g
pH 7,5	

Tabla 7: Componentes del medio Hektoen (King y Metzger, 1968)

Para su preparación, se adicionan 76 g de un medio comercial (PanReac Applichem, 413768) en 1 L de agua destilada. Este medio no se esteriliza en autoclave y fue repartido en placas de Petri estériles a razón de 20 mL/placa. El medio Hektoen es un medio selectivo para el aislamiento y la diferenciación de bacilos Gram – enteropatógenos, especialmente las especies de *Salmonella* y de *Shigella*. Todas las bacterias capaces de crecer en este medio que no pertenezcan al género *Salmonella* y *Shigella* desarrollarán colonias de color salmón o naranja a excepción del género *Proteus*. Esto se debe a la fermentación de uno o varios de los carbohidratos presentes, lo cual acidifica el medio, lo que hace virar al indicador de pH.

Por su parte, el género *Shigella* y *Salmonella* no son capaces de fermentar a ninguno de los carbohidratos presentes, utilizando únicamente a las peptonas como fuente de energía, lo que alcaliniza el medio y por ello sus colonias son verde-azuladas.

- Caldo Fraser

Componente	Cantidad por Litro
Digerido enzimático de Caseína	5 g
Esculina	1 g
Ácido nalidíxico	0,02 g
Cloruro sódico	20 g
Digerido enzimático de tejido animal	5 g
Hidrógeno fosfato disódico dihidratado	12 g
Acriflavina	0,025 g
Extracto de carne	5 g
Dihidrogenofosfato de potasio	1,35 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de litio	3 g

Tabla 8: Componentes del caldo Fraser (Fraser y Sperber, 1988)

El caldo Fraser se prepara con la adición de 28,7 g de un preparado comercial (EMD Millipore, 1,10398,0500) en 500 mL de agua destilada y se reparte el contenido en tubos de vidrio, los cuales se esterilizaron durante 20 minutos a 121 °C. El caldo Fraser se usa para detección de *Listeria*. Todas las especies de *Listeria* hidrolizan la esculina, que reacciona con los iones férricos produciendo un ennegrecimiento del medio.

- Medio PALCAM

Componente	Cantidad por Litro
Columbia, Base de Agar	39 g
Glucosa	0,5 g
Amonio Hierro (III) Citrato	0,5 g
Rojo de Fenol	0,08 g
Extracto de Levadura	3 g
Esculina	0,8 g
Manita	10 g
Litio Cloruro	15 g
pH 7,2	

Tabla 9: Componentes del medio PALCAM (Van Netten et al., 1989)

Para su preparación se utiliza un preparado comercial (PanReac AppliChem 415380.1210). Se suspenden 34,5 g de este en 500 mL de agua destilada, y posteriormente se autoclava a 121 °C durante 20 minutos. Después se vierte en placa a razón de 20 mL/placa. La siembra se realiza con a partir de la muestra previamente inoculada en caldo Fraser.

Este medio se utiliza para la detección de *Listeria*, la cual crece formando colonias de color verde rodeadas de un halo marrón o negro.

- Solución salina 0,9%

Componente	Cantidad por Litro
NaCl	9 g

Tabla 10: Componente de la Solución Salina

Para su preparación, se pesaron 0,9 g de NaCl por cada 100 mL de agua destilada y se repartieron en tubos a razón de 9 mL/tubo. Después, se esterizaron en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Esta solución se utilizó para preparar las diluciones seriadas de las muestras de Biofloc y llevar a cabo las siembras en los distintos medios de cultivo citados anteriormente.

### 3.3. Diseño experimental

Para la consecución de los objetivos propuestos en este trabajo, se siguió el esquema de trabajo que aparece en la Figura 4.

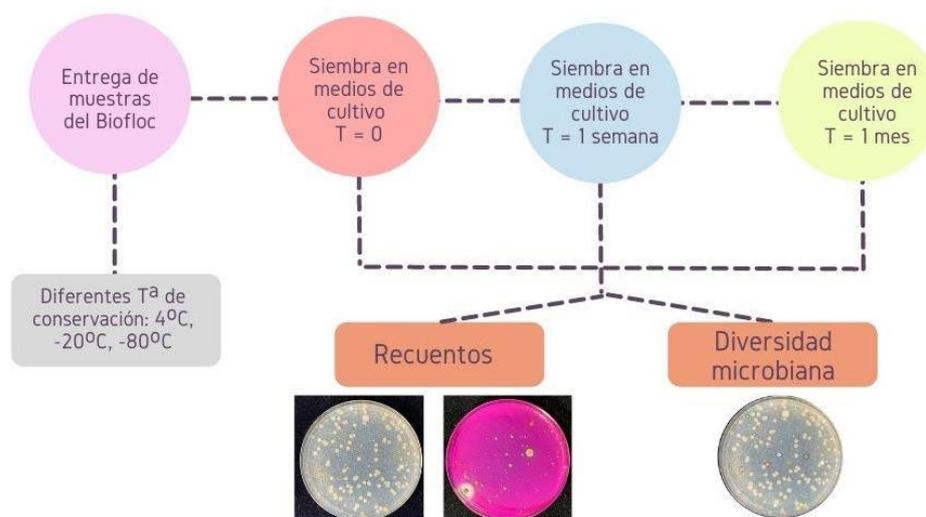


Figura 4: Diseño Experimental

### 3.4. Evaluación de la presencia o ausencia de microorganismos patógenos humanos

La seguridad biológica de las muestras, que en última instancia van a ser parte del microbioma intestinal de langostinos comestibles, es fundamental. Por ello, inicialmente se realizó un análisis de presencia contaminación fecal a las muestras. En primera instancia se hicieron dos pruebas para comprobar la presencia o ausencia de dos patógenos de interés agroalimentario: *Salmonella* y *Listeria*.

Para la detección de *Salmonella* se hizo una siembra en medio Hektoen. Para lo cual un primer paso fue filtrar a vacío 100 mL de Biofloc que había sido conservado a 4 °C, mediante un matraz Kitasatos con un filtro de 0,45 µm, tal y como se observa en la Figura 5. Una vez filtrado, se dispuso el filtro con pinzas estériles sobre el medio Hektoen y se incubó a 37 °C.



Figura 5: Sistema de filtrado utilizado

Para la detección de *Listeria* en la muestra de Biofloc se utilizó caldo Fraser, inoculando en dicho medio 1 mL del Biofloc conservado a 4 °C y se incubó a 37 °C. Para confirmar el resultado obtenido tras la inoculación en caldo Fraser, debe hacerse una siembra en Agar PALCAM. Sumergiendo el asa de siembra en el tubo inoculado de caldo Fraser, se hizo una siembra en aislamiento en la placa de Agar PALCAM. Tras eso, las placas se incuban a 37 °C durante 48 horas bajo condiciones de microaerofilia.

### 3.5. Estudio de la tolerancia a la salinidad

También se evaluó la tolerancia de los microorganismos del Biofloc a la salinidad haciendo diluciones de las muestras, con diferentes concentraciones de solución salina (0,9 y 2%), llegando hasta la dilución 1/10000. Se hicieron siembras tanto en medio APHA como en Marine Broth para establecer una comparativa entre los crecimientos microbianos de ambos medios.

### 3.6. Evaluación de la microbiota presente en los Bioflocs

#### 3.6.1. Dilución y siembra en medios de cultivos

Con respecto a este primer objetivo, el estudio de la microbiota presente en las muestras de Biofloc conservadas a diferentes temperaturas, se llevó a cabo mediante dilución y siembra en los medios de cultivo APHA, Rosa de Bengala y medio nitrificantes, descritos con anterioridad.

Inicialmente, se descongelaron las muestras que habían sido mantenidas en congelación. Se procedió a su dilución, para ello se tomó 1 mL de muestra de Biofloc y se incorporó a un tubo de vidrio con 9 mL de solución salina al 0,9% (Dilución 1/10). De nuevo, 1 mL de este último tubo se incorporó a otro tubo con 9 mL de solución salina (Dilución 1/100). Seguidamente, 100 µL de cada

dilución se sembraron en los medios indicados, tal y como se describe en el esquema de la Figura 6. Se tuvieron en cuenta tres réplicas de cada muestra analizada.

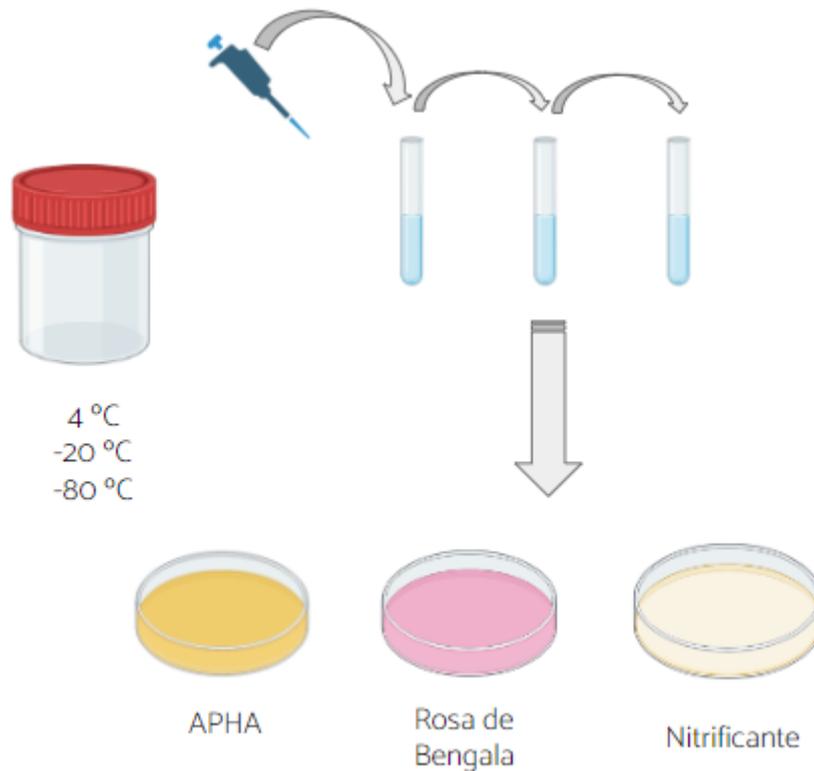


Figura 6: Protocolo de dilución y siembra

Las placas de APA y Rosa de Bengala se incubaron a 30 °C durante 24 y 96 horas respectivamente. Las placas de medio para nitrificantes se incubaron durante 1 semana a temperatura ambiente. Pasados los tiempos de incubación correspondientes, se hicieron recuentos de unidades formadoras de colonias en placa atendiendo a la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{n^{\circ} \text{ de colonias} * \text{inverso de la dilución}}{\text{volumen sembrado}}$$

El protocolo indicado en la Figura 6, esto es, las diluciones en solución salina estéril al 0,9% y sus posteriores siembras en los distintos medios de cultivo, se llevaron a cabo con muestras de Biofloc conservadas a 4 °C, -20 °C y -80 °C. Se llevó a cabo el mismo procedimiento para cada muestra a tiempo 0 (T<sub>0</sub>), cuando llevaban 7 días conservadas a 4 °C, y pasado un mes.

Las muestras de Biofloc llegaron en botes de tapón rojo (duquesas) desde la Universidad Politécnica de Valencia refrigeradas. Se dividieron en tres grupos, según la temperatura de conservación a la que iban a ser sometidas. Aquellas que iban a conservarse a 4 °C pudieron procesarse desde el momento de la recepción. En cuanto a las destinadas a congelación, se mantuvieron una semana en sus correspondientes congeladores, a -20 °C y -80 °C. 18 horas antes de analizarlas, se sacaron las muestras para que estuviesen en estado líquido en el momento de su procesado. Una vez hecho el protocolo a T<sub>0</sub>, todos los botes con las muestras de Biofloc se llevaron a cámara fría para su conservación a 4 °C hasta los siguientes muestreos (7 días y un mes).

### 3.6.2. Diversidad microbiana en los Bioflocs

Las placas obtenidas tras los recuentos se utilizaron para observar y caracterizar macroscópicamente los morfotipos mayoritarios. Esta metodología permitía hacer un seguimiento de aquellos morfotipos que sobrevivían a la conservación, tras una semana o un mes, desde la primera evaluación. Para ello, se realizaron aislamientos de dichos morfotipos en placas de medio APHA mediante siembras por estrías y se enumeraron para su posterior diferenciación.

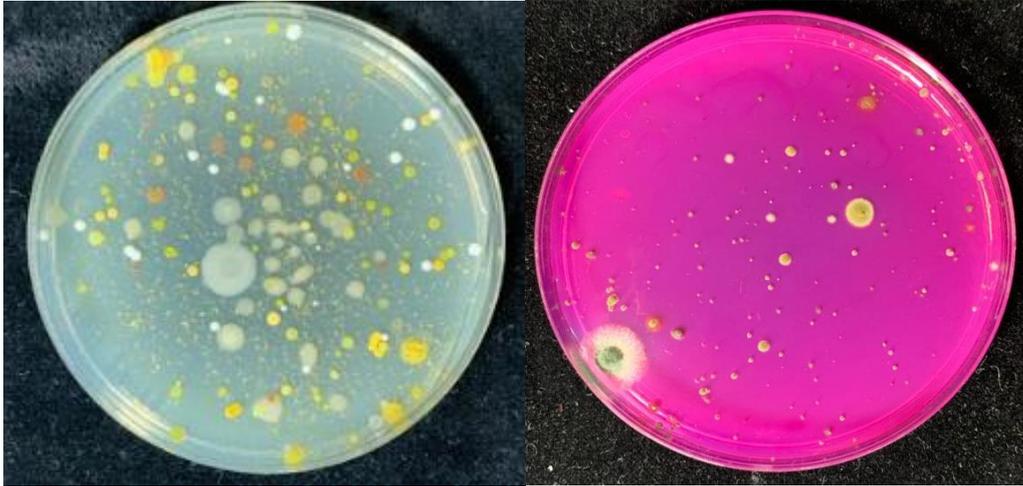


Figura 7: Ejemplos de crecimiento microbiano en APHA y Rosa de Bengala

## 3.7. Estudio de metataxonómica

### 3.7.1. Secuenciación de DNA. Creación de librerías

Para un estudio más exhaustivo de la microbiota presente en las diferentes muestras se llevó a cabo un análisis metataxonómico de las mismas. La extracción de ADN se realizó con el Kit Power Soil, Quiagen. Se procesaron tres réplicas para cada una de las muestras. Los cebadores que se utilizaron en la amplificación de ADN fueron Bakt 341F (50CCT ACG GGN GGC WGC AG 30) y Bakt 805R (50 GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC 30). Ambos cebadores amplifican las regiones variables V3-V4 del gen 16s rRNA, con un tamaño esperado de 530 pb. Además, se pusieron controles para comprobar la posibilidad de que ocurriese contaminación cruzada y problemas de contaminación durante la construcción de la biblioteca. Tras la amplificación del material genético mediante PCR, se realizó la secuenciación de las muestras con un equipo MiSeq PE300 (Illumina).

### 3.7.2. Análisis metataxonómico de los datos

La calidad de los archivos FASTQ demultiplexados se revisaron a través del software FastQC; y el ensamblaje por pares de las lecturas R1 y R2 se hizo con FLASH (longitud mínima de solapamiento: 30 pb). Las secuencias se analizaron mediante el programa QIIME2 versión 2021-04 (Boyle et al., 2019). Dada2 fue utilizado para la eliminación de quimeras, ruido y realizar un filtrado de calidad de las secuencias ( $q=25$ ). Para asignar la taxonomía se utilizó el método “classify-sklearn” junto a la base de datos “sillva-138-99-nb-weighted-classifier”. Se seleccionaron aquellas familias con más de un 0,5% de abundancia. En lo que respecta a los índices de biodiversidad, se calcularon dos índices de biodiversidad alfa: el índice de Chao1 (riqueza de las muestras) y el índice de Shannon (diversidad

de las muestras). Los datos metataxonomicos y de biodiversidad fueron representados utilizando el programa R versión 4.1.0.

### 3.8. Análisis estadístico

Todos los análisis del experimento se realizaron por triplicado. Los datos de recuentos en placa se analizaron utilizando el programa Statgraphics Centurion 19 (Statistical Graphics Co.). Se realizaron análisis de varianza ANOVA multifactorial entre las distintas variables. Se llevó a cabo una prueba de múltiples rangos en la que se comprobó si los grupos evaluados eran homogéneos entre sí con un nivel del 95% de confianza ( $p < 0,05$ ). También se tuvieron en cuenta Test de Mínima Diferencia Significativa de Fisher (LSD) para identificar los posibles grupos homogéneos al comparar las diferentes temperaturas y los diferentes grupos microbianos.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, de acuerdo con los objetivos planteados, se mostrarán los resultados obtenidos durante la ejecución de este Trabajo Fin de Grado, acompañados de una breve discusión de los mismos.

Los resultados se organizarán en bloques experimentales bien diferenciados. En primer lugar, el bloque relacionado con la evaluación de la presencia o ausencia de microorganismos patógenos humanos en el Biofloc. En segundo lugar, se evaluará la tolerancia de los mismos a la salinidad. Se continuará detallando la microbiota presente en el Biofloc y su evolución bajo conservación. Para finalizar con un estudio de metataxonómica.

### 4.1. Evaluación de la presencia o ausencia de microorganismos patógenos humanos

Hoy en día el agua potable está clasificada como alimento, y se han establecido numerosas normas, para garantizar su calidad y seguridad. Los estrictos requisitos microbiológicos, especifican que el contenido bacteriano debe ser muy bajo y que los patógenos deben ser detectados y eliminados (Trienekens y Zuurbier, 2008). Actualmente hay múltiples metodologías para detectar la contaminación microbiana del agua empleada concretamente para la alimentación de animales que posteriormente serán aportados al consumo humano. En nuestro trabajo como indicadores microbiológicos para la evaluación del agua utilizada en los sistemas Biofloc, se optó por la detección de infecciones por bacterias tales como *Salmonella* y *Listeria* mediante siembra en medio Hektoen e inoculación en caldo Fraser y posterior siembra en Agar PALCAM, ya que son patógenos de reconocido interés mundial.

Las pruebas pusieron de manifiesto que dentro de la microbiota del Biofloc, no se encontraba ningún microorganismo patógeno y, por tanto, era apto para uso en alimentación animal y su posterior consumo de langostinos en humanos. De forma similar a lo realizado en este trabajo, otros autores han utilizado este procedimiento con la finalidad de detectar organismos patógenos más frecuentes en las industrias de la alimentación y el agua, debido a la rápida propagación de enfermedades transmitidas por estos dos medios (Rajapaksha et al., 2019).

## 4.2. Estudio de la tolerancia a la salinidad

La acuicultura en general puede experimentar una amplia variación de la salinidad debido a las precipitaciones o a la entrada de agua dulce (Tian et al., 2020). Sin embargo, nuestros conocimientos sobre el impacto de la salinidad en el crecimiento de los grupos microbianos presentes en nuestras muestras de Biofloc, sumado a la variable temperatura de conservación de las mismas, son muy limitados. En este estudio, se evaluó la tolerancia a la salinidad de la microbiota del Biofloc buscando conocer su supervivencia a varios tratamientos de salinidad. Pero antes de llevar a cabo este ensayo, se quiso comprobar si existen diferencias en la densidad celular y en los morfotipos observados tras realizar siembras del Biofloc en un medio específico para bacterias heterótrofas marinas (medio Marine), en comparación con la siembra en medio general APHA. Hubo crecimiento en los dos medios de cultivo, en el medio general y en el marino, poniendo de manifiesto la capacidad de las bacterias del Biofloc para crecer en medios selectivos para microorganismos tolerantes a la salinidad, asegurando así su correcto crecimiento a la hora de implementarlo a tanques de agua salada para acuicultura.

Como prueba adicional para confirmar que la microbiota constituyente del Biofloc crecía con normalidad en condiciones de salinidad, fueron expuestas a dos niveles de salinidad (0,9% y 2%). Para ello se hicieron diluciones de diferentes muestras de Biofloc en ambas concentraciones de solución salina al 0,9% como al 2% y se sembraron en medio APHA (Bacterias Aerobias Mesófilas), medio nitrificantes (Bacterias Nitrificantes) y Rosa Bengala (Hongos). Tras su incubación a 30 °C se hicieron recuentos de cada grupo microbiano, expresados como Log UFC/mL. Los valores obtenidos aparecen representados en la Figura 8. De los datos se desprende, que todos los grupos microbianos mostraron niveles de tolerancia a la salinidad, ya que se obtuvo recuentos en sus medios específicos. Lo que resultó evidente es que no existían diferencias significativas entre las siembras hechas con las diferentes concentraciones de solución salina.

En general, estos resultados confirman que los grupos microbianos presentes en el sistema Biofloc, pueden adaptarse a las condiciones variables de salinidad, y su crecimiento tan sólo parece estar limitado por la temperatura a la cual han sido conservados, afectando de una manera específica a cada grupo microbiano.

Como se pone de manifiesto en la Figura 8, las muestras pertenecientes a los Biofloc denominados como BF2 y 3 no presentan diferencias significativas entre ellas, mientras que BF1 sí. Esto se debe a que las muestras 2 y 3 se procesaron en el momento de la recepción, mientras que la etiquetada como BF1 llevaba una semana conservada en refrigeración. Se utilizaron muestras diferentes para comprobar que no existen alteraciones de tolerancia a la salinidad en diferentes momentos del proceso de conservación.

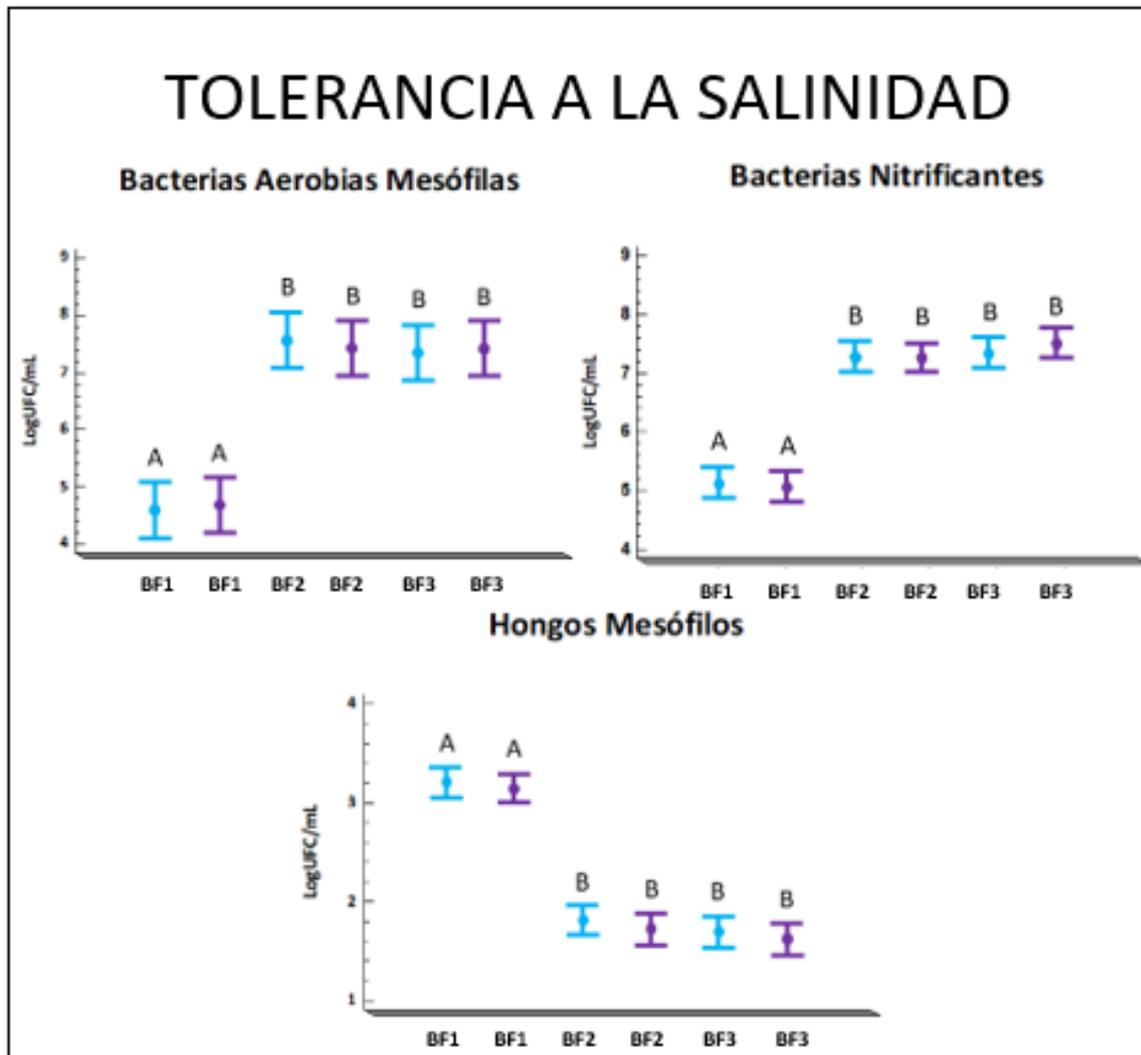


Figura 8: Recuentos de bacterias aerobias mesófilas cuyas muestras fueron previamente diluidas en solución salina a diferentes concentraciones, siendo estas al 0,9% (azul) y al 2% (morado) en medio APHA. Cada dato viene acompañado de su desviación estándar. Además, se diferencian los grupos homogéneos de datos con letras de la A a la B sobre cada punto del gráfico atendiendo a la existencia o no de diferencias significativas entre ellos ( $P < 0,05$ ).

### 4.3. Evaluación de la microbiota presente en los Bioflocs

#### 4.3.1. Recuentos microbianos en medios de cultivo

Para determinar la presencia de los distintos grupos microbianos que integran el Biofloc, se procedió a hacer diluciones seriadas en solución salina al 0,9%, siembra en medios de cultivo específicos para cada grupo e incubación a 30 °C. Tras lo cual, se obtuvieron recuentos microbianos por muestra y medio de cultivo, basados en la observación de unidades viables formadoras de colonias representadas gráficamente mediante el logaritmo en base 10 (Log UFC/mL).

Como factores de variabilidad en esta fase, se tuvieron en cuenta cada uno de los grupos microbianos analizados, el tiempo de incubación ( $T_0$ , 7 días y 1 mes) al cual se realizaron los recuentos, condiciones de conservación (a 4 °C, -20 °C y -80 °C) y las tres repeticiones correspondientes a cada bloque experimental.

Los datos obtenidos de los recuentos de los diferentes grupos microbianos se recogen en las siguientes figuras: Figura 9 (recuentos de Bacterias Aerobias Mesófilas), Figura 10 (recuentos de Bacterias Nitrificantes) y Figura 11 (recuentos de Hongos).

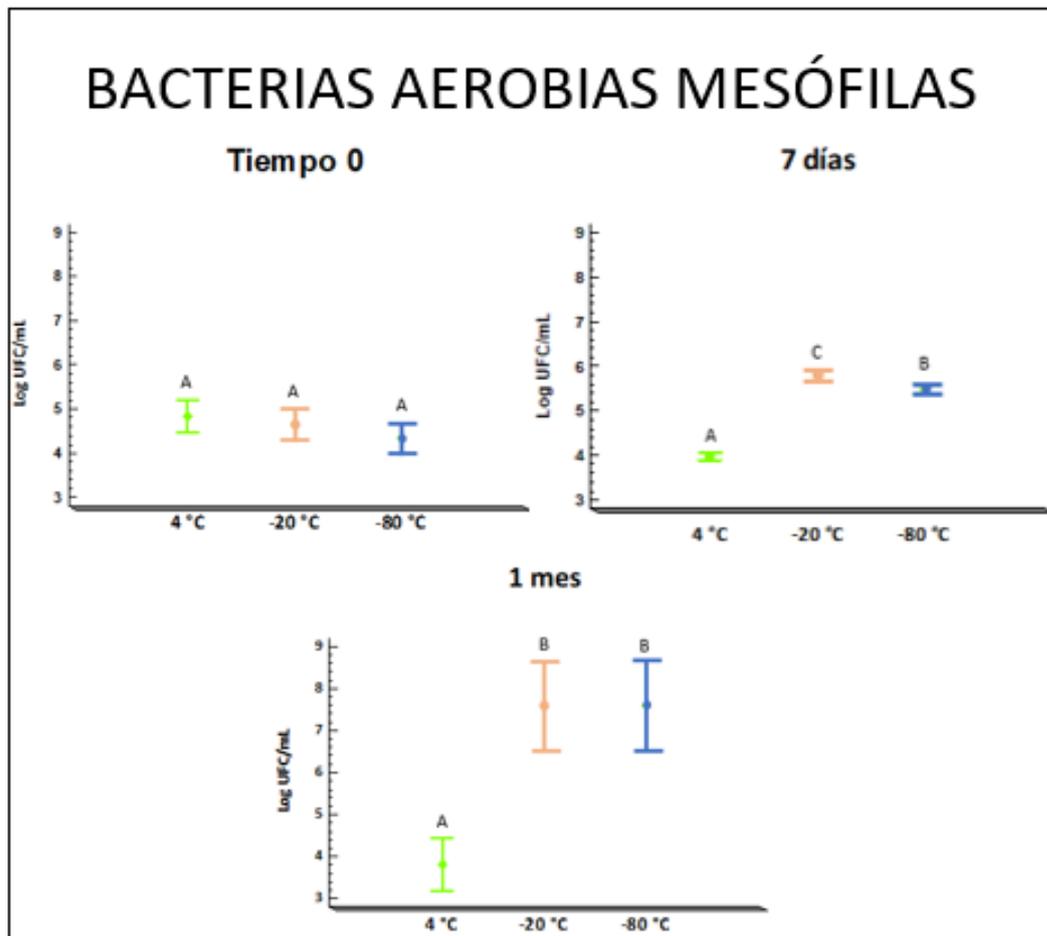


Figura 9: Recuentos de bacterias aerobias mesófilas (Log UFC/mL) en medio APHA en las diferentes temperaturas de conservación a tiempo 0, pasados 7 días y pasado un mes. Se representan con diferentes colores las distintas medias de Log UFC/mL de los recuentos a 4 °C (verde), -20 °C (naranja) y -80 °C (azul). Cada dato viene acompañado de su desviación estándar. Además, se diferencian los grupos homogéneos de datos con letras de la A a la C sobre cada punto del gráfico atendiendo a la existencia o no de diferencias significativas entre ellos ( $P < 0,05$ ).

Las bacterias heterótrofas conforman el grupo más abundante y de mayor biodiversidad del Biofloc, y contribuyen a la manutención de la calidad del agua. Además, son los microorganismos de este grupo microbiano los que cuentan con la capacidad de proteger al animal que se va a cultivar, de agentes patógenos que forman parte de su dieta (Ruiz et al., 2020). Éstas forman parte fundamental de las Bacterias Aerobias Mesófilas que se desarrollan en los tanques y que se midieron en el experimento sobre el medio APHA. Los valores iniciales no mostraron diferencias significativas respecto a las diferentes temperaturas de conservación de las muestras de Biofloc. Tal y como se puede observar en la Figura 9, los valores se encuentran en torno a 4 y 5,5 Log UFC/mL. Sin embargo, tras los 7 días de conservación, tan sólo en las muestras de Biofloc conservadas a 4 °C, se observó un ligero descenso hasta alcanzar un valor de 4,5 Log UFC/mL, mientras que los recuentos en las muestras criopreservadas, la densidad microbiana aumentó hasta un valor de 6 Log UFC/mL.

En cuanto a la última medida realizada, tras un mes de conservación, la microbiota aerobia mesófila de las muestras conservadas a -20 °C y -80 °C mostraron unos recuentos en torno a 7,5-9 Log UFC/mL, con una clara tendencia al alza que podía deberse a la existencia de microorganismos psicrótrofos en las muestras, cuya presencia se evaluó en el Apartado 4.3.1.1. Mientras que las conservadas a 4 °C, obtuvieron los menores recuentos, con unos valores cercanos a 3 Log UFC/mL.

Los datos obtenidos de recuentos de bacterias aerobias mesófilas a tiempo 0 en todas las temperaturas de conservación rondan las 4,5 unidades logarítmicas. Estos valores se corresponden con los obtenidos en otros estudios, en los que a tiempo 0 se alcanzaron 4,81 Log UFC/mL para este grupo microbiano (Yuvarajan, 2021). Sin embargo, los recuentos obtenidos en nuestro ensayo en las muestras refrigeradas pasado un mes muestran un ligero descenso en la densidad de bacterias aerobias mesófilas (3,81 Log UFC/mL), mientras que en dicho estudio aumentó hasta alcanzar 5,73 Log UFC/mL. Esto podría deberse a que en el estudio realizado por Yuvarajan et al., se trabajó con tanques que contenían al animal de cría. Trabajar en presencia de animales tiene el beneficio de que en el medio hay, a parte de la fuente de carbono que se adiciona, productos de desecho de compuestos de nitrógeno. Las bacterias heterótrofas son capaces de llevar a cabo síntesis de proteínas aprovechables por el langostino a partir de estos compuestos (Ahmad et al., 2017). El hecho de haber trabajado con Biofloc crecido sin presencia animal puede haber sido motivo de que en el caso de las muestras conservadas a 4 °C las bacterias heterótrofas no hayan sufrido un crecimiento pasado un mes.

De entre las posibles fuentes de carbono a utilizar, la melaza es la más general aplicada en Biofloc y, más concretamente en cultivo de camarones, porque funciona bien y además es de bajo coste (Minaz & Kubilav, 2021). El buen funcionamiento de las melazas como fuente de carbono reside en que es un carbohidrato simple. Las bacterias heterótrofas son capaces de degradarla rápidamente, así que supone un aporte continuo de sustrato para ellas, aumentando su capacidad de metabolizar amonio, contribuyendo a su vez, a mantener la calidad del agua (Khanjani et al., 2017). De ahí que, para la producción de estos Bioflocs, se optará por el uso de melazas como base carbonada para el crecimiento microbiano. En el mismo orden de idea, utilizar como fuente de carbono la tapioca, en presencia de langostinos, propicia una mayor asimilación de proteínas y de lípidos, haciendo que la biomasa microbiana del Biofloc se vea favorecida porque el animal genera más productos de desecho asimilables por las bacterias, cosa que influye directamente en su crecimiento (Ekasari et al., 2014). Por el contrario, el uso de fuentes de carbono complejas como harinas, conlleva a que las bacterias heterótrofas las degraden con más lentitud y lleguen a estabilizarse en el tanque (Khanjani et al., 2017). Si por algún motivo se quisiese utilizar una fuente de carbono de esta índole, convendría fermentarlos antes de adicionarlos.

Aunque en líneas generales, se puede confirmar que sucede un aumento en la densidad microbiana de bacterias aerobias mesófilas de las muestras crioconservadas, frente a un leve descenso en las refrigeradas. Sin embargo, esta información debe complementarse con los resultados de los estudios de diversidad y metataxonómicos descritos en los Apartados 4.3.2. y 4.4.

Por otra parte, al hacer referencia a los resultados obtenidos del análisis de recuentos de bacterias nitrificantes puesto de manifiesto en la Figura 10, y en consonancia con los ocurrido con las

bacterias heterótrofas, conforme avanzaba el tiempo de conservación, los recuentos de este grupo microbiano eran superiores. No obstante, las muestras crioconservadas superaron en densidad celular (en torno a 9 Log UFC/mL), a los obtenidos en las muestras refrigeradas (en torno a 7 Log UFC/mL).

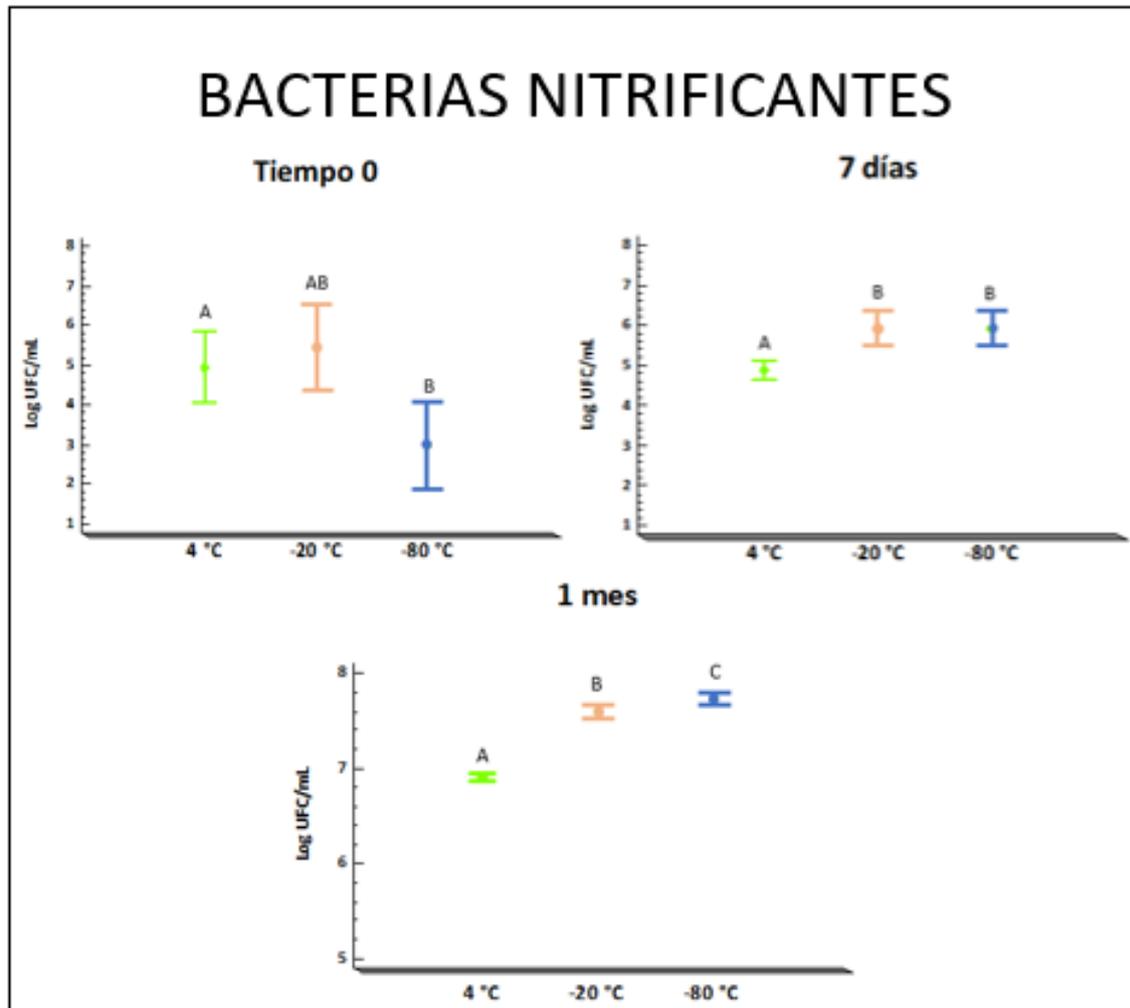


Figura 10: Recuentos de bacterias nitrificantes (Log UFC/mL) en medio en placa para nitrificantes en las diferentes temperaturas de conservación a tiempo 0, pasados 7 días y pasado un mes. Se representan con diferentes colores las distintas medias de Log UFC/mL de los recuentos a 4 °C (verde), -20 °C (naranja) y -80 °C (azul). Cada dato viene acompañado de su desviación estándar. Además, se diferencian los grupos homogéneos de datos con letras de la A a la C sobre cada punto del gráfico atendiendo a la existencia o no de diferencias significativas entre ellos ( $P < 0,05$ ).

Por consiguiente, decir que mostraron una tendencia en consonancia con lo esperado. Para ser más específicos, se ilustra el proceso de nitrificación que consta de dos etapas: una primera donde ocurre la transformación de amonio a nitrito (nitritación) y una segunda, en la que se produce la oxidación de nitrito a nitrato (nitratación). El nitrato, en última instancia, puede incorporarse como alimento para los langostinos. Para que las bacterias nitrificantes puedan asimilar  $\text{CO}_2$  y crecer, necesitan de la presencia de amonio en el medio (Ebeling et al., 2006).

En la misma línea, la acuicultura debe evitar niveles de amonio superiores a 1 mg/L, ya que este compuesto afectaría negativamente al crecimiento, la asimilación de nutrientes, el transporte de  $\text{O}_2$  y a la respuesta inmune. Los nitritos son incluso más tóxicos que el amonio, ya que son capaces

de inactivar a los transportadores de  $O_2$ . El último producto de las bacterias nitrificantes es el nitrato, el compuesto menos tóxico de los tres, que puede estar presente en concentraciones de hasta 75 mg/L (Robles-Porchas et al., 2020).

Con el paso del tiempo, el amonio y los nitritos se van acumulando en el medio acuoso del Biofloc al ser productos de desecho de muchas de las bacterias en suspensión (Avnimelech, 2015). La presencia de bacterias nitrificantes al principio del cultivo es relativamente baja. Los microorganismos nitrificantes presentes en el Biofloc necesitan entre 2 y 3 semanas para crecer lo suficiente tras asimilar los niveles de amonios presentes en la muestra (Xu et al., 2020). Este hecho se ve reflejado en las gráficas correspondientes a tiempo  $T_0$  y  $T_7$  días de la Figura 10. En ellas, no se encuentran apenas diferencias entre los datos de cada temperatura en el transcurso de este período.

En un estudio realizado por Flores-Valenzuela et al. (2021) los recuentos de bacterias nitrificantes alcanzaron valores en torno a 6,74 Log UFC/mL. Este dato se corresponde con el dato obtenido en los recuentos realizados en el presente trabajo tras un mes (6,902 Log UFC/mL), tiempo suficiente para la producción y asimilación de amonio por parte de este grupo microbiano.

En último lugar, formando parte de la microbiota del Biofloc encontramos los hongos mesófilos y algunas levaduras, que aprovechan la presencia de materia orgánica en forma de azúcares en el medio para crecer (Emerenciano et al., 2017). Constituyen el grupo minoritario, de los tres grupos objeto de estudio.

La baja presencia de este grupo microbiano puede deberse a las condiciones de conservación a las que han sido sometidas las muestras de Biofloc. Los hongos mesófilos tienen unas temperaturas mínimas de crecimiento que oscilan entre los 5 y 10 °C (Gimeno, 2002). Por eso, su crecimiento se vio ralentizado y limitado por las temperaturas de conservación a las que fueron sometidos.

En la Figura 11 podemos observar que la carga de hongos mesófilos de las muestras conservadas a 4 °C se mantiene prácticamente igual, en torno a las 3 Log UFC/mL en los tres intervalos de tiempo de muestreo. Por el contrario, en las muestras sometidas a tratamientos de congelación, la presencia de hongos disminuye con el tiempo de tal manera que acaba reduciéndose a cero en el último análisis. Por lo que para este grupo microbiano el tratamiento más interesante de conservación sería la refrigeración.

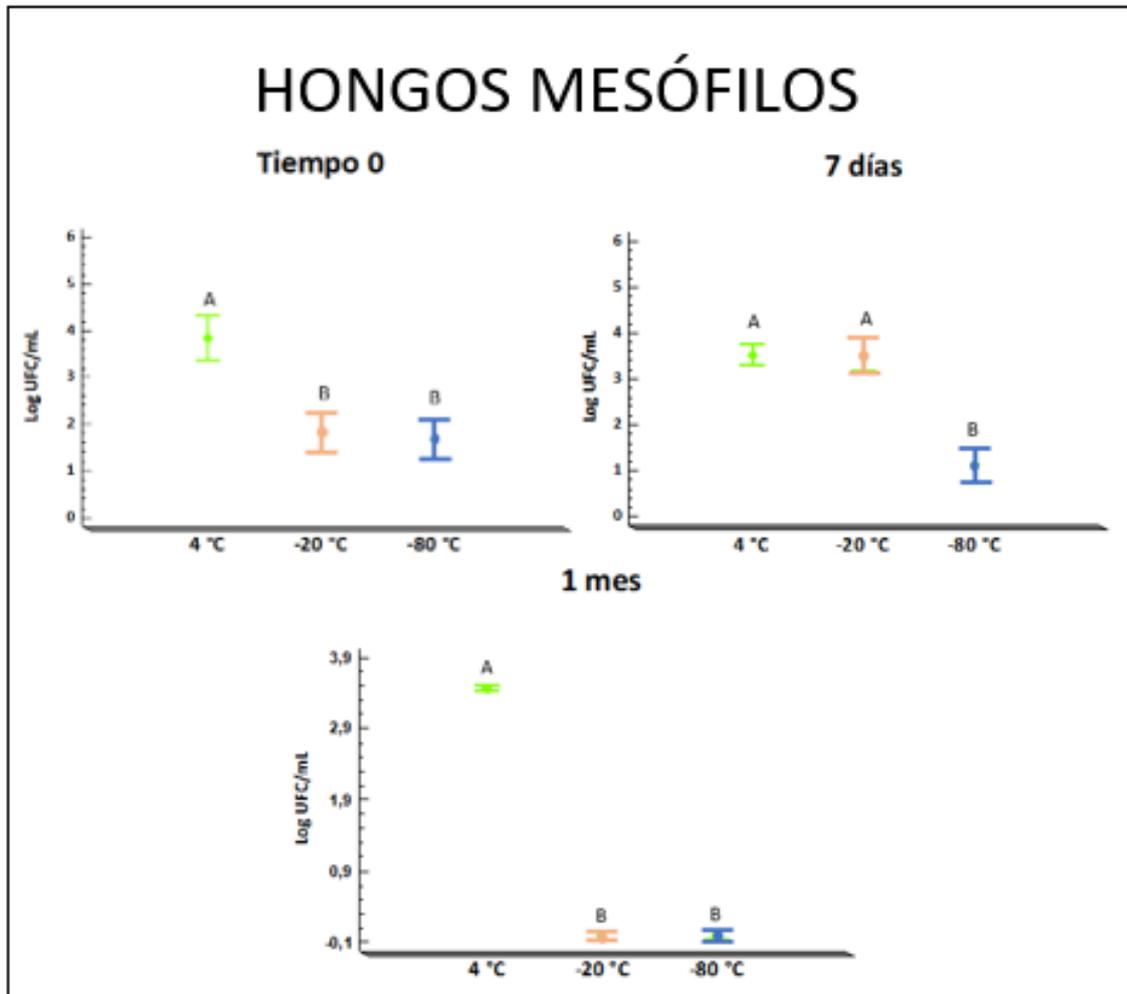


Figura 11: Recuentos de hongos mesófilos (Log UFC/mL) en medio Rosa de Bengala en las diferentes temperaturas de conservación a tiempo 0, pasados 7 días y pasado un mes. Se representan con diferentes colores las distintas medias de Log UFC/mL de los recuentos a 4 °C (verde), -20 °C (naranja) y -80 °C (azul). Cada dato viene acompañado de su desviación estándar. Además, se diferencian los grupos homogéneos de datos con letras de la A a la B sobre cada punto del gráfico atendiendo a la existencia o no de diferencias significativas entre ellos ( $P < 0,05$ ).

Los hongos mesófilos, cuando están presentes en las muestras de Biofloc, ayudan a que se formen flóculos más consistentes. Entre ellos, *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. Son dos buenos ejemplos de hongos con capacidad biofloculante. Además, dentro del marco del cultivo de langostinos, son capaces de contribuir a la estimulación del crecimiento del langostino (Kasan et al., 2018).

Los datos recogidos de recuentos de hongos (3,84 Log UFC/mL) son óptimos, ya que una carga alta de ellos estaría relacionada con Biofloc viejo y en mal estado (Emerenciano et al., 2013).

#### 4.3.1.1. Evaluación de la presencia de microorganismos psicrótrofos

Los resultados de los recuentos de bacterias aerobias mesófilas (Figura 8) ponen de manifiesto aumentos de sus niveles en las muestras conservadas en congelación pasados 7 días y un mes. Además, teniendo en cuenta que las bacterias que forman parte del Biofloc son en su mayoría de origen marino y tolerantes a bajas temperaturas, se planteó la posibilidad de que los morfotipos mayoritarios de los recuentos obtenidos en placa a T30 días, fuesen microorganismos con capacidad psicrótrofa (Kloska et al., 2020).

Para evaluarlo, se realizaron dos aislamientos de cada morfotipo en placas Petri con medio APHA y se incubó una de ellas a 4 °C y otra a 30 °C a modo de control (Figura 12). Pasadas 48 horas de incubación en las respectivas temperaturas, se observó un crecimiento prácticamente idéntico en ambas placas, por lo que se confirmó que las bacterias predominantes a T30 días, tenían capacidad psicrótrofa.

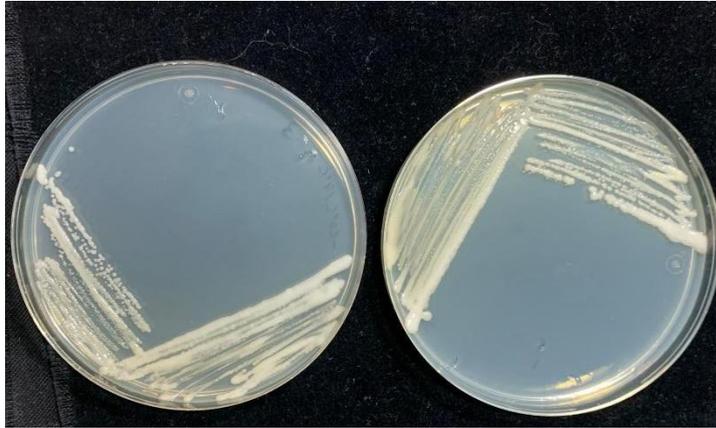


Figura 12: Ejemplo de morfotipo aislado en medio APHA incubado a 4 °C (izquierda) y 30 °C (derecha)

Estos psicrótrofos alcanzaron un crecimiento continuo con el paso del tiempo alcanzando altos valores de Log UFC/mL (Ribeiro et al., 2015). Eso se ve reflejado en el ensayo en los recuentos de bacterias aerobias mesófilas de -20 °C y -80 °C de la Figura 9. Es decir, este grupo microbiano resultó más apto para resistir las condiciones agresivas de crioconservación y, por lo tanto, tras la reactivación de las muestras y mantenimiento en cámara fría, el grupo de los psicrótrofos fue el mejor adaptado a las nuevas condiciones impuestas en el Biofloc, lo que provocó que sus recuentos en el tiempo se maximizaran.

#### 4.3.2. Diversidad microbiana

Las comunidades microbianas del Biofloc desempeñan un papel fundamental en la alimentación de los animales, así como en mejorar la calidad del agua. Sin embargo, resulta especialmente interesante la información sobre la relación entre la diversidad microbiana del Biofloc y la productividad del mismo. Ya que, en caso contrario, se dificulta la capacidad para predecir las consecuencias de la pérdida de diversidad microbiana para la seguridad alimentaria de los animales. Por consiguiente, tras las siembras de las muestras de Biofloc y sus recuentos, se procedió a realizar una caracterización morfológica de la microbiota resultante en los tres tiempos de muestreo ( $T_0$ , 7 días y 1 mes).

Los resultados se representan en la Figura 13 (morfotipos de Bacterias Aerobias Mesófilas en Biofloc 4 °C), Figura 14 (morfotipos de Bacterias Aerobias Mesófilas en Biofloc -20 °C) y Figura 15 (morfotipos de Bacterias Aerobias Mesófilas en Biofloc -80 °C), donde se resaltan los diferentes morfotipos mayoritarios identificados macroscópicamente siguiendo un código de color. En la Tabla 11 se relacionan cada cepa, con su código de color y se acompaña con una descripción morfológica detallada de los rasgos más interesantes. Cada uno de estos morfotipos seleccionados fue

confirmado previamente en su caracterización mediante aislamiento puro en una placa del medio de cultivo correspondiente.

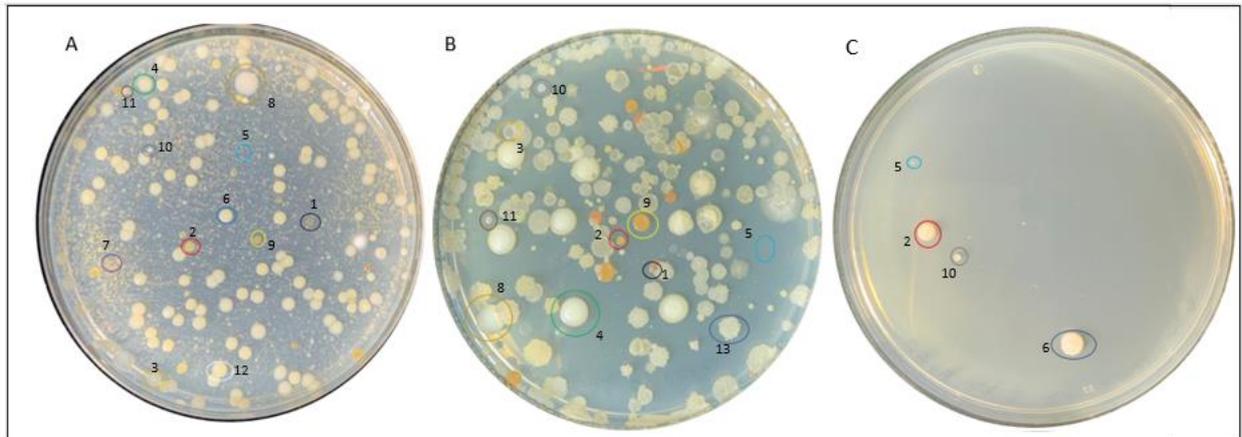


Figura 13: Evolución de las bacterias aerobias mesófilas a tiempo 0 (A), tras 7 días (B) y pasado un mes (C) a 4 °C.

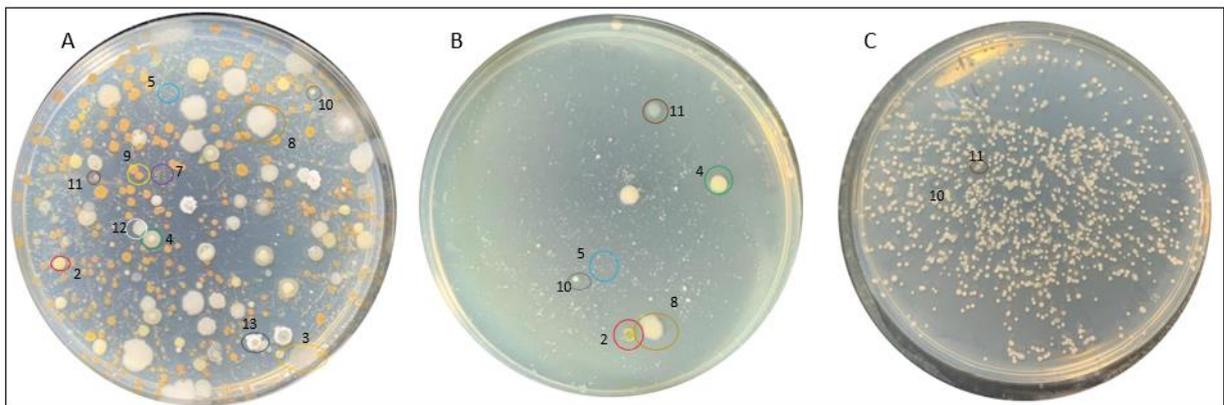


Figura 14: Evolución de las bacterias aerobias mesófilas a tiempo 0 (A), tras 7 días (B) y pasado un mes (C) a -20 °C.

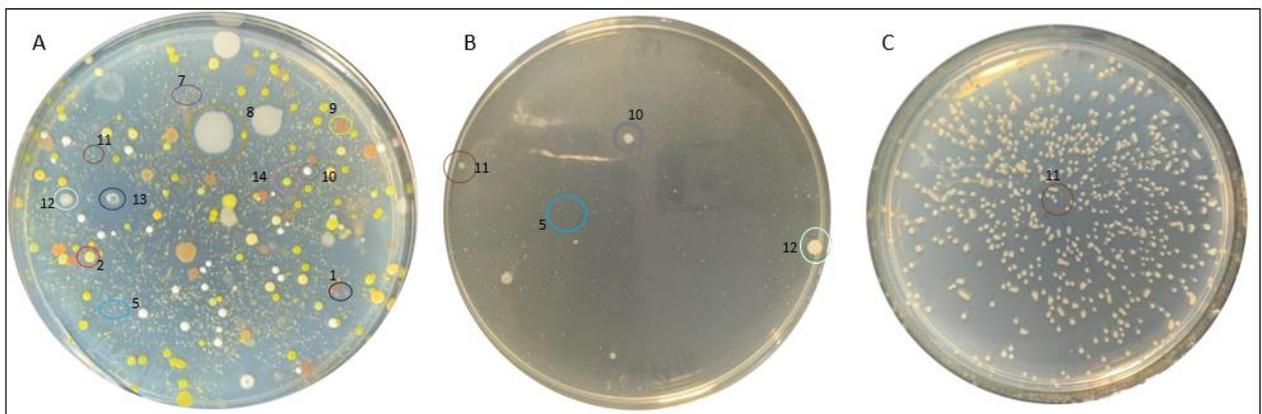


Figura 15: Evolución de las bacterias aerobias mesófilas a tiempo 0 (A), tras 7 días (B) y pasado un mes (C) a -80 °C.

En la Figura 16 a modo de resumen se recogen el número de morfotipos diferentes encontrados en las muestras de Biofloc conservadas a distintas temperaturas.

Morfotipo	Morfología colonial
<b>Morfotipo 1</b>	Forma circular, de color naranja transparentoso, plana, aspecto cremoso.
<b>Morfotipo 2</b>	Forma circular, de color naranja claro, ligeramente elevada, de aspecto cremoso.
<b>Morfotipo 3</b>	Forma ameboide, color transparentoso, aspecto viscoso, brillante, grande.
<b>Morfotipo 4</b>	Forma circular, de color crema, con un círculo crema más intenso en el interior, aspecto cremoso.
<b>Morfotipo 5</b>	Puntiforme, de color crema.
<b>Morfotipo 6</b>	Forma circular, con una región central pequeña convexa, aspecto cremoso.
<b>Morfotipo 7</b>	Puntiforme, de color naranja, aspecto brillante.
<b>Morfotipo 8</b>	Forma ameboide, color blanco, lisa, aspecto viscoso, grande.
<b>Morfotipo 9</b>	Forma circular, color naranja brillante, aspecto cremoso.
<b>Morfotipo 10</b>	Puntiforme, color blanco, espesa.
<b>Morfotipo 11</b>	Puntiforme, color crema transparentoso.
<b>Morfotipo 12</b>	Forma circular, color blanco, espeso, aspecto cremoso.
<b>Morfotipo 13</b>	Forma ameboide, elevación umbonada, bordes lobulados, color blanco.
<b>Morfotipo 14</b>	Forma circular, color amarillo brillante.

Tabla 11: Características morfológicas de los diferentes grupos microbianos presentes en las muestras de Biofloc

La microbiota del Biofloc se compone en su mayoría de microorganismos aerobios mesófilos, que viven en un medio con una aireación constante y en un rango de temperatura mesófila, a los cuales se les adiciona de forma diaria fuentes de carbono y de nitrógeno cuando se encuentran en los tanques. Sin embargo, a la hora de trabajar con ellos, se trasladan a botes de tapón rojo que, además, van a conservarse a temperaturas bajas. Pasan de desarrollarse en condiciones óptimas de temperatura, aireación y alimentación continuas a temperaturas frías, privados de oxígeno y sin entrada de fuentes de carbono y nitrógeno constantes. De entre todos los microorganismos presentes, la gran mayoría son aerobios estrictos (Phulia et al., 2012), por lo que no es de extrañar que, al cabo de un mes bajo estas condiciones, se pierda mucha biodiversidad. A pesar de que las bajas temperaturas reducen la actividad metabólica de la microbiota, muchas no son capaces de

resistirlas. Al final, acaban prevaleciendo aquellas que mejor toleran el frío y la ausencia de nutrientes y oxígeno, esto es, probablemente microorganismos anaerobios y esporulados.

Un aspecto positivo por comentar es el hecho de que no existan diferencias significativas entre la diversidad microbiana a tiempo 0 y pasados 7 días de las muestras refrigeradas. Esto deja ver que, si bien estos métodos de conservación no mantendrían la microbiota estable durante un mes, permiten mantener un Biofloc en refrigeración durante una semana sin apenas variaciones.

Sin embargo, en las muestras que inicialmente estaban congeladas tanto a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  como a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , al mantenerlas en congelación tras el primer muestreo, sufren una pérdida importante de biodiversidad microbiana. Esto podría intentar solventarse adicionando sustancias crioconservantes a las muestras de Biofloc, como glicerol al 10%. Sería una opción interesante que probar en futuros estudios de técnicas de conservación de Biofloc, con vistas a preservar un mayor número de morfotipos.

Por otra parte, y como se ha visto en experimentos llevados a cabo por varios autores, como Arias-Moscoso et al. (2016), el liofilizado de muestras de Biofloc resulta un buen método de conservación. Las muestras liofilizadas no mostraron diferencias significativas al compararlas con muestras de Biofloc *in vivo* para tamaño de partícula, morfología, ni en su composición. Sin embargo, el liofilizado cuenta con un gran inconveniente. Cuando se quiere conservar una muestra liofilizada, esta debe deshidratarse. La microbiota del Biofloc se encuentra sumergida en agua, por lo que habría que eliminar grandes cantidades de agua cada vez que quisiese conservarse una muestra utilizando esta metodología. Es un método del que se obtienen muy buenos resultados, pero que resulta costoso y difícil. En la búsqueda de alternativas de conservación menos costosas reside el interés del presente trabajo Fin de Grado.

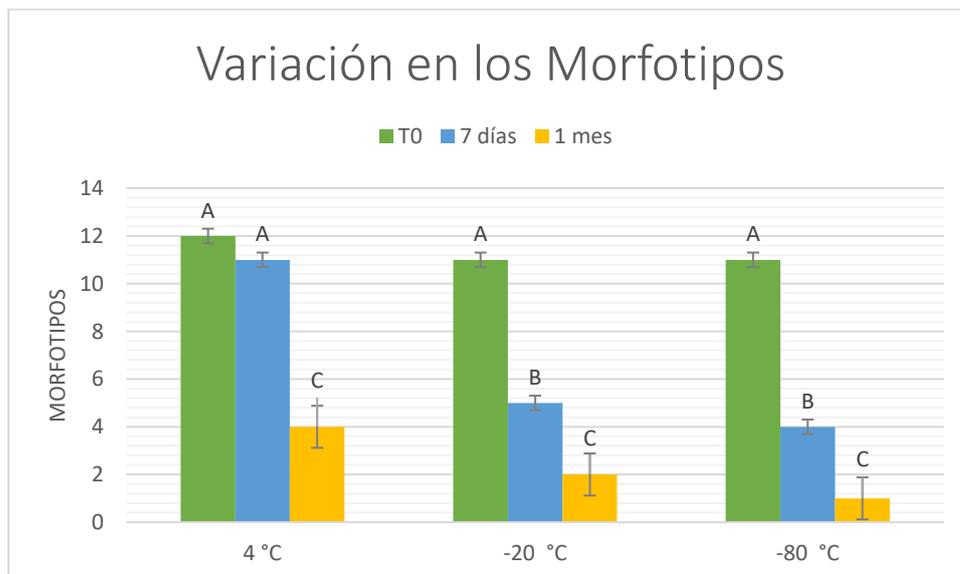


Figura 16: Variación en la diversidad de morfotipos según el tiempo y la temperatura de conservación. Cada dato viene acompañado de su desviación estándar. Además, se diferencian los grupos homogéneos de datos con letras de la A a la C sobre cada barra del gráfico atendiendo a la existencia o no de diferencias significativas entre ellos ( $P < 0,05$ ).

#### 4.4. Estudio de metataxonómica

En la Figura 17 se muestra la abundancia relativa en porcentaje de las familias más abundantes (>0,5%) de las tres muestras analizadas. Se observa una considerable disminución en la biodiversidad de las muestras al someterlas a tratamientos de congelación, pasando de 15 microorganismos a 4. El phylum de mayor abundancia tanto en las muestras a temperatura ambiente como en las congeladas a -20 °C es el *Proteobacteria*, con un 73% y un 43%, respectivamente. En ambos casos a este phylum le sigue *Chloroflexi*, que representa un 3% en las muestras refrigeradas, y un 33% en la congelada a -20 °C. Además, *Chloroflexi* se vuelve el phylum con mayor abundancia relativa en las muestras congeladas a -80 °C. Ese aumento con la congelación podría deberse a que son microorganismos adaptados al frío.

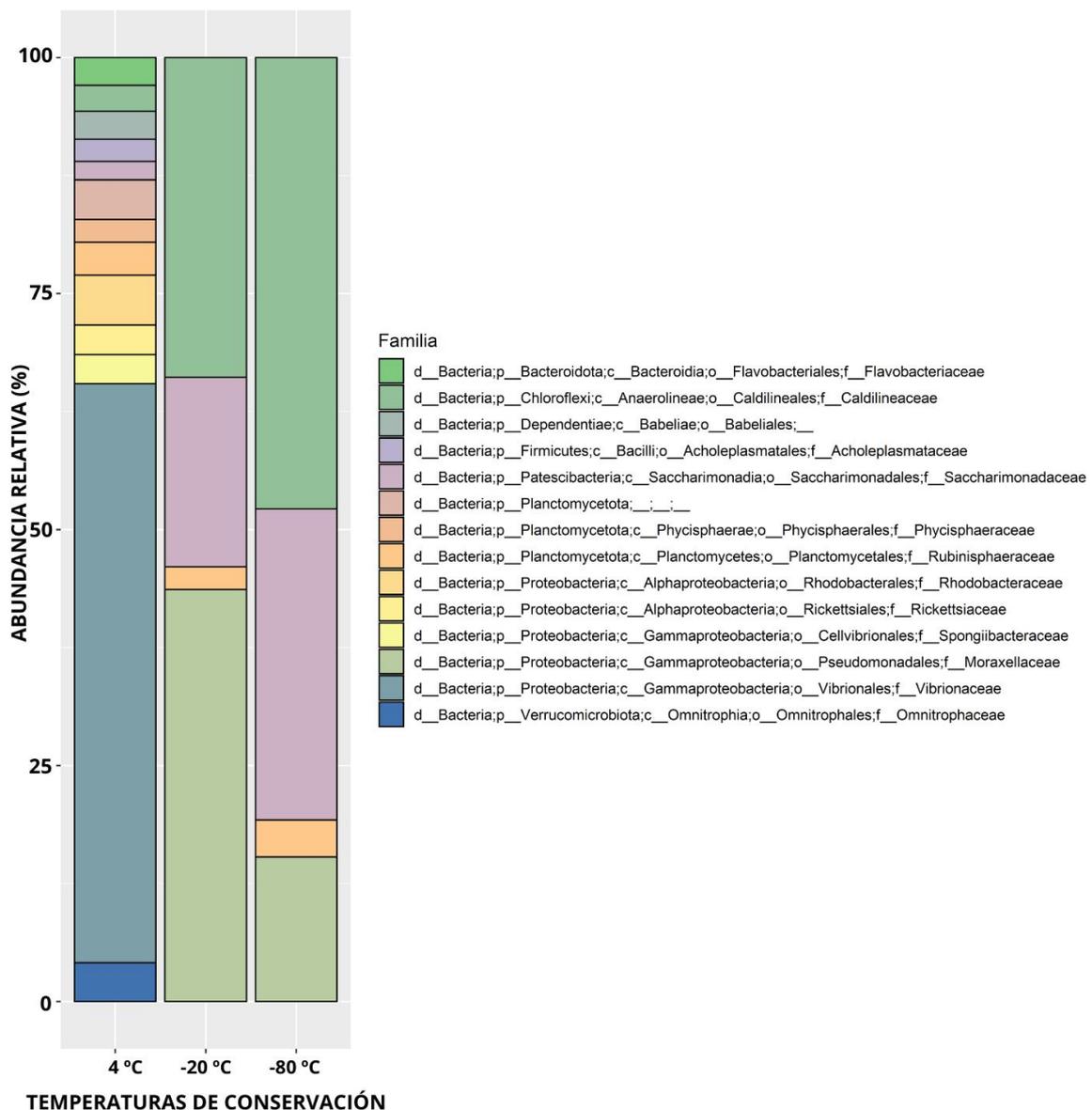


Figura 17: Porcentaje de abundancia relativa de las distintas familias presentes en las muestras de Biofloc conservadas a 4 °C, -20 °C y -80 °C

El phylum mayoritario en las muestras conservadas en refrigeración fue *Proteobacteria* (73%), siendo la familia mayoritaria *Vibrionaceae* (61,34%). El resto de familias se encuentran en proporciones similares. Las Proteobacterias son uno de los phyla más abundantes y más ampliamente distribuidos en ambientes terrestres y acuáticos. Son muy abundantes en medios marinos y, dentro de estos, su importancia reside en su capacidad para disolver materia orgánica (Zhou, 2020). Es por esto que no es de extrañar su alta presencia. Dentro de este phylum, la familia de las *Vibrionaceae* está constituida por bacterias marinas heterótrofas que son capaces de vivir en altas densidades de forma planctónica, bentónica, de zooplancton o asociadas al tracto gastrointestinal de animales marinos (Leyton et al., 2008).

Dentro del Biofloc, los microorganismos nitrificantes resultan de especial interés debido a su capacidad de transformar los productos de desecho del nitrógeno. Entre los principales grupos microbianos entre los que se encuentran representantes de microorganismos con esta capacidad se encuentran *Gammaproteobacterias*, *Bacteroidia* y *Anerolineae* (Daohe et al., 2019). Atendiendo a los resultados del estudio de abundancia relativa, Figura 17, vemos que encontramos representantes de las tres clases en las muestras conservadas a 4 °C. En las muestras sometidas a congelación aparecen a excepción de *Bacteroidia*, y se observa además una mayor abundancia de bacterias de la clase *Anerolineae*.

En el caso de las muestras que habían sido sometidas a congelación, se observa como en ambos casos el número de familias se ha visto enormemente reducido hasta quedar solo cuatro de ellas, que ambos tratamientos tienen en común: *Proteobacteria*, *Patescibacterias*, *Planctomycetes* y *Chloroflexi*.

De las ocho representantes del filo *Proteobacteria*, solo una quedó remanente tanto a -20 °C como a -80 °C: las *Moraxellaceae*. Son capaces de mantenerse al ser una familia de bacterias que poseen capacidad psicrótrofa, por lo que resisten las bajas temperaturas a las que se someten las muestras en congelación. Esta familia, además, está presente en altas densidades en ambientes marinos, y se han estudiado y descrito muchos representantes de ella en zonas de bajas temperaturas (Maruyama et al., 2000).

Ambos tratamientos de congelación también tienen en común la presencia de microorganismos del phylum *Chloroflexi*. Los microorganismos pertenecientes a este phylum son, como en el caso de las *Moraxellaceae*, microorganismos adaptados al frío. Además, su interés en Biofloc reside en su capacidad de ser un estabilizante bacteriano en los flóculos. Los representantes mayoritarios de *Chloroflexi* son los pertenecientes a la clase *Anaerolineae* (los encontrados en las muestras de Biofloc, como señala la Figura 17) y son los que cuentan con mayor actividad estabilizante (Meenakshisundaram et al., 2021). Además, este grupo microbiano también tiene capacidad nitrificante, por lo que resulta doblemente interesante.

Las *Patescibacterias* son un phylum de microorganismos también capaces de resistir condiciones de bajas temperaturas, como se observa en la Figura 17. Estas bacterias tienen especial interés cuando se hallan en ambientes fríos debido a que forman parte de los ciclos biogeoquímicos tanto del nitrógeno como del carbono. Se han encontrado representantes de este filo hasta en glaciares,

y son capaces de llevar a cabo una amplia gama de funciones metabólicas por sí mismas (Rathore et al., 2021).

El último phylum que resiste temperaturas de congelación es el *Planctomycetes*. Las bacterias pertenecientes a este grupo resultan de interés al tener capacidad de oxidar amonio (Fuerst, 2017). Son bacterias capaces de participar en el proceso de nitrificación, por lo que su presencia resulta de especial interés en los agregados del Biofloc.

El filo de mayor abundancia tanto en las muestras a temperatura ambiente como en las congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  es el *Proteobacteria*, con un 73% y un 43%, respectivamente. En ambos casos a este filo le sigue *Chloroflexi*, que representa un 3% en las muestras refrigeradas, y un 33% en la congelada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Además, *Chloroflexi* es el filo con mayor abundancia relativa en las muestras congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ese aumento con la congelación puede deberse a que, como se ha mencionado anteriormente, son microorganismos adaptados al frío. Esta reducción de la biodiversidad microbiana al someter las muestras a congelación podría reducirse si se adicionasen a las muestras sustancias crioprotectores, como glicerol al 10%. El problema subyace en que los volúmenes de inóculo son relativamente grandes en casos de reactivación de tanques, por lo que, probablemente sea necesaria una fase intermedia de regeneración de los Bioflocs en tanques de menor volumen a los comerciales.

Los porcentajes de abundancia relativa de las muestras conservadas en refrigeración se asemejan a los obtenidos en otros estudios hechos con muestras de Biofloc a temperatura ambiente. En ellas, el filo más abundante lo constituían las *Proteobacterias*, las cuales estaban presentes en un 60% de abundancia relativa. Las *Proteobacterias* constituyen el phylum de mayor abundancia relativa en la mayoría de análisis de abundancia relativa realizados a muestras de Biofloc (Cardona et al., 2016; Deng et al., 2018; Xu et al., 2021). Su presencia es importante debido a su capacidad de degradar materia orgánica y por ser partícipes del ciclo del nitrógeno (Xu et al., 2021).

Dentro del phylum *Proteobacteria*, la familia que cuenta con mayor porcentaje de abundancia relativa son las *Vibrionaceae* (61,34%). Este hecho se contrasta con los resultados obtenidos de otros estudios, como el de Panigrahi et al., en 2018. En él, esta familia contaba con un 79% de representantes del total de la muestra.

En general, el análisis de abundancia relativa revela resultados esperados al poner de manifiesto microorganismos de filos que cumplen con una serie de particularidades propias de bacterias del Biofloc: son capaces de utilizar tanto la materia orgánica presente en el medio como compuestos del nitrógeno y necesitan un soporte sobre el que crecer, como son los bioflóculos (Cardona et al., 2016).

En las Figuras 18 y 19 aparecen los índices de biodiversidad de Chao1 y de Shannon. En ambos, se aprecian claras pérdidas de riqueza microbiana entre el tratamiento de refrigeración y los de congelación.

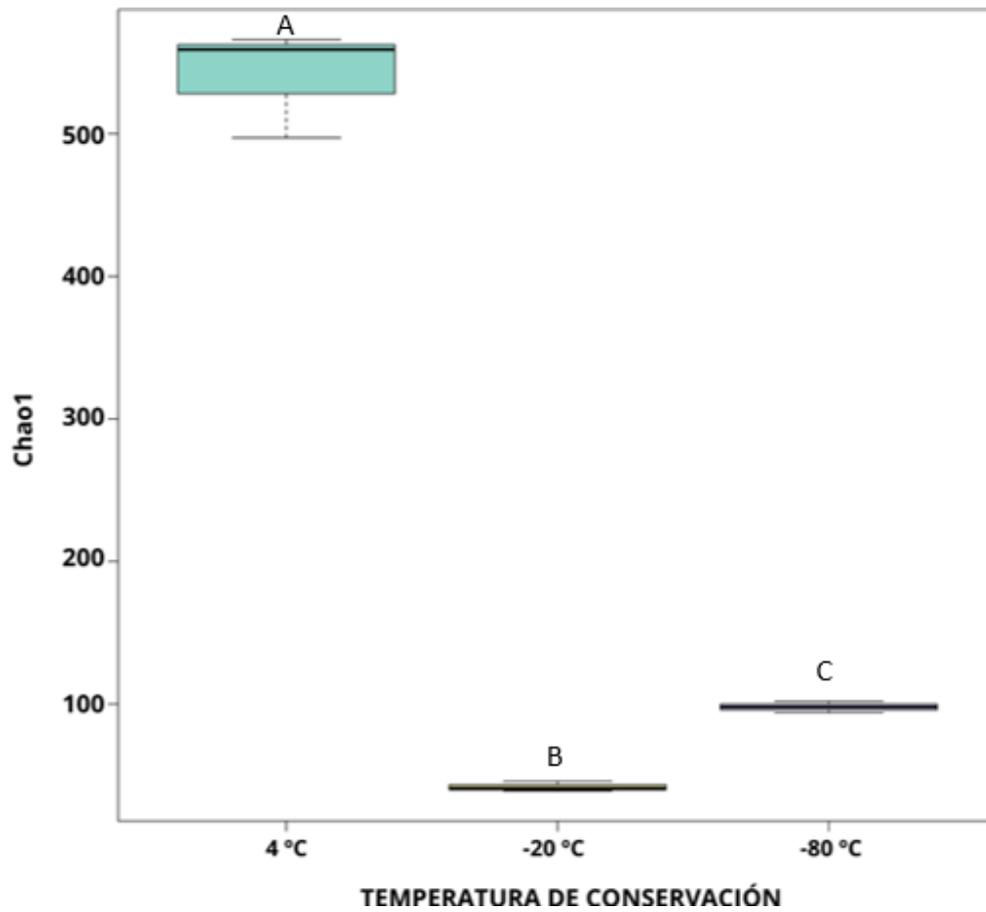


Figura 18: Índice de Chao1 para las muestras de Biofloc conservadas a 4 °C, -20 °C y -80 °C. Cada dato viene acompañado de su desviación estándar. Además, se diferencian los grupos homogéneos de datos con letras de la A a la C sobre cada punto del gráfico atendiendo a la existencia o no de diferencias significativas entre ellos ( $P < 0,05$ ).

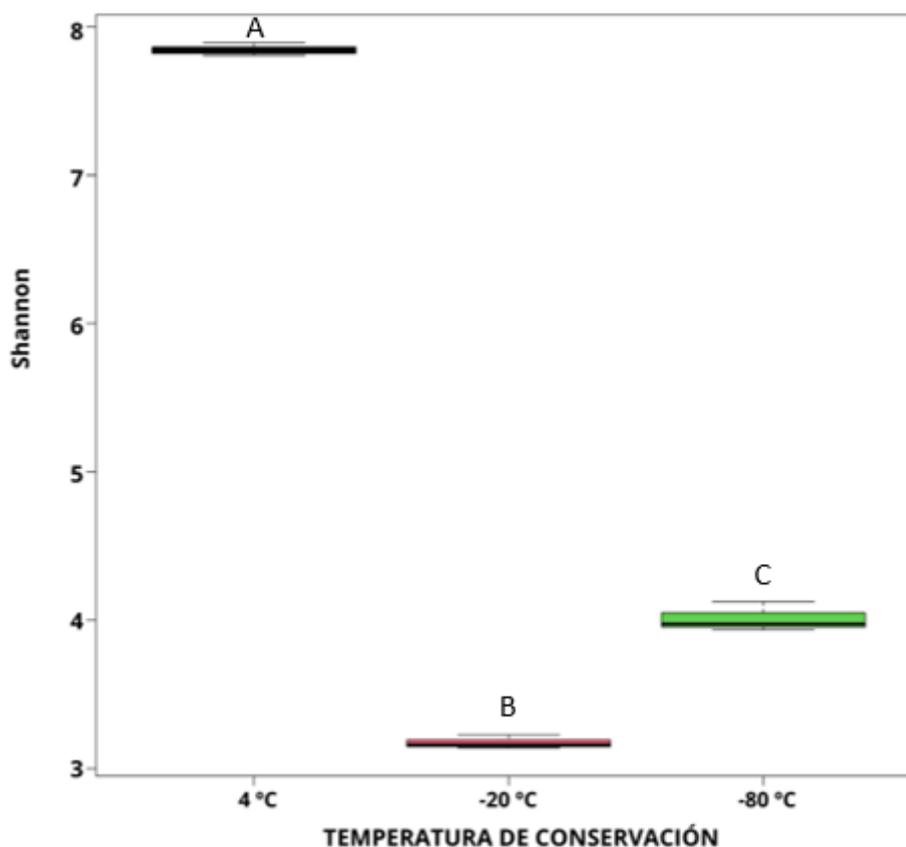


Figura 19: Índice de Shannon para las muestras de Biofloc conservadas a 4 °C, -20 °C y -80 °C. Cada dato viene acompañado de su desviación estándar. Además, se diferencian los grupos homogéneos de datos con letras de la A a la C sobre cada punto del gráfico atendiendo a la existencia o no de diferencias significativas entre ellos ( $P < 0,05$ ).

CHAO1	Media LS	Grupos homogéneos	SHANNON	Media LS	Grupos homogéneos
4 °C	540,7	A	4 °C	7,844	A
-20 °C	42,0	B	-20 °C	3,175	B
-80 °C	98,0	C	-80 °C	4,012	C

Tabla 12: Pruebas de rangos múltiples para los índices de Chao1 y Shannon ( $P < 0,05$ ).

El índice de Chao1 es un índice de biodiversidad alfa que se emplea para conocer la riqueza de especies en las muestras.

El índice de Shannon es un indicador de biodiversidad que se basa en el número de especies presentes en la muestra y su abundancia relativa, y mide el grado de incertidumbre que acompaña al seleccionar al azar un individuo de la muestra (Pla, 2006).

Valores de índice de Shannon cercanos a 1 indican la presencia de una especie muy predominante frente a las demás, valores inferiores a 2 indican diversidad baja en la muestra, el intervalo 2-3,5 equivale a diversidad media, y valores superiores a 3,5 se toman como de diversidad alta (Medrano et al., 2017). En el caso de encontrar un valor de Shannon igual a 0, indicaría que se está trabajando con un monocultivo. Según estos datos y atendiendo a la Figura 19, la muestra conservada a -20 °C tendría diversidad media (3,175), mientras que las restantes contarían con diversidad alta, en el

caso de la conservación a 4 °C muchísimo más diversa (7,84 en el índice de Shannon, comparado con 4,01 perteneciente a -80 °C).

También se observa cómo aparte de poseer resultados pobres comparados con la refrigeración, entre los propios tratamientos de congelación, las muestras conservadas a -80 °C albergaron más riqueza y más abundancia que las congeladas a -20 °C, existiendo diferencias significativas entre ellas en ambos índices (Tabla 12). Comparando los resultados obtenidos en este trabajo con los obtenidos en análisis llevados a cabo por otros autores, en el presente trabajo se obtuvieron índices de Shannon mayores, e índices de Chao1 menores. Tras la refrigeración, el índice de Shannon fue de 8, y el de Chao1 de 541. En contraste, en otros análisis se obtuvieron índices de Shannon de 5,41 y de Chao1 de 724,35 (Jiang et al., 2020), o Shannon de 4,95 y Chao1 de 687 (Xu et al., 2021). Estos índices pusieron de manifiesto la complejidad del biofloc formado en los tanques y como su potencial conservación y reactivación suponen un reto que afrontar.

## 5. CONCLUSIONES

A continuación, se describen las conclusiones más relevantes derivadas del trabajo desarrollado:

1. La congelación del preinóculo no es un buen método de conservación para muestras de Biofloc al no ser capaz de preservar gran parte de la biodiversidad microbiana. La refrigeración, sin embargo, es capaz de mantener una biodiversidad muy similar a la de las muestras biológicas de partida.
2. Las bacterias aerobias mesófilas constituyeron el principal grupo microbiano detectado en muestras de Biofloc conservadas y sus recuentos microbianos aumentaron con el tiempo de conservación de los mismos, debido a la presencia de microorganismos con capacidad psicrótrofa. Le siguieron en importancia las bacterias nitrificantes cuyo crecimiento se vio favorecido con el paso del tiempo ya que crecen a expensas de la acumulación de amonio.
3. La diversidad microbiana de los sistemas Biofloc, sufre una pérdida progresiva a lo largo del tiempo de conservación, por lo que ocasiona que la vida útil del inóculo se encuentre en torno a 7 días.
4. *Proteobacteria* es el phylum con mayor riqueza y más representantes en Bioflocs maduros. En las muestras congeladas solo prevalecen los phyla que cuentan con microorganismos resistentes al frío, generando pérdidas importantes de biodiversidad.
5. Se ha podido corroborar que la biodiversidad del Biofloc es realmente elevada, se encuentra constituida por un alto número de especies distintas, entre las que se establecen unas relaciones de interdependencia y simbiosis bajo el aporte de agua, oxígeno, salinidad, temperatura y nutrientes sencillos, para constituir un verdadero microbioma que alimenta y protege de alteraciones a la cría del langostino.

## 6. FINANCIACIÓN

La realización de este Trabajo Fin de Grado se ha llevado a cabo bajo el marco del Proyecto BIOFLANGO “Efecto de la composición de la dieta y manejo de la alimentación en el rendimiento

del camarón”, que ha sido desarrollado gracias a los fondos del Ministerio de Economía y Competitividad (PID2020-114574RB-C21).

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, I., Babitha Rani, A.M., Verma, A.K., Maqsood, M. (2017) Biofloc technology: an emerging avenue in aquatic animal healthcare and nutrition. *Aquaculture International*, 25(3), 1215-1226.
- Arencibia, D., Rosario, L., Gámez, R. (2008) Métodos generales de conservación de microorganismos. *Centro de Productos Naturales (CON, CNIC), Centro de Química Farmacéutica (CQF)*.
- Arias-Moscoso, J.L., Cuevas-Acuña, D.A., Rivas-Vega, M.E., Martínez-Córdova, L.R., Osuna-Amarilas, P., Miranda-Baeza, A. (2016) Características físicas y químicas de Biofloc liofilizado producido en cultivos de camarón blanco con diferente inclusión de harina de pescado en la dieta. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(4), 760-768.
- Avnimelech, Y. (2015) Biofloc Technology, a Practical Guidebook (3.<sup>a</sup> ed.). *World Aquaculture Society*.
- Cardona, E., Gueguen, Y., Magré, K., Lorgeoux, B., Piquemal, D., Pierrat, F., Noguier, F., Saulnier, D. (2016) Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a 45Biofloc system. *BMC Microbiology*, 16(1), 1-9.
- Celdrán, D. (2018) ¿Cómo acaba el Biofloc con el amonio, los nitritos y los nitratos del agua? Obtenido de <https://www.bioaquafloc.com/biofloc/como-acaba-el-biofloc-con-el-amonio-los-nitritos-y-los-nitratos-del-agua/#:%7E:text=Las%20bacterias%20nitrificantes%20del%20Biofloc,carbono%20y%20con%20aireaci%C3%B3n%20continua>
- Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W. (2012) Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*, 356, 351-356.
- Daohe TIAN, Fukun GUI, Hua LI, Ziming ZHOU, Qingsong LIU, Hongbiao DONG, Yafei DUAN, Jiasong ZHANG. (2019) Domestication and cultivation of nitrifying bio-floc. *South China Fisheries Science*, 15(4), 39-45.
- Deng, M., Chen, J., Gou, J., Hou, J., Li, D., He, X. (2018) The effect of different carbon sources on water quality, microbial community and structure of 45 Biofloc systems. *Aquaculture*, 482, 103-110.

- Ebeling, J.M., Timmons, M.B., Bisogni, J.J. (2006) Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257, 346-358.
- Ekasari, J., Azhar, M.H., Surawidjaja, E.H., Nuryati, S., De Schryver, P., Bossier, P. (2014) Immune response and disease resistance of shrimp fed 46Biofloc grown on different carbon sources. *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2), 332-339.
- Emerenciano, M., Gaxiola, G., Cuzon, G. (2013) Biofloc technology (BFT): a review for aquaculture application and animal food industry. *Biomass Now: Cultivation and Utilization*, 301-328.
- Emerenciano, M., Martínez-Córdova, L.R., Martínez-Porchas, M., Miranda-Baeza, A. (2017) Biofloc technology (BFT): a tool for water quality management in aquaculture. *Water Quality*, 5, 92-109.
- Emerenciano, M., Miranda-Baeza, A., Martínez-Porchas, M., Poli, M.A., Vieira, F.D.N. (2021) Biofloc Technology (BFT) in Shrimp Farming: Past and Present Shaping the Future. *Frontiers in Marine Science*.
- Esparza-Leal, H.M., Ponce-Palafox, J.T., Alvarez-Ruiz, P., Lopez-Alvarez, E.S., Vazquez-Montoya, N., Lopez-Espinoza, M., Montoya, M., Gómez-Peraza, R.L., Nava-Pérez, E. (2020) Effect of stocking density and water exchange on performance and stress tolerance to low and high salinity by *Litopenaeus vannamei* postlarvae reared with 46Biofloc in intensive nursery phase. *Aquaculture International*, 1-11.
- FAO (2020) *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Obtenido de <https://www.fao.org/fishery/es/aquaculture>
- Flores-Valenzuela, E., Miranda-Baeza, A., Rivas-Vega, M.E., Miranda-Arizmendi, V., Beltrán-Ramírez, O., Emerenciano, M.G. (2021) Water quality and productive response of *Litopenaeus vannamei* reared in 46Biofloc with addition of commercial strains of nitrifying bacteria and *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture*, 542, 736869.
- Fuerst, J.A. (2017) Planctomycetes—new models for microbial cells and activities. *Microbial Resources*, 1, 1-27.
- García, M.D., Uruburu F. (2002) La conservación de cepas microbianas. *Actualidad Microbiología SEM*, 30, 6-12.
- Gimeno, A. (2002) *Principales factores condicionantes para el desarrollo de los hongos y la producción de micotoxinas (2–5)*. Obtenido de

<https://www.engormix.com/micotoxinas/articulos/principales-factores-condicionantes-desarrollo-t26065.htm>

Hargreaves, J.A. (2006) Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacultural Engineering*, 34(3), 344-363.

Hill L.R., Kirsop B.E. (2000) Bacteria (Living Resources for Biotechnology). *Cambridge University*, 186-190.

JACUMAR (2006). La situación actual de la acuicultura. *Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino*. Obtenido de:

[https://www.mapa.gob.es/app/JACUMAR/recursos\\_informacion/Documentos/Publicaciones/19\\_Acuicultura\\_Espa%C3%B1a%20v.3.pdf](https://www.mapa.gob.es/app/JACUMAR/recursos_informacion/Documentos/Publicaciones/19_Acuicultura_Espa%C3%B1a%20v.3.pdf)

Jayachandran, K.V. (2001). Palaemonid prawns: biodiversity, taxonomy, biology, and management. *Editions Science Publishers*.

Jiang, W., Ren, W., Li, L., Dong, S., Tian, X. (2020) Light and carbon sources addition alter microbial community in Biofloc-based *Litopenaeus vannamei* culture systems. *Aquaculture*, 515, 734572.

Juarros, E., Tortajada, C., García, M.D., Uruburu, F. (2000) Storage of stock cultures of filamentous fungi at -80°C: effects of different freezing-thawing methods. *Microbiología SEM*, 9, 28-33.

Kasan, N.A., Dagang, A.N., Abdullah, M.I. (2018) Application of technology (BFT) in shrimp aquaculture industry. *Earth and Environmental Science*, 196(1), 012043.

Khanjani, M.H., Sajjadi, M.M., Alizadeh, M., Sourinejad, I. (2017) Nursery performance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) cultivated in a 47Biofloc system: the effect of adding different carbon sources. *Aquaculture Research*, 48(4), 1491-1501.

King, S., Metzger, W.I. (1968) A new plating medium for the isolation of enteric pathogens: I. Hektoen enteric agar. *Applied Microbiology*, 16(4), 577-578.

Kloska, A., Cech, G.M., Sadowska, M., Krause, K., Szalewska-Pałasz, A., Olszewski, P. (2020) Adaptation of the marine bacterium *Shewanella baltica* to low temperature stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4338.

Lara, G., Krummenauer, D., Abreu, P.C., Poersch, L.H., Wasielesky, W. (2017) The use of different aerators on *Litopenaeus vannamei* B47Biofloc culture system: effects on water quality, shrimp growth and 47Biofloc composition. *Aquaculture International*, 25, 147-162.

Leyton, Y., Riquelme, C. (2008) Vibrios en los sistemas marinos costeros. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 43(3), 441-456.

- Liu, G., Zhu, S., Liu, D., Guo, X., Ye, Z. (2017) Effects of stocking density of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) on immunities, antioxidant status, and resistance against *Vibrio harveyi* in a 48Biofloc system. *Fish & Shellfish Immunology*, 67, 19-26.
- Maruyama, A., Honda, D., Yamamoto, H., Kitamura, K., Higashihara, T. (2000) Phylogenetic analysis of psychrophilic bacteria isolated from the Japan Trench, including a description of the deep-sea species *Psychrobacter pacificensis* sp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(2), 835-846.
- Medrano Meraz, M.D.J., Hernández, F.J., Corral Rivas, S., Nájera Luna, J.A. (2017) Diversidad arbórea a diferentes niveles de altitud en la región de El Salto, Durango. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 8(40), 57-68.
- Meenakshisundaram, M., Sugantham, F., Muthukumar, C., Chandrasekar, M.S. (2021) Metagenomic characterization of 48Biofloc in the grow-out culture of Genetically Improved Farmed Tilapia (GIFT). *Aquaculture Research*, 52(9), 4249-4262.
- Minaz, M., Kubilay, A. (2021) Operating parameters affecting 48Biofloc technology: carbon source, carbon/nitrogen ratio, feeding regime, stocking density, salinity, aeration, and microbial community manipulation. *Aquaculture International*, 29(3), 1121-1140.
- National Academy of Science. (2022) *National Academies Sciences Engineering Medicine*. Board on Agriculture and Natural Resources. Obtenido de: <https://www.nationalacademies.org/banr/board-on-agriculture-and-natural-resources>
- Panigrahi, A., Saranya, C., Sundaram, M., Kannan, S.V., Das, R.R., Kumar, R.S., Rajesh, P., Otta, S.K. (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.
- Phulia, V., Mandal, B., Bera, A., Singh, S.K., Das, R., Jamwal, A. (2012) Factors controlling Biofloc characteristics. *World Aquaculture*, 43(4).
- Pla, L. (2006). Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia*, 31(8), 583-590.
- Rajapaksha, P., Elbourne, A., Gangadoo, S., Brown, R., Cozzolino, D., Chapman, J. (2019) A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms *Analyst*, 144, 396–411.
- Rathore, M., Sinha, R.K., Venkatachalam, S., Krishnan, K.P. (2021) Microbial diversity and associated metabolic potential in the supraglacial habitat of a fast-retreating glacier: a case study of Patsio glacier, North-western Himalaya. *Environmental Microbiology Reports*.

- Ribeiro, F.D.A.S., Neto, J.D.R.S., Gonçalves, A.A., Emerenciano, M.G.C. (2015) Replacement of Fishmeal By Fish Silage in *Litopenaeus Vannamei* Diets in Biofloc System: Growth Performance and Shrimp Quality. *Avances en Nutrición Acuicola*.
- Robles-Porchas, G.R., Gollas-Galván, T., Martínez-Porchas, M., Martínez-Cordova, L.R., Miranda-Baeza, A., Vargas-Albores, F. (2020) The nitrification process for nitrogen removal in Biofloc system aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 12(4), 2228-2249.
- Ruiz, P., Vidal, J.M., Sepúlveda, D., Torres, C., Villouta, G., Carrasco, C., Aguilera, F., Ruiz-Tagle, N., Urrutia, H. (2020) Overview and future perspectives of nitrifying bacteria on biofilters for recirculating aquaculture systems. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1478-1494.
- Schryver, P.D., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, T., Verstraete, W. (2008) The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture*, 277(3-4), 0-137
- Tian, L., Tan, P., Yang, L., Zhu, W., Xu, D. (2020) Effects of salinity on the growth, plasma ion concentrations, osmoregulation, non-specific immunity, and intestinal microbiota of the yellow drum (*Nibea albiflora*). *Aquaculture*, 528, 735470.
- Trienekens, J., Zuurbier, P. (2008). Quality and safety standards in the food industry, developments and challenges. *International Journal of Production Economic.*, 113(1), 107-122.
- Washington, J.A. (1999) Principle of diagnosis. *Medical Microbiology*, 4, 134-143.
- Xu, W., Xu, Y., Su, H., Hu, X., Xu, Y., Li, Z., Wen, G., Cao, Y. (2021) Production performance, inorganic nitrogen control and bacterial community characteristics in a controlled Biofloc-based system for indoor and outdoor super-intensive culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 531, 735749.
- Xu, W., Xu, Y., Su, H., Hu, X., Yang, K., Wen, G., Cao, Y. (2020) Characteristics of ammonia removal and nitrifying microbial communities in a hybrid Biofloc-ras for intensive *Litopenaeus vannamei* culture: A pilot-scale study. *Water*, 12(11), 3000.
- Yuvarajan, P. (2021). Study on floc characteristics and bacterial count from Biofloc-based genetically improved farmed tilapia culture system. *Aquaculture Research*, 52(4), 1743-1756.
- Zhao, P., Huang, J., Wang, X.H., Song, X.L., Yang, C.H., Zhang, X.G., Wang, G.C. (2012) The application of Bioflocs technology in high-intensive, zero exchange farming systems of *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture*, 354, 97-106.

Zhou, Z., Tran, P.Q., Kieft, K., Anantharaman, K. (2020) Genome diversification in globally distributed novel marine *Proteobacteria* is linked to environmental adaptation. *The ISME Journal*, 14(8), 2060-2077.