



CARACTERIZACIÓN DE BIOFLOCS EN SISTEMAS DE ACUICULTURA, BAJO DIFERENTES PARÁMETROS NUTRICIONALES, PARA LA PRODUCCIÓN SOSTENIBLE DE LANGOSTINOS



Autora: Celia López Ortega

Tutor: Juan Antonio López González

Co-Tutora: Macarena del Mar Jurado Rodríguez

Máster en Bioeconomía Circular y Sostenibilidad

Área de Microbiología

ÍNDICE

Agradecimientos.....	3
Resumen	5
Abstract.....	6
I. Introducción	7
<i>I.1. Sistemas de acuicultura actual.....</i>	7
A. Acuicultura del langostino.....	12
<i>I.2. Bioflocs.....</i>	13
A. Sistemas de acuicultura de langostino en Bioflocs	16
II. Objetivos	19
III. Materiales y Metodología.....	19
<i>III.1. Diseño experimental.....</i>	19
<i>III.2. Medios de cultivo.....</i>	20
A. Microbiota heterótrofa marina	21
B. Nitrificantes.....	21
<i>III.3. Evaluación de los diferentes parámetros nutricionales.....</i>	22
A. Recuentos microbianos en placa	24
B. Citometría de flujo	27
C. Análisis estadístico	28
<i>III.4. Caracterización metabólica de las muestras a los 45 días del inicio del proceso</i>	28
IV. Resultados y Discusión.....	29
<i>IV.1. Estudio de la composición microbiana en función de los parámetros nutricionales aportados al sistema.....</i>	30
<i>IV.2. Estudio del crecimiento microbiano, mediante citometría de flujo, en función de los parámetros nutricionales aportados al sistema acuícola.....</i>	37
<i>IV.3. Análisis metabólico de las muestras seleccionadas en función de los parámetros nutricionales aportados</i>	40
V. Conclusiones	43
VI. Financiación	44
VII. Bibliografía.....	44

Agradecimientos

No podría empezar unos agradecimientos sin acordarme de la persona que incentivó en mí la curiosidad por la microbiología. A Joaquín Moreno Casco nadie le olvida y el éxito del Área de Microbiología es gracias a él y a la curiosidad que sembró en todos nosotros. Su legado permanece y permanecerá en cada cosa que haga relacionada, o no, con este mundo inmenso de seres diminutos que es la microbiología, pero sobre todo en mi forma de ver la ciencia. Su testigo lo recogió, exitosamente, María José López a quien quiero agradecer la posibilidad de volver a desarrollar un Trabajo Final de Estudios en un Área que siempre te acoge con los brazos abiertos y te deja aprender.

Una pieza fundamental para mí durante el tiempo que ha durado la realización de este trabajo ha sido mi tutor, Juan Antonio López González. Todo lo que pienso sobre él es lo mismo que ya pensaba hace dos años cuando tutorizó mi TFG. Su alegría y su optimismo se contagia hasta a las personas menos optimistas como yo. La confianza que siempre ha depositado sobre mí también es de agradecer, puesto que me hace crecer como persona y como científica, ya que la autoconfianza crece cuando la persona que te supervisa también confía en ti. Macarena, mi co-tutora, es un ejemplo a seguir, por su dedicación y por su forma de amar la microbiología y todo lo que ello conlleva. Nunca olvidaré que un desecho en realidad es un subproducto y todo gracias, casi al 100%, a los microorganismos.

Otra pieza fundamental en el desarrollo de este trabajo ha sido Fran Moyano. Gracias a él hemos podido embarcarnos en el mundo de los Bioflocs uniendo la acuicultura con la microbiología. Gracias por su predisposición por ayudarnos en todo momento.

No podía olvidarme tampoco del enorme grupo de mujeres microbiólogas que forman parte de este maravilloso grupo de investigación: gracias a Paqui, M^a José Estrella, Ana Toribio y, en especial, a M^a Rosa por adentrarme en el mundo de las BiologEcoPlates, una parte muy bonita de este trabajo no hubiera sido posible sin ella.

Quiero darle las gracias también a mi inseparable compañera de laboratorio María Maqueda. No hemos podido trabajar juntas, pero encontrar hueco para tener una conversación los días en los que más trabajo (y menos) teníamos es una vía de escape necesaria, al igual que la cerveza fresquita del último día de trabajo en el laboratorio.

Con quien sí he tenido la suerte de trabajar es con María Barbero. Ambas nos hemos adentrado en el desconocido mundo de los Bioflocs y nos hemos retroalimentado la una con la otra. Hacer un trabajo tan bonito en tan pocos meses no hubiera sido posible sin que ella me pusiera al día.

Gracias también a toda la gente ajena a la ciencia que me hizo despejar la mente en mis ratos libres. Es tan importante las horas de trabajo como las horas de descanso.

Finalmente, me gustaría acabar con la frase con la que Joaquín despertó mi amor por la microbiología.

Sed curiosos.

Resumen

Durante las últimas décadas, debido a la necesidad de alimentar a la población mundial, la acuicultura intensiva ha incrementado su actividad hasta unos niveles en los que se puede ver comprometida la sostenibilidad ambiental. En este sentido, los Bioflocs han surgido como una tecnología de producción de langostinos que impide el desaprovechamiento del agua empleada en los sistemas acuícolas, ya que es una tecnología capaz de reutilizarla eliminando las formas tóxicas del nitrógeno a la vez que actúa como probiótico para el animal cultivado, así mismo, evitando el uso excesivo de antibióticos.

Este trabajo se enfocó en el estudio de la microbiota que compone los Bioflocs para identificar como afectan los parámetros nutricionales empleados para la maduración de éstos en los tanques de producción. Para ello, dichos tanques fueron alimentados con tres fuentes de carbono diferentes (melaza, levadura y biopolímeros) y bajo diferentes relaciones C/N (10:1, 14:1, 18:1, 22:1 y 26:1), durante 45 días. Al comienzo del ensayo se constituyeron 60 tanques a partir de muestras diferentes que fueron analizadas bajo técnicas microbiológicas cultivares para el recuento de microorganismos nitrificantes y heterótrofos marinos y mediante citometría de flujo para realizar recuentos de microbiota total. Una vez transcurridos 45 días del inicio del ensayo, se volvieron a analizar las muestras de Bioflocs, al igual que en el primer muestreo. Además, estas muestras fueron analizadas mediante la técnica BiologEcoPlates con la finalidad de realizar una caracterización metabólica más exhaustiva.

Finalmente, los resultados obtenidos mostraron que la microbiota heterótrofa marina es predominante al inicio del proceso, independientemente de la fuente de carbono utilizada y de la relación C/N aportada a los sistemas acuícolas. Con el transcurso del proceso, la microbiota nitrificante aumentó, hecho de gran interés debido a su capacidad para eliminar las formas tóxicas del nitrógeno. Las muestras, además, mostraron una elevada biodiversidad metabólica, degradando un gran número de sustratos carbonados diversos, poniendo de manifiesto la complejidad del microbioma presente en las muestras de Bioflocs. Entre las tres fuentes de carbono aportadas a los sistemas, la diferencia no fue muy elevada, si bien el recuento de heterótrofos marinos se vio incrementado en los casos en los que se utilizó la melaza. Por lo tanto, y en vistas de que es el sustrato más económico de los tres empleados en el estudio, se propone como el más adecuado para el desarrollo de Bioflocs estables y maduros. En la misma dirección, de acuerdo con los resultados obtenidos resulta más interesante trabajar con relaciones C/N cercanas a 10, ya que un incremento en esta ratio no genera diferencias sustanciales en los recuentos microbianos del Biofloc a largo plazo.

Abstract

During last decades, due to the necessity of giving food to the entire population, intensive aquaculture has intensified its activity to a level at which environmental sustainability may be in danger. On this point, Biofloc technology has emerged as a shrimp production technology that avoids water waste in aquaculture systems because it is a technology that can reuse it by removing toxic forms of nitrogen while acting as a probiotic for the animal avoiding the huge quantity of antibiotics administered.

This work focused on the study of biofloc' microorganisms to identify how nutritional parameters affect Biofloc maturity. The production tanks were fed with three different carbon sources (molasses, yeast and biopolymer) and different C/N ratios (10:1, 14:1, 18:1, 22:1 and 26:1), for 45 days. At the beginning of the assay, 60 tanks were set up with different samples, which were analyzed with cultivated microbiological techniques to count marine heterotrophic and nitrifying microbes, and the total microbiota was also counted by flow cytometry. After 45 days, new samples were analyzed in the same way as in the first sampling, but at this time the samples were also analyzed with BiologEcoPlates in order to know the metabolic versatility of the samples.

At the end, the results showed that levels of heterotrophic marine microbes were higher than the nitrifying microbes, regardless of carbon sources and C/N ratios. As the trial progressed, the levels of nitrifying microbes increased. This fact is so interesting because these types of microbes can remove toxic forms of nitrogen. The samples also showed high metabolic biodiversity, with a complex microbiota capable of breaking down many carbon sources. The differences between the three carbon sources added to the system were minimal, but the amount of heterotrophic marine microorganisms was higher when molasses was added, and this carbon source helped to mature the Biofloc samples. Therefore, the use of molasses is proposed as it is also the most economic carbon source. For the same purpose, working with C/N ratios close to 10 is more interesting because, in the long run, an increase in the C/N ratio does not generate differences in microbial growth.

I. Introducción

I.1. Sistemas de acuicultura actual

Durante los últimos 20 años, la acuicultura global ha incrementado su actividad al mismo tiempo que logra las metas críticas de sostenibilidad ambiental, bioeconomía y sociedad. La acuicultura es la tecnología de producción de alimentos de mayor crecimiento en la actualidad y aporta, a nivel mundial, más biomasa de peces que la pesca de captura si se incluyen cantidades no comestibles (Edwards *et al.*, 2019), así como más biomasa total que la carne de ternera (Boyd *et al.*, 2020).

Los acuicultores aprendieron hace varios siglos que el estiércol del ganado y otros tipos de residuos agrícolas podían usarse con éxito para fertilizar las piscinas y aumentar la producción de peces. Además, los subproductos del procesamiento de la carne fueron comúnmente utilizados como alimento para peces. Estos primeros acuicultores, en algunas ocasiones, agregaban más materia orgánica de la que ciertos estanques podían asimilar debido a la falta de tecnología, lo que resultaba en una baja concentración de oxígeno disuelto u otros parámetros que afectan a la calidad del agua (Boyd, 2018).

Dos acuicultores de Alabama (EE. UU.) (Perez, 2006) inventaron, en la década de 1970, el aireador de rueda de paletas accionado por tractor que consistía en un remolque sobre el que iba montado el diferencial y los ejes de un camión. Se colocó una rueda de paletas en los extremos de los ejes y un eje se extendió a la toma de fuerza del tractor. El tráiler se colocaba cerca del agua introduciendo las paletas en el interior. Cuando se activaba el mecanismo se producía un intercambio de oxígeno del aire con el agua y las fuertes corrientes inducidas por las ruedas de paletas impulsaban el agua a través de la piscina por lo que este dispositivo resultó ser muy eficaz para prevenir la mortalidad de los peces por falta de oxígeno. La desventaja del uso de tal dispositivo era que cada uno requería de un motor de gran potencia por lo que solo era adecuado para usos de emergencia. Sin embargo, el desarrollo de piensos más adecuados desde el punto de vista nutricional y del aireador de paletas eléctrico flotante resultó en una notable intensificación de la producción acuícola con rendimientos anuales de alrededor de 1.500 kg/ha en 1960.

La mejora en la eficiencia de operación del aireador puede reducir significativamente el consumo de la aireación mecánica y contribuir a la sostenibilidad económica y ambiental. Las concentraciones de oxígeno disuelto en estanques van oscilando durante las 24 horas del día, ya que las concentraciones más altas suelen ser durante el día y las concentraciones más bajas durante la noche. El control automático del aireador se ha desarrollado mediante sistemas con los que los aireadores se activan y se desactivan en respuesta a la cantidad de oxígeno disuelto medido por una sonda de monitoreo de oxígeno colocada en un lugar seleccionado en el estanque. Los dispositivos de control de los aireadores automáticos son cada vez más fiables y el coste de estos está disminuyendo a medida que la tecnología sigue mejorando. Los peces que sufren de

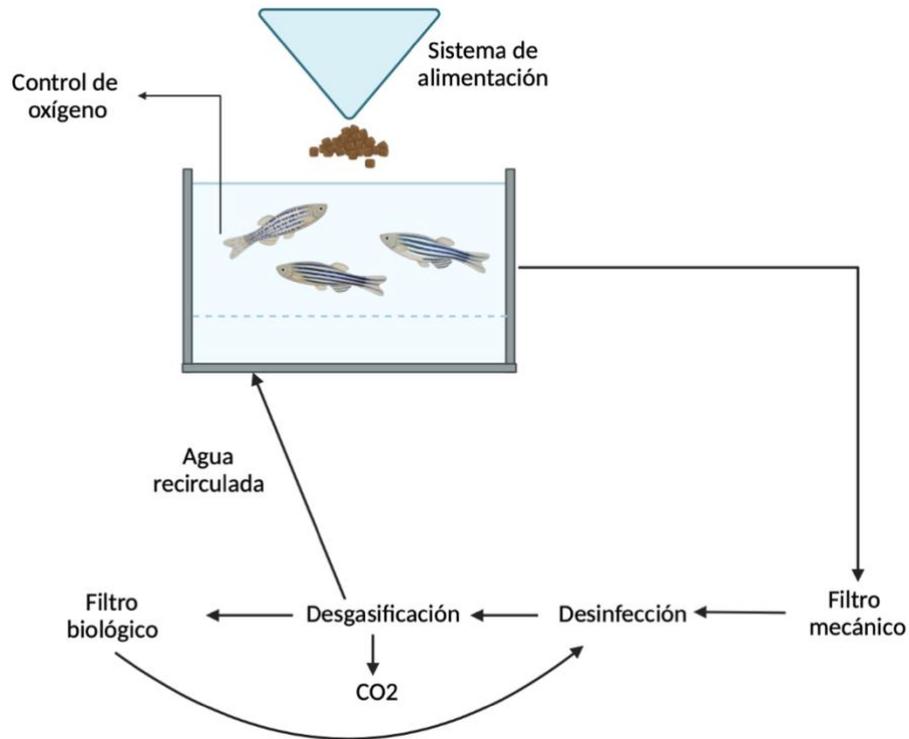
deficiencia nutricional y/o estrés crónico por baja concentración de oxígeno disuelto son más susceptibles a enfermedades. Por lo tanto, mejores aportes de alimentos y una mayor aireación han mejorado la salud de los peces, lo cual es un componente fundamental para seguir asegurando la sostenibilidad económica de los sistemas. La alimentación, la aireación y la salud de los peces están íntimamente relacionadas en la acuicultura y no deben ser considerados como factores independientes (Boyd *et al.*, 2020).

Además de la aireación, la eliminación de moléculas tóxicas relacionadas con el nitrógeno es uno de los procesos críticos en la acuicultura debido a la contaminación de los ecosistemas marinos a causa de los efluentes acuáticos contaminantes como consecuencia de la actividad acuícola intensiva. Para ello, existen diversas técnicas empleadas por los acuicultores para solventar este problema. En la década de 1990 se desarrollaron los estanques divididos para integrar la acuicultura con el tratamiento de aguas residuales sin descarga (Tucker *et al.*, 2014). El sistema de acuicultura dividido (Partitioned Aquaculture System o PAS) reúne altas densidades de peces en canales concretos que comprenden alrededor del 5% del total de la zona del estanque. Los residuos producidos durante la piscicultura circulan a través de un estanque grande y bien mezclado que contiene grandes cantidades de algas y que están originalmente diseñados para el tratamiento de aguas residuales domésticas. En este caso, la producción potencial de pescado aumenta como resultado de la mejora de la capacidad de tratamiento de residuos del sistema. En teoría, si se duplica la tasa neta de fotosíntesis algal, puede duplicarse también la tasa de eliminación de amoníaco y otros productos de desecho, duplicando además la producción de peces. El PAS representa el grado máximo de intensificación para piscinas donde el metabolismo del fitoplancton es el proceso dominante. Sin embargo, no ha sido ampliamente adoptado por los acuicultores porque el sistema es operacionalmente complejo y costoso de construir. Por su parte, se han desarrollado variaciones del PAS para hacer el concepto de estanque dividido más atractivo comercialmente (Tucker y Hargreaves, 2012).

Los sistemas de recirculación de agua en acuicultura (Recirculating Aquaculture System o RAS) existen desde hace 65 años. Sin embargo, en los últimos 20 años han experimentado un crecimiento exponencial en cuanto a su diseño, construcción y operación. Este sistema ha sido desarrollado para criar peces en lugares donde las condiciones biofísicas son inadecuadas y existe escasez de agua, mala calidad del agua y un ambiente desfavorable (Murray *et al.*, 2014). Según Malone (2013), los RAS proporcionan un método de producción alternativo cuando las regulaciones ambientales, las enfermedades, la disponibilidad de suelo, la salinidad, la temperatura y el suministro de agua impiden alternativas más rentables. Sin embargo, existen otros factores que estimularon el desarrollo y la implementación de RAS. Por ejemplo, los RAS se utilizan cada vez más en el Mediterráneo para los ciclos de producción de peces marinos y salmónidos, en particular en juveniles, antes de ser transferidos a sistemas de cría al aire libre, como jaulas o raceways de flujo continuo (Bostock *et al.*, 2016; Clarke y Bostock, 2017). Los RAS son instalaciones de cría de peces bajo techo y en tierra, donde los peces son almacenados en tanques dentro de un ambiente controlado y donde la filtración se aplica para purificar el agua a

través de la eliminación de residuos antes de ser recirculados al propio sistema (Fig. I.1). La purificación del agua se logra mediante métodos de filtración mecánica y/o biológica, esterilización y oxigenación.

Figura I.1. Esquema simplificado de los sistemas de recirculación de agua en acuicultura (RAS). Fuente: elaboración propia.



En los alimentos acuícolas modernos, se utilizan con frecuencia una gran variedad de aditivos para complementar los nutrientes primarios en los que se basan los piensos. Además de los nutrientes esenciales y la energía que aportan los piensos, se han desarrollado una serie de aditivos que se han convertido en habituales. Estos aditivos, que mitigan la variabilidad en la calidad de los ingredientes, reducen el impacto de los factores antinutritivos y también fortalecen el sistema inmunológico (Ringo *et al.*, 2012). El uso de aditivos en alimentos en acuicultura es una práctica habitual en esta industria desde hace décadas. No obstante, en la actualidad se ha incrementado el uso de ingredientes funcionales que afectan el metabolismo y la fisiología de los animales producidos, ya sea directa o indirectamente. La intensificación de la acuicultura ha desafiado notablemente la salud y los sistemas inmunológicos de muchas especies cultivadas mientras que los productores buscan mejorar la inmunocompetencia de sus peces. Algunos aditivos tienen un papel más beneficioso que otros y su aplicabilidad y eficacia pueden ser específicas de la especie o estar sujeta a las condiciones de cultivo (Boyd *et al.*, 2020).

Los prebióticos son ingredientes alimentarios que afectan beneficiosamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de un número limitado de bacterias constitutivas de la microbiota intestinal. Los prebióticos son fibras dietéticas compuestas de

carbohidratos complejos que eluden los ácidos de la digestión para actuar como sustrato para la fermentación y proliferación de bacterias probióticas. Se trata típicamente de oligosacáridos constituidos por una pequeña cantidad de monosacáridos. Dos de los prebióticos más utilizados en acuicultura son los manano-oligosacáridos (MOS) y fructo-oligosacáridos (FOS), mientras que los prebióticos menos comunes en estos sistemas son los xilo-oligosacáridos y galacto-oligosacáridos. Además de los oligosacáridos no digeribles, los polisacáridos sin almidón (NSP) pueden actuar como prebióticos (inulina y glucanos). La mayoría de los prebióticos son β -glucanos, compuestos de polisacáridos de β -D-glucosa, que se encuentran naturalmente en altas proporciones dentro de las paredes celulares de levaduras (Dimitroglou *et al.*, 2011).

En algunas ocasiones, los agentes antimicrobianos se han utilizado en cantidades abusivas para reducir la introducción de microorganismos patógenos a través de la piel, las branquias o el intestino de los animales acuáticos (Ringo *et al.*, 2007). La suplementación de prebióticos en los alimentos acuícolas ha sido reconocida como la alternativa sostenible para lograr un aumento de la resistencia a las enfermedades mediante la estimulación del sistema inmunitario o la proliferación de bacterias beneficiosas en el intestino que, directa o indirectamente, antagonizan a los patógenos (Torrecillas *et al.*, 2014). Prebióticos a base de β -glucanos y MOS han sido los más citados por aumentar la respuesta inmune en base a una actividad elevada de lisozima sérica, óxido nítrico, actividad bactericida y actividad fagocítica en varias especies de acuicultura, especialmente la lubina y la trucha arcoíris (Ortiz *et al.*, 2013; Betiku *et al.*, 2017). Los prebióticos pueden estimular el tejido linfoide asociado al intestino (GALT) y reducir la translocación de bacterias en el tracto intestinal, lo que resulta en un aumento a la resistencia a enfermedades por parte de los peces (Torrecillas *et al.*, 2011).

Los probióticos consisten en bacterias vivas o levaduras que son consumidas por vía oral por el animal, y que colonizan el intestino y benefician el organismo del huésped. Los probióticos más comunes en la acuicultura incluyen especies de los géneros *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Pediococcus*, así como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La mayoría de los probióticos son grampositivos pertenecientes al grupo de las bacterias del ácido láctico y generalmente se consideran microorganismos favorables debido a su capacidad para estimular la mucosa intestinal del huésped, su función digestiva, la tolerancia, la respuesta inmune y la resistencia a enfermedades (Ringo *et al.*, 2018). Además, la levadura antes mencionada es parte de la microbiota intestinal normal y se tiene constancia de que produce enzimas como la fitasa, que beneficia al huésped y produce péptidos antimicrobianos que reducen la incidencia y proliferación de patógenos (Navarrete *et al.*, 2014). En estudios previos se ha visto que la alimentación con probióticos vivos en lugar de inactivados, como la levadura y *Lactobacillus rhamnosus*, ha alcanzado mayores efectos sobre el sistema inmunitario y la microbiota intestinal de la tilapia del Nilo (Ran *et al.*, 2015). En la práctica, la alimentación con probióticos vivos se logra mediante el uso de alimentos prensados en frío o la adición de probióticos después de la extrusión del pienso (por ejemplo, durante el recubrimiento de lípidos) con el fin de evitar la inactivación de los probióticos por las altas temperaturas y la elevada presión.

La mayor parte del desarrollo de las técnicas acuícolas se ha producido durante los últimos 50 años y, por lo tanto, la sostenibilidad, en particular la ambiental, se ha convertido en una preocupación creciente. Cada vez se presta más atención a la mejora en la concienciación en temas ambientales y la correspondiente implementación de prácticas encaminadas a reducir la huella ambiental de la acuicultura.

A pesar de todo su reconocimiento y relevancia actuales, el concepto de sostenibilidad aplicado a la acuicultura no es un término claramente definido y su uso es, a menudo, confuso. Mientras que la opinión pública entiende la sostenibilidad como la capacidad de las actividades humanas de persistir en el tiempo manteniendo un ambiente sano, la definición técnica más citada es la de la Comisión Mundial de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo. Esta Comisión definió el desarrollo sostenible como el uso del medio ambiente y sus recursos para satisfacer las necesidades del presente sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras para satisfacer sus propias necesidades (World Commission on Environment and Development, 1987). La teoría económica proporciona una definición más útil del desarrollo sostenible, expresado como sistemas económicos donde la base productiva, o capital total, se mantiene constante en el tiempo (Chapin *et al.*, 2009). En esta definición, el capital se refiere a la riqueza integral del sistema, incluidos los recursos humanos, ambientales y económicos. Esta definición económica implica la imposibilidad de un crecimiento ilimitado debido a las propias limitaciones del planeta y presenta el problema práctico de asignar límites al sistema y de cuantificar las consecuencias experimentadas por terceros.

En la práctica, la sostenibilidad ambiental se convierte en una cuestión mediante la que poder seleccionar las mejores alternativas entre los diferentes procedimientos disponibles. Por lo general, cuando nos enfrentamos a una decisión operativa o de inversión, una empresa de acuicultura puede elegir entre soluciones con diferentes consecuencias ambientales. Idealmente, la mejora de las tecnologías permite aumentar la productividad mientras se reduce la huella ambiental. La sostenibilidad en la producción de alimentos es un término subjetivo que se utiliza para describir como el planeta permite bienes y servicios para ser utilizados por los seres humanos de una manera que no perjudique la provisión continua de estos servicios. El objetivo de la acuicultura sostenible es proporcionar un suministro continuo de nutrientes de origen acuático cultivados, beneficiosos para la nutrición humana, sin dañar los ecosistemas existentes o exceder la capacidad del planeta para renovar los recursos necesarios para su producción (Boyd *et al.*, 2020).

La acuicultura se basa en la utilización de múltiples recursos naturales para producir animales acuáticos. La extendida definición de la acuicultura como la captura de peces silvestres como fuente de alimentación humana ha desencadenado un rechazo por parte de la población general que no es comparable a ningún otro sector de producción de proteína animal. Esto ha sesgado fundamentalmente la percepción pública de la acuicultura como una industria que afecta al medio ambiente marino y de agua dulce. Muchos críticos de la acuicultura buscan idealmente

un entorno de cultivo que sea más "natural", es decir, que imite las condiciones que hay en la naturaleza y, de hecho, desconocen que, precisamente, la acuicultura se basa en la utilización colectiva de muchos recursos naturales para aumentar la eficiencia de la producción de proteínas de origen animal.

A. Acuicultura del langostino

El cultivo de langostinos es una de las actividades económicas de más valor en el ámbito de la producción acuícola, ya que la demanda mundial de estos se incrementa en un 10% anualmente (FAO, 2018). Sin embargo, la mayoría de los acuicultores de langostinos siguen utilizando sistemas abiertos convencionales para la producción de estos, lo que puede conllevar a unas condiciones de cultivo impredecibles y a una falta de sostenibilidad ambiental, debido al mal manejo del agua y a una carencia de calidad y limpieza de esta, de la bioseguridad y del manejo de enfermedades infecciosas en los cultivos (Suantika *et al.*, 2017; Situmorang *et al.*, 2020). Una alternativa eficiente en la producción de langostinos es el uso de sistemas de acuicultura cerrados, que han sido desarrollados para conseguir una elevada productividad, una mayor eficiencia en el uso del agua y del espacio, una mayor fiabilidad en cuanto a las condiciones de cultivo y un menor desperdicio de agua elevando la sostenibilidad ambiental. Muhammand *et al.* (2016) demostraron que los sistemas cerrados sin pérdida de agua (zero water discharge o ZWD) son capaces de incrementar la producción de langostinos hasta conseguir 1 kg/m³ de productividad. Otro estudio llevado a cabo por Suantika *et al.* (2018) muestra que los sistemas de recirculación de agua en acuicultura (RAS) son capaces de conseguir una productividad de 5 kg/m³. Una combinación de ambos sistemas, denominado híbrido RAS-ZWD es, además, capaz de reducir el coste operacional derivado de la optimización en el uso de la electricidad y generar una productividad de 4,8 kg/m³.

Los RAS proveen una circulación de agua entre los tanques de langostinos y los diferentes filtros de manera que el agua puede ser reutilizada disminuyendo el vertido de subproductos tóxicos para reducir la cantidad de agua requerida y para mantener estable la calidad del agua durante un mayor tiempo a la vez que se mantiene la producción intensiva o semi-intensiva de langostinos (Suantika *et al.*, 2018). Estos sistemas consisten en cuatro compartimentos (Fig. I.1): un tanque aireado en el que se encuentran los langostinos, un filtro mecánico de grandes dimensiones, un filtro mecánico para partículas más pequeñas y un biofiltro que contiene unas bolas de plástico de dimensiones pequeñas que actúan como sustrato para las bacterias nitrificantes que convierten las moléculas tóxicas de amonio (NH₄⁺) y nitrito (NO₂⁻) en moléculas de nitrato (NO₃⁻). Sin embargo, la aplicación de este sistema no es el preferente en las costas de Indonesia, uno de los mayores productores de langostino a nivel mundial, debido al coste operacional al que está sometido este sistema. Por ello, se ha estudiado el híbrido RAS-ZWD que consta de cinco compartimentos diferentes: un tanque con langostinos aireado, una filtración física, un filtro proteico para eliminar partículas orgánicas, un tanque de carbono activado para eliminar contaminantes e impurezas y un biofiltro localizado en un tanque aireado que es inoculado con un consorcio de bacterias nitrificantes para eliminar el amonio y el nitrito. En el

estudio realizado por Suantika *et al.* (2020) se concluyó que el sistema híbrido aporta una mayor productividad junto con una mayor eficiencia operacional.

A diferencia de los animales terrestres, las especies acuáticas están en contacto continuo y directo con el medio acuático que les rodea y las condiciones de cultivo afectan a la salud y a la productividad de los cultivos (Ma *et al.*, 2013). Como componente indispensable del agua marina, el bacterioplancton juega un papel fundamental en los sistemas de producción de langostinos. Por un lado, contribuye a la descomposición de la materia orgánica promoviendo los ciclos biogeoquímicos como el del carbono, el nitrógeno, el fósforo y el azufre afectando a otros procesos ecológicos (Wei *et al.*, 2009). Por otra parte, también se ha visto que estos microorganismos se transfieren mediante la dieta a la microbiota intestinal de los langostinos (Xiong *et al.*, 2017). Además, la comunidad microbiana que forma parte del plancton varía en función de las condiciones físicas, químicas y biológicas que haya en el agua. Dichas condiciones se utilizan también como indicadores de la calidad medioambiental de ese ambiente (Dai *et al.*, 2017), ya que durante el ciclo productivo la calidad del agua es variable. Por otro lado, en ciertos estudios se han analizado las comunidades microbianas para deducir las potenciales interacciones que existen entre las diversas especies para observar los diferentes fenómenos de cooperación o antagonismo (Faust *et al.*, 2015). El sistema de cultivo de langostinos es un ecosistema complejo en el que varias especies del bacterioplancton interactúan entre sí. A través de tales interacciones, la comunidad del bacterioplancton es capaz de lograr funciones ecológicas que no podrían ser realizadas de forma individual (Wang *et al.*, 2017).

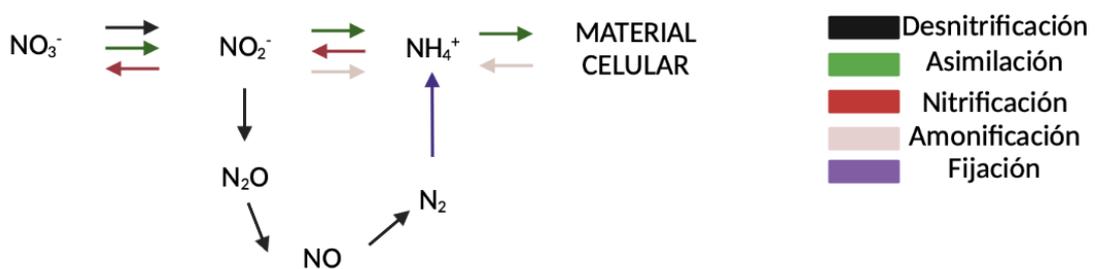
1.2. Bioflocs

La necesidad de reducir el coste de producción y de conseguir reducir el impacto ambiental de la industria acuícola ha llevado al desarrollo de la tecnología Biofloc (Biofloc Technology o BFT). Esta tecnología consiste en un cultivo basado en microorganismos cuya relación C/N óptima se localiza entre 15 y 20. Estos valores favorecen la formación de los flóculos microbianos a la vez que se asimilan las formas tóxicas de nitrógeno bajo condiciones de cultivo intensivas (Ahmad *et al.*, 2017). Esto se logra agregando una fuente de carbono orgánico al agua o, de forma menos común, elevando el nivel de carbono en el alimento para peces (De Schryver *et al.*, 2008). El sistema conlleva el reciclaje de nutrientes y, por lo tanto, es más respetuoso con el medio ambiente (Emerenciano *et al.*, 2013; Bossier y Ekasari, 2017). Hargreaves (2006) definió los Bioflocs como un sistema de crecimiento dependiente de la biomasa activa de plancton, destacando el papel de las bacterias formadoras de flóculos para el mantenimiento de la calidad del agua. Por lo tanto, BFT es esencialmente una técnica de gestión de la calidad del agua para minimizar los intercambios de agua a través de la degradación microbiana de residuos tóxicos nitrogenados (amonio y nitrito) ya sea por conversión a nitrato o por conversión a biomasa microbiana. Esto reduce la necesidad de instalaciones de equipos de alto coste y, por lo tanto, es atractivo para acuicultores tanto de altos como de bajos ingresos (Avnimelech, 2012; Crab *et al.*, 2012; Emerenciano *et al.*, 2013).

En la industria acuícola, se apuesta por la prevención de enfermedades infecciosas frente al tratamiento de estas, tanto debido al coste económico que supone el empleo de productos farmacológico como a la existencia de una regulación más estricta respecto al uso de productos químicos (Ajadi *et al.*, 2016). Por ejemplo, el uso de antibióticos resulta cada vez más problemático debido a la disminución de la efectividad de éstos, ya que muchos microorganismos patógenos se están volviendo resistentes (Ventola, 2015). La necesidad de buscar alternativas a los antibióticos ha llevado al uso de probióticos, prebióticos y otros medios de biocontrol basados en microorganismos. Los Bioflocs son un sistema basado en microorganismos con interacciones complejas que podrían mejorar la respuesta inmune de los organismos acuáticos y actuar de forma similar a los probióticos (Kim *et al.*, 2014). Emerenciano *et al.* (2013) sugirieron que los Bioflocs podrían tener un efecto probiótico natural, que podría ser responsable de inhibir la infección por patógenos. Por ejemplo, se tiene constancia de que los bioflocs contienen polihidroxitirato (PHB) que es un polímero producido por varios microorganismos en respuesta al estrés fisiológico y que actúa como almacenamiento de energía (Sinha *et al.*, 2008). Dependiendo de la fuente de carbono utilizada, puede representar hasta el 18% del peso seco de los Bioflocs (Emerenciano *et al.*, 2013). El PHB también puede actuar como un prebiótico en BFT y afecta selectiva y beneficiosamente al huésped al estimular el crecimiento de células microbianas beneficiosas en el colon y modificar la composición de la microbiota intestinal (Ahmad *et al.*, 2017).

Entre los microorganismos que forman parte de los Bioflocs, cabe destacar la importancia de los que intervienen de forma activa en el ciclo del nitrógeno. Solo algunas bacterias son capaces de utilizar el nitrógeno gaseoso como fuente de nitrógeno para su crecimiento mediante la fijación biológica de este. Sin embargo, en el caso concreto de la tecnología Bioflocs no es este proceso el que genera mayor interés. En este sentido, cabe destacar la presencia en el ciclo del nitrógeno de los microorganismos nitrificantes que son capaces de eliminar las formas tóxicas amoniacaes para generar NO_2^- mediante la oxidación del amoniaco, finalmente el NO_2^- vuelve a ser oxidado para generar NO_3^- (Fig. 1.2). Hay diversos grupos microbianos implicados en la oxidación del amonio hasta nitrato. Los géneros *Nitrosococcus*, *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio* y *Nitrosolobus* oxidan el amonio para generar nitrito y, finalmente, los géneros *Nitrospina*, *Nitrococcus*, *Nitrobacter* y *Nitrospira* oxidan el nitrito para conseguir el nitrato final (Dauda, 2020). Además, uno de los factores que más afecta a la nitrificación en los Bioflocs es la concentración de amonio y nitrito, así como como la relación C/N, el pH, la temperatura y el oxígeno disuelto, entre otros.

Figura 1.2. Ciclo biogeoquímico del nitrógeno. Fuente: elaboración propia.



La influencia de la temperatura radica en que afecta a la actividad metabólica de los peces y de la microbiota presente en el ambiente acuático. El control de la temperatura es particularmente sencillo en sistemas de cría cerrados, como los tanques. Crab *et al.* (2009) investigaron la influencia de la temperatura en la cría de la Tilapia del Nilo. En este estudio se comprobó que mediante el uso de Bioflocs en tanques cerrados se consigue mantener la temperatura del agua en el interior de los tanques hasta 5 °C por encima de la temperatura del agua en el exterior del tanque. Este efecto es debido, entre otros factores, a que la incorporación de agua exógena al tanque es mínima, ya que con esta tecnología se puede limpiar el agua para volver a utilizarla. Este hecho hace que se mejore la supervivencia de los peces durante el periodo invernal. En un estudio más reciente (Hostins *et al.*, 2015), *Farfantepenaeus brasiliensis* se crió en sistemas de Bioflocs con cinco temperaturas diferentes: 21 °C, 24 °C, 27 °C, 30 °C y 33 °C. La agregación de partículas y la formación de Bioflocs aumentó conforme lo hacía la temperatura, y fue significativamente mayor a 30 °C y 33 °C. La tasa de crecimiento semanal también aumentó con el incremento de la temperatura, pero la supervivencia se redujo. Por lo tanto, el equilibrio en cuanto a la de tasa de crecimiento, la supervivencia y la producción de Bioflocs en la cría de *F. brasiliensis* investigada por Hostins *et al.* (2015) fue de 27 °C. En otro estudio desarrollado por Ponce-Palafox *et al.* (2019) se estudió también los valores de temperatura y salinidad óptimos para el crecimiento y supervivencia de *Penaeus vannamei* bajo tecnología Biofloc. En este experimento se realizaron ensayos con diferentes temperaturas (24 °C, 28 °C y 32 °C) y diferente salinidad (10, 20 y 30 g/L). Finalmente se concluyó que las condiciones óptimas para obtener el mayor crecimiento posible, con la mayor productividad y supervivencia, fueron bajo una temperatura de 27,25 °C y una salinidad de 25,5 g/L.

El sistema de tecnología Biofloc involucra a bacterias heterótrofas quimiosintéticas y autótrofas que provocan una disminución en el pH del sistema. En este sentido, las bacterias autótrofas son las que más intervienen en la acidificación de los tanques debido al consumo de grandes cantidades de carbono inorgánico (Martins *et al.*, 2017). Por tanto, el uso de compuestos alcalinos como el carbonato de sodio, el bicarbonato de sodio o el hidróxido de calcio contribuyen a minimizar la reducción de la alcalinidad según Zhang *et al.* (2017). Sin embargo, la elección de los compuestos alcalinizantes puede también influir en el rendimiento de BFT y en los organismos del cultivo. El uso de bicarbonato de sodio es más efectivo para mantener la alcalinidad en el cultivo de *Oreochromis niloticus* en comparación con el hidróxido de calcio, y por lo tanto se refleja en una mejor tasa de crecimiento y en el rendimiento de los peces criados en el sistema (Martins *et al.*, 2017).

Uno de los factores más importantes es el elevado ratio C/N al que debe estar sometido el sistema. Las fuentes de carbono tienen un alto coste económico, por lo tanto, es importante comparar los precios y la disponibilidad de las fuentes de carbono de las que puede depender el acuicultor. Idealmente, la fuente de carbono debe proceder de subproductos (De Schryver *et al.*, 2008). La mayoría de las fuentes de carbono son baratas (salvado de arroz, trigo, tapioca, etc.), pero son carbohidratos complejos, por lo que son menos solubles y la eliminación del amonio es

más lenta debido a una ralentización en el metabolismo de los nitrificantes. Una posible solución a esto puede incluir un pre-tratamiento fermentativo de la fuente de carbono (Romano *et al.*, 2018), o un pre-tratamiento con otros métodos como altas temperaturas o una digestión con microorganismos (Dauda *et al.*, 2017; Romano *et al.*, 2018). Estas estrategias reducen el coste de producción a la vez que se incrementa la flexibilidad de elección de la fuente carbonada.

El uso de diferentes fuentes de carbono puede influir en la composición química de los Bioflocs (Rajkumar *et al.*, 2016). Estas diferencias en cuanto a la comunidad microbiana que forma parte de los Bioflocs como resultado de la fuente de carbono usada fueron investigadas por Wei *et al.* (2016), quienes descubrieron que los Bioflocs que crecen usando glucosa o glicerol están dominados por proteobacterias que son incapaces de crecer usando, por ejemplo, almidón. Por otro lado, las cianobacterias crecen en grandes cantidades usando almidón mientras que su crecimiento disminuye en cultivos basados en glucosa. Otros investigadores han visto, además, que la composición nutricional de los Bioflocs varía también en función de la fuente de carbono orgánica empleada en el cultivo (Dauda *et al.*, 2017). Por ejemplo, los Bioflocs que crecen usando carbohidratos complejos tienen mayores cantidades de proteínas y lípidos que aquellos cultivados con melaza de caña de azúcar, que es un carbohidrato simple (Rajkumar *et al.*, 2016). Además, también se han observado diferencias en cuanto a la composición en ácidos grasos omega-3 y omega-6. Según Crab *et al.* (2010), el cultivo rico en glicerol presenta la mayor concentración de ácido gamma-linolénico, ácido adrenico y ácido docosahexaenoico, mientras que el cultivo rico en glucosa se asocia a cantidades más altas de ácido alfa-linolénico, ácido estearidónico y ácido eicosapentaenoico. Zhao *et al.* (2016) también informaron sobre una mayor cantidad de compuestos bioactivos que incluían polihidroxibutirato (PHB), carotenoides y polisacáridos cuando se usa melaza en un sistema basado en Biofloc en comparación a un uso combinado de melaza y salvado de trigo. El uso de varias fuentes de carbono o la combinación de diferentes fuentes de carbono influye en la composición de los Bioflocs (Zhao *et al.*, 2016).

A. Sistemas de acuicultura de langostino en Bioflocs

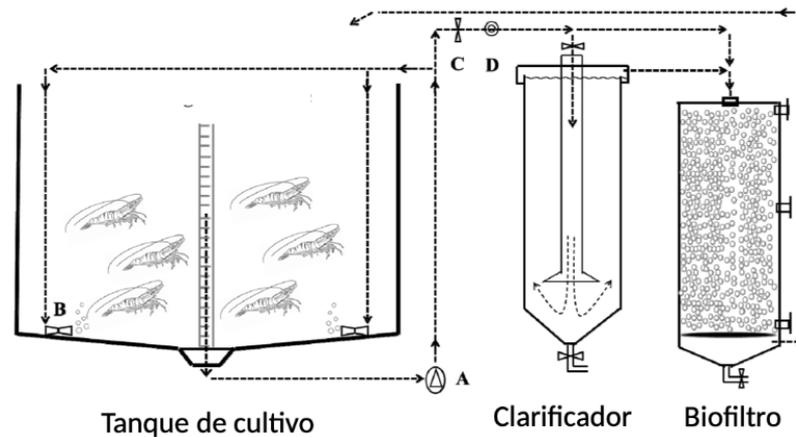
Como ya se ha expresado anteriormente, en las últimas dos décadas, la creciente demanda de langostinos como alimento ha impulsado la rápida expansión e intensificación del cultivo de langostinos en todo el mundo (Nguyen *et al.*, 2019; Belton *et al.*, 2020). Sin embargo, el ambiente acuático de los sistemas intensivos puede deteriorarse rápidamente como resultado de la entrada continua de una gran cantidad de alimentos ricos en proteínas. En particular, los residuos nitrogenados, como el amoníaco, se acumulan rápidamente en el tanque, lo que es perjudicial para los langostinos, incluso en concentraciones muy bajas (Han *et al.*, 2017). En la práctica, se intercambia una gran cantidad de agua con asiduidad para mantener la buena calidad del agua de los sistemas acuícolas (Chen *et al.*, 2018). Esta práctica tradicional a menudo ha causado varios problemas ambientales y económicos, como el desperdicio de agua, la contaminación de las aguas circundantes, la destrucción de los ecosistemas costeros y las pérdidas de cultivos por brotes de enfermedades (Hamilton *et al.*, 2013; Hatje *et al.*, 2016; Thitamadee *et al.*, 2016). Por lo tanto, hay

una creciente demanda de sistemas de cultivo y funcionamiento eficientes y respetuosos con el medio ambiente para lograr el desarrollo sostenible del cultivo de langostinos (Joffre *et al.*, 2018; Robles-Porchas *et al.*, 2020), entre los que destaca la tecnología Biofloc.

Existen una serie de factores bióticos que influyen en la calidad de los Bioflocs, entre los que se incluyen el tamaño, la densidad de la población y la disponibilidad de alimentos, que afectan la producción, la eficiencia y el uso de Bioflocs para la acuicultura del langostino (Xu y Pan, 2014; Zhu *et al.*, 2016; Esparza-Leal *et al.*, 2020). Esta tecnología de tratamiento de agua *in situ*, ha demostrado un gran potencial en el mantenimiento de la calidad del agua (especialmente para la eliminación de amoníaco) para el cultivo de langostinos (Avnimelech *et al.*, 2015; Samocha *et al.*, 2017; Robles-Porchas *et al.*, 2020). En los sistemas de alimentación intensivos, el Biofloc puede tratarse de microorganismos activos y materiales orgánicos acumulados y luego, una vez suspendido en el agua de cultivo, actuar como pequeños biofiltros de depuración del agua (Avnimelech *et al.*, 2015). Bajo condiciones de nulo intercambio de agua con el exterior del tanque, se producirá una cantidad creciente de Biofloc en el agua de cultivo, resultando no solo en un aumento de la tasa de respiración y una disminución del oxígeno disuelto, sino también en estrés ambiental para los langostinos cultivados (Ray *et al.*, 2010; Schweitzer *et al.*, 2013). Además, las grandes fluctuaciones en los niveles de los indicadores de la calidad del agua (como concentración de amoníaco, nitrito, etc.) pueden ocurrir debido al exceso de biomasa o sólidos en suspensión que se acumulan en el sistema. Estudios previos han sugerido que el control moderado de las concentraciones de Biofloc benefician la calidad del agua y el rendimiento de los langostinos en los sistemas BFT (Ray *et al.*, 2010; Samocha *et al.*, 2017).

En un estudio propuesto por Xu *et al.* (2020) se profundizó en la idea de construir un sistema híbrido basado en la combinación de la tecnología Biofloc con RAS a escala piloto para un cultivo intensivo de langostinos. Este sistema estuvo constituido por un tanque de cultivo con un volumen de 30 m³ de agua, un decantador de sedimentación de 0,12 m³ y un biofiltro nitrificante aireado de 0,28 m³ (Fig. 1.3). El agua era bombeada desde el tanque de cultivo haciendo funcionar una bomba de propulsión de forma que la mayor parte del agua circulara hacia el tanque de cultivo a través de inyectores de agua. El resto del agua ingresaba en un decantador de sedimentación y luego pasaba a través de un biofiltro nitrificante y, por último, regresaba al tanque de cultivo por gravedad. Este estudio demostró que la alta eficiencia y estabilidad de la eliminación de amonio a través de la nitrificación podría lograrse mediante el híbrido RAS-BFT a escala piloto para el cultivo intensivo de *L. vannamei* con intercambio de agua cero. La inoculación rica en Bioflocs en el agua del sistema híbrido podría acelerar el desarrollo de Bioflocs *in situ* en los tanques de cultivo contribuyendo así a una rápida y efectiva nitrificación.

Figura I.3. Diagrama esquemático del sistema híbrido BFT-RAS. (A) Bomba, (B) inyector, (C) válvula de recirculación, (D) medidor de flujo (Modificado de Xu *et al.*, 2020).



La densidad de población es un factor clave que afecta a la dinámica del tanque, a la productividad y a la sostenibilidad. El aumento de la densidad de población requerirá grandes cantidades de alimento y dará como resultado un exceso de cargas nutritiva. Estos nutrientes, que necesitan ser reciclados por las comunidades microbianas, pueden causar la eutrofización de los sistemas (Avnimelech, 2007). Actualmente se practica de forma muy extendida el cultivo intensivo de langostinos, especialmente en el sudeste asiático (Arnold *et al.*, 2005; Thong, 2014). Esta tecnología está siendo practicada para conseguir un aumento de tamaño para los langostinos comerciales tanto en cultivos intensivos como en semi-intensivos. La supervivencia, el crecimiento y la salud de los langostinos disminuyen con el aumento de la densidad de población (Wasielesky *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2017). Esto se ha atribuido principalmente a una mayor competencia por el espacio y por las fuentes de alimento, por el canibalismo y por la inestabilidad en la calidad del agua. Los grandes productores normalmente adoptan densidades de población conservadoras, mientras que los pequeños productores tienden a producir densidades más altas con el objetivo de optimizar los recursos y la infraestructura (Arnold *et al.*, 2005).

Por otro lado, se ha visto que los Bioflocs aplicados a langostinos actúan de forma similar a los probióticos usados tradicionalmente en acuicultura de forma que modifican la microbiota presente en el intestino del animal teniendo efectos beneficiosos en la salud de estos. La microbiota intestinal juega un papel fundamental en la absorción de nutrientes, en la inmunidad innata y en la defensa del huésped frente a los patógenos (Semova *et al.*, 2012; Kamada *et al.*, 2013; Rooks y Garrett, 2016). Dado que los animales de acuicultura viven en ambientes acuáticos, los microorganismos acuáticos inevitablemente afectarán a la composición de la microbiota intestinal (Giatsis *et al.*, 2015). Los Bioflocs se han considerado un complemento alimenticio ideal para los langostinos debido a sus abundantes proteínas microbianas (Crab *et al.*, 2012). Además, el tamaño de los bioflocs está estrechamente relacionado con el perfil nutricional de estos (Ekasari *et al.*, 2014) y con el proceso de nitrificación (Vlaeminck *et al.*, 2010). En un estudio realizado por Huang *et al.* (2020) se estudió la correlación entre la microbiota intestinal de los langostinos y los diferentes tamaños de las comunidades bacterianas que forman parte de los Bioflocs concluyendo

que los Bioflocs de gran tamaño enriquecidos con algunas bacterias adheridas de las familias *Rhodobacteraceae* y *Flavobacteriaceae* podrían ayudar a mejorar la calidad del agua y la salud de los langostinos. Sin embargo, los Bioflocs de tamaño pequeño contenían más patógenos potenciales como *Vibrio*, *Candidatus Bacilloplasma* y *Pseudoalteromonas*, lo que podría aumentar el riesgo de padecer enfermedades. Además, la microbiota intestinal está más estrechamente relacionada con las comunidades bacterianas de Bioflocs de gran tamaño, lo que implica que los langostinos prefieren ingerir Bioflocs de un tamaño superior a 20 μm .

II. Objetivos

El presente Trabajo Final de Máster está englobado dentro de un Proyecto denominado BIOFLANGO, que se trata de una colaboración entre la Universidad Politécnica de Valencia y la Universidad de Almería y que está financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (PID2020-114574RB-C21). Este proyecto trata sobre el estudio del efecto de la composición de la dieta y manejo de la alimentación en el rendimiento del langostino. En este sentido, el objetivo principal de este trabajo consistió en realizar una caracterización microbiana de Bioflocs en sistemas de acuicultura, bajo la influencia de diferentes parámetros nutricionales, para la producción sostenible de langostinos. Para la consecución de este objetivo principal se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1- Estudiar las poblaciones microbianas cultivadas de los Bioflocs en función de los parámetros nutricionales aportados al sistema acuícola.
- 2- Analizar metabólicamente la biodiversidad de la microbiota que compone los Bioflocs.

III. Materiales y Metodología

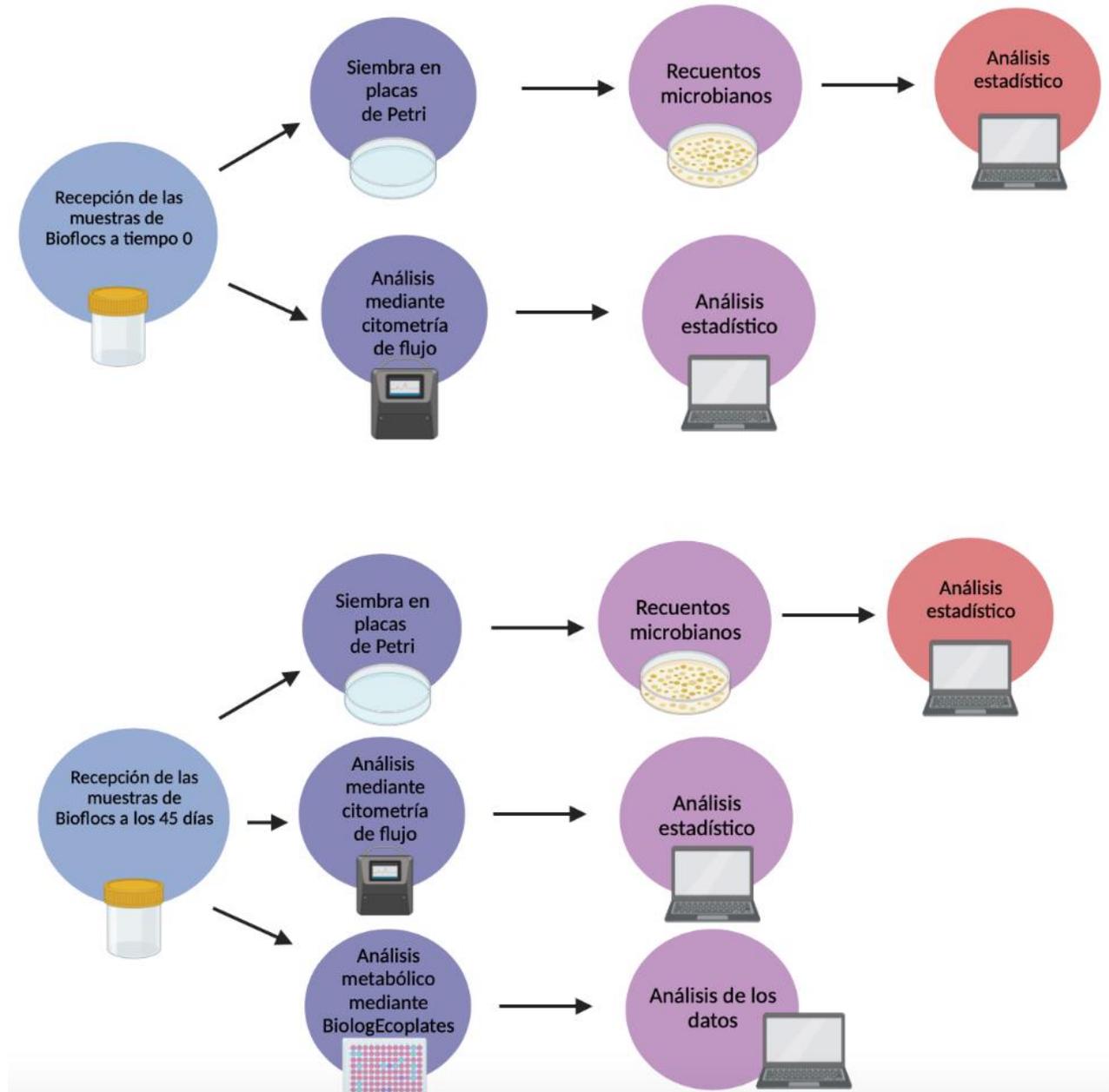
III.1. Diseño experimental

En la Figura III.1 se recoge un esquema donde se ordenan de forma secuencial los pasos seguidos en el desarrollo de los experimentos realizados en el presente Trabajo Final de Máster donde se recogen los procesos necesarios para el estudio de la microbiota en función de los parámetros nutricionales aportados a los sistemas acuícolas objeto de estudio. Todos los pasos secuenciales recogidos en el diseño experimental quedan recogidos y aclarados a lo largo de la sección III. Materiales y Metodología.

A modo de resumen, se trabajó con muestras que biofloc maduras generadas en la Universidad Politécnica de Valencia (entidad coordinadora del proyecto) donde fueron cultivadas en tanques de 80 L de capacidad, con burbujeo de oxígeno constante, control de temperatura para mantenerlas a 28 °C y con una concentración salina de 21 g/L, pero desarrolladas bajo distintos perfiles nutricionales y mantenidas durante 45 días para formar un Biofloc suficiente para alimentar parcialmente sistemas

intensivos de langostinos. Sobre estos Bioflocs, se analizaron en detalle tanto recuentos microbianos (cultivables y citométricos) como parámetros relacionados con la biodiversidad funcional. El tratamiento estadístico de estos datos, permitió conocer en profundidad el comportamiento del microbioma del Biofloc y su posible optimización para el desarrollo de técnicas que fomenten la bioeconomía en sistemas intensivos de acuicultura.

Figura III.1. Esquema del diseño experimental seguido en el ensayo.



III.2. Medios de cultivo

Para la realización de los diferentes medios de cultivo, se incorporaron los componentes de cada uno de ellos en los diferentes matraces, posteriormente se enrasó con agua destilada hasta completar el volumen necesario y se esterilizaron en el autoclave durante 20 minutos a una temperatura de 121

°C y a una presión de 1 atm. Una vez esterilizados, se vertieron en placas de Petri. A continuación, se describen los componentes de cada uno de los medios de cultivo que se utilizaron, así como el porqué de la utilización de cada uno de ellos.

A. Microbiota heterótrofa marina

Para la siembra de la microbiota heterótrofa se empleó el medio Marine Broth (Panreac) (Tabla III.1). El medio Marine Broth fue utilizado debido a que es el medio de cultivo de referencia para para el crecimiento de heterótrofos procedentes de ambientes acuáticos marinos por su alto contenido en cloruro de sodio.

Tabla III.1. Composición de los medios de cultivo Marine Broth.

Medio de cultivo	Composición	pH
Marine Broth	Ácido bórico: 0,022 g/L Nitrato de amonio: 0,0016 g/L Cloruro de calcio: 1,8 g/L Cloruro de estroncio: 0,034 g/L Extracto de levadura: 1 g/L Citrato de hierro: 0,1 g/L Cloruro de magnesio: 8,8 g/L Peptona bacteriológica: 5 g/L Bromuro de potasio: 0,08 g/L Cloruro de potasio: 0,55 g/L Cloruro de sodio: 19,4 g/L Fluoruro de sodio: 0,0024 g/L Hidrógeno de sodio carbonatado: 0,16 g/L Fosfato de hidrógeno disódico: 0,008 g/L Silicato de sodio: 0,004 g/L Sulfato de sodio: 3,24 g/L Agar: 20 g/L	7,6

B. Nitrificantes

Para la evaluación del crecimiento de los microorganismos nitrificantes se utilizó un medio de cultivo elaborado por componentes específicos para el crecimiento de microorganismos nitrificantes (Tabla III.2). Este medio de cultivo sólido contiene una composición mineral mínima que impide el crecimiento de otros grupos microbianos.

Tabla III.2. Medio de cultivo específico para nitrificantes (Rodríguez *et al.*, 2017).

Compuesto	Composición (g/L)	pH
K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O	0,66	7,5
NH ₄ Cl	1	
NaSO ₄	2	
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2	
Agar	15	

III.3. Evaluación de los diferentes parámetros nutricionales

En la Tabla III.3 se recogen los diferentes grupos experimentales con los que se ha trabajado en el ensayo sobre la evaluación de los diferentes parámetros nutricionales. En dicha tabla se indica que se elaboraron cuatro repeticiones de cada parámetro nutricional. En total se dispuso de 20 muestras de tanques que fueron alimentados con melaza como fuente de carbono; otras 20 de tanques que fueron alimentados con levadura; y, finalmente, otras 20 procedentes de tanques alimentados con biopolímeros. En cada bloque de 20 muestras en función de la fuente de carbono, se añadió, además, otro factor diferenciador: la relación C/N, de modo que, las 4 primeras muestras presentaron una relación C/N de 10:1, las 4 siguientes de 14:1, las 4 siguientes de 18:1, las 4 siguientes de 22:1 y las 4 últimas de 26:1. Todos los tanques se encontraban bajo condiciones de burbujeo constante de oxígeno, a una temperatura de 28 °C y contenían una concentración salina del 21%. Estos tanques de 80 L de capacidad se encuentran ubicados en las instalaciones de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural de la Universidad Politécnica de Valencia, centro coordinador del proyecto en el que se engloba el presente trabajo (Fig. III.2).

Figura III.2. Tanques de 80 L de capacidad con sistema de aireación continua y control de temperatura para la generación de Bioflocs. La imagen muestra los tanques réplica localizados en la Universidad de Almería.



Tabla III.3. Grupos experimentales al inicio del ensayo.

Muestra	Fuente de Carbono	Relación C/N
1	Melaza	10:1
2	Melaza	10:1
3	Melaza	10:1
4	Melaza	10:1
5	Melaza	14:1
6	Melaza	14:1
7	Melaza	14:1
8	Melaza	14:1
9	Melaza	18:1
10	Melaza	18:1
11	Melaza	18:1
12	Melaza	18:1
13	Melaza	22:1
14	Melaza	22:1
15	Melaza	22:1
16	Melaza	22:1
17	Melaza	26:1
18	Melaza	26:1
19	Melaza	26:1
20	Melaza	26:1
21	Levadura	10:1
22	Levadura	10:1
23	Levadura	10:1
24	Levadura	10:1
25	Levadura	14:1

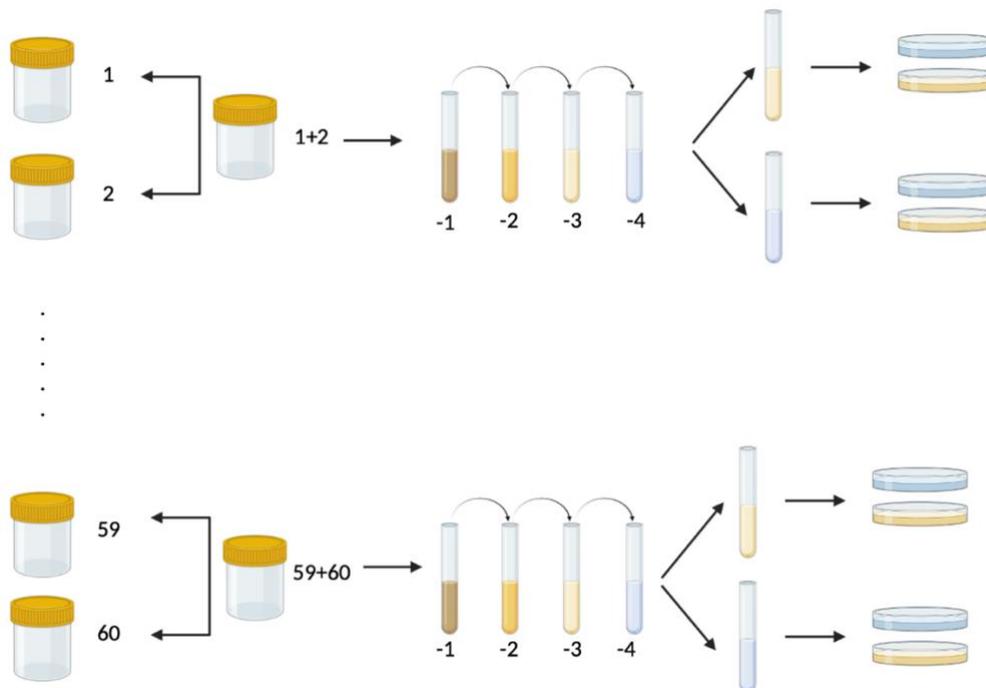
Muestra	Fuente de Carbono	Relación C/N
26	Levadura	14:1
27	Levadura	14:1
28	Levadura	14:1
29	Levadura	18:1
30	Levadura	18:1
31	Levadura	18:1
32	Levadura	18:1
33	Levadura	22:1
34	Levadura	22:1
35	Levadura	22:1
36	Levadura	22:1
37	Levadura	26:1
38	Levadura	26:1
39	Levadura	26:1
40	Levadura	26:1
41	Biopolímeros	10:1
42	Biopolímeros	10:1
43	Biopolímeros	10:1
44	Biopolímeros	10:1
45	Biopolímeros	14:1
46	Biopolímeros	14:1
47	Biopolímeros	14:1
48	Biopolímeros	14:1
49	Biopolímeros	18:1
50	Biopolímeros	18:1
51	Biopolímeros	18:1
52	Biopolímeros	18:1
53	Biopolímeros	22:1
54	Biopolímeros	22:1
55	Biopolímeros	22:1
56	Biopolímeros	22:1
57	Biopolímeros	26:1
58	Biopolímeros	26:1
59	Biopolímeros	26:1
60	Biopolímeros	26:1

A. Recuentos microbianos en placa

Cada muestra analizada contenía 100 mL de volumen, que se separaron en dos alícuotas: 50 mL se congelaron y 50 mL fueron refrigerados para ser evaluados a tiempo 0. Para la evaluación de estas últimas las alícuotas mediante siembras en placas de Petri (Fig. III.3) se prepararon muestras compuestas mezclando 50 mL de una muestra con 50 mL de la siguiente, correspondientes a la misma

fuente de carbono y el mismo ratio C/N, para realizar mezclas homogéneas debido a que se trataba de repeticiones del mismo ensayo, de modo que se emplearon 2 repeticiones para cada condición, estudiando un total de 30 muestras. Con cada una de estas muestras se hicieron diluciones seriadas utilizando solución salina al 0,9 %. Para la realización de las diluciones se extrajo 1 mL de la mezcla homogénea y se incorporó a un tubo de ensayo que contenía 9 mL de solución salina estéril para obtener la dilución -1. Para obtener la dilución -2 se incorpora 1 mL de la dilución -1 a un nuevo tubo con 9 mL de solución salina estéril, y así sucesivamente hasta llegar a la dilución -4. Finalmente, fueron sembrados 0,1 mL de la dilución -3 y de la dilución -4 en medio Marine Broth y otros 0,1 mL de las diluciones -3 y -4 en medio para nitrificantes, haciendo uso de bolitas de vidrio estériles para dispersar el volumen sobre la superficie de cada placa. Para cada medio de cultivo se realizaron 2 repeticiones de cada dilución, de forma que, como la mezcla homogénea 1 y la mezcla homogénea 2 presentaban la misma composición, al final se obtuvieron 4 repeticiones de cada muestra compuesta perteneciente a la misma fuente de carbono y su respectiva relación C/N, para poder realizar el análisis estadístico con mayor fiabilidad. Las placas fueron incubadas 48 h en el caso de la microbiota aerobia mesófila en la cámara de incubación a 30 °C y, en el caso de los nitrificantes, a temperatura ambiente durante un periodo de 7 a 14 días. Una vez transcurridos estos periodos de incubación se realizaron recuentos en placa para evaluar el crecimiento microbiano.

Figura III.3. Evaluación de las mezclas homogéneas.



A los 45 días se recibieron nuevamente muestras procedentes de la Universidad Politécnica de Valencia. En este segundo muestreo, diversos tanques resultaron no viables, por lo que en la Tabla III.4 se puede ver la relación de muestras con las que se realizó el seguimiento a los 45 días del inicio del proceso.

Tabla III.4. Grupos experimentales a los 45 días del inicio del proceso.

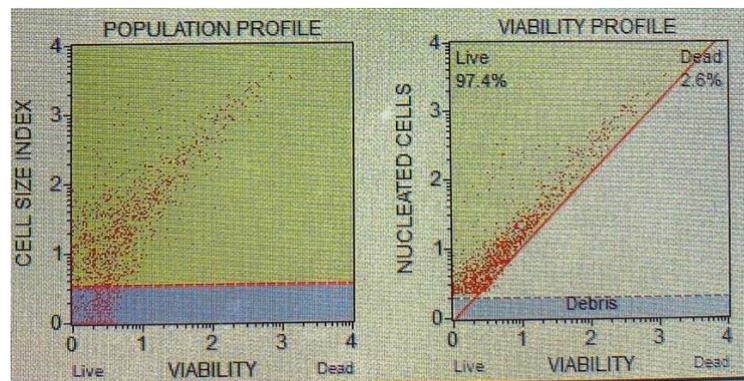
Muestra	Fuente de Carbono	Relación C/N
1	Melaza	10:1
3	Melaza	10:1
4	Melaza	10:1
5	Melaza	14:1
6	Melaza	14:1
8	Melaza	14:1
11	Melaza	18:1
12	Melaza	18:1
13	Melaza	22:1
14	Melaza	22:1
15	Melaza	22:1
16	Melaza	22:1
17	Melaza	26:1
21	Levadura	10:1
23	Levadura	10:1
24	Levadura	10:1
25	Levadura	14:1
26	Levadura	14:1
29	Levadura	18:1
30	Levadura	18:1
31	Levadura	18:1
32	Levadura	18:1
34	Levadura	22:1
36	Levadura	22:1
37	Levadura	26:1
38	Levadura	26:1
40	Levadura	26:1
41	Biopolímeros	10:1
42	Biopolímeros	10:1
43	Biopolímeros	10:1
44	Biopolímeros	10:1
45	Biopolímeros	14:1
46	Biopolímeros	14:1
47	Biopolímeros	14:1
48	Biopolímeros	14:1
49	Biopolímeros	18:1
51	Biopolímeros	18:1
53	Biopolímeros	22:1
55	Biopolímeros	22:1
56	Biopolímeros	22:1
58	Biopolímeros	26:1
59	Biopolímeros	26:1

Como se puede observar en la Tabla III.4, el proceso explicado en la Figura III.2 no fue posible de desarrollar, tal y como aparece en dicha figura, debido a que algunos tanques no resultaron viables. Para solucionar el problema de no poder realizar mezclas homogéneas con la totalidad de las alícuotas, se optó por realizar las mezclas homogéneas con aquellas muestras que así lo permitieron y sembrar dos repeticiones de cada una de ellas al igual que en el caso del primer muestreo, y con aquellas muestras que no permitieron seguir el sistema anterior, se sembraron 2 repeticiones empleando los tanques como réplicas agrupadas de 4 en 4. Debido a esto, finalmente también se obtuvieron 4 repeticiones para cada combinación de fuente de carbono y relación C/N al igual que en el primer muestreo, a excepción de la muestra procedente del tanque número 17 donde sí se tuvieron que sembrar 4 repeticiones de una misma muestra puesto que sus tanques réplicas no resultaron viables. De esta forma se obtuvieron datos estadísticamente sólidos. El resto del proceso que se siguió fue idéntico al mostrado en la Figura III.2.

B. Citometría de flujo

Por otro lado, tanto las muestras recibidas al inicio del proceso como las recibidas a los 45 días fueron analizadas mediante citometría de flujo para evaluar los recuentos microbianos totales, tanto de células viables como no viables. Para realizar este análisis se utilizó el protocolo marcado por el citómetro Guava Muse Cell Analyzer de Luminex (Luminex Muse Documentation). Con cada nuevo uso del citómetro se realizó un lavado completo del equipo, seguido de una calibración usando la solución denominada System Check. Posteriormente, se realizaron las medidas. Para la preparación de las muestras se incorporan 50 μL de cada una en un tubo Eppendorf con 100 μL de la solución Count and Viability de Luminex. La primera medida que se tomó en cada caso, correspondió a un control que se realizó con agua salina a una concentración de 21 g/L, la misma que contienen los tanques de Bioflocs. Esta primera medida se usó para establecer los límites de los diagramas donde se diferencian las células viables de las no viables. Luego, se realizaron el resto de medidas con todas las muestras que se analizaron (Fig. III.4).

Figura III.4. Diagrama obtenido tras la realización de las medidas para establecer los límites entre viables y no viables.



C. Análisis estadístico

Los datos fueron evaluados estadísticamente usando el programa Statgraphics Centurion 19 para realizar un análisis multifactorial ANOVA, de forma que la variable objeto de estudio fue el logaritmo de las unidades formadoras de colonias por mililitro, siendo este estudiado en función de la repetición, la fuente de carbono utilizada y la relación C/N. En el caso de los datos obtenidos mediante citometría de flujo, el factor repetición no se tuvo en cuenta ya que se obtuvo una única repetición para cada muestra.

III.4. Caracterización metabólica de las muestras a los 45 días del inicio del proceso

Para realizar la caracterización metabólica de las muestras objeto de estudio se emplearon BiologEcoPlates (Biolog, USA), según la metodología desarrollada por Feigl *et al.* (2017). Esta técnica consiste en una microplaca de 96 pocillos que contiene 31 sustratos diferentes (N) y que se encuentran organizados de forma que se pueden obtener 3 réplicas de cada uno de ellos (Fig. III.5).

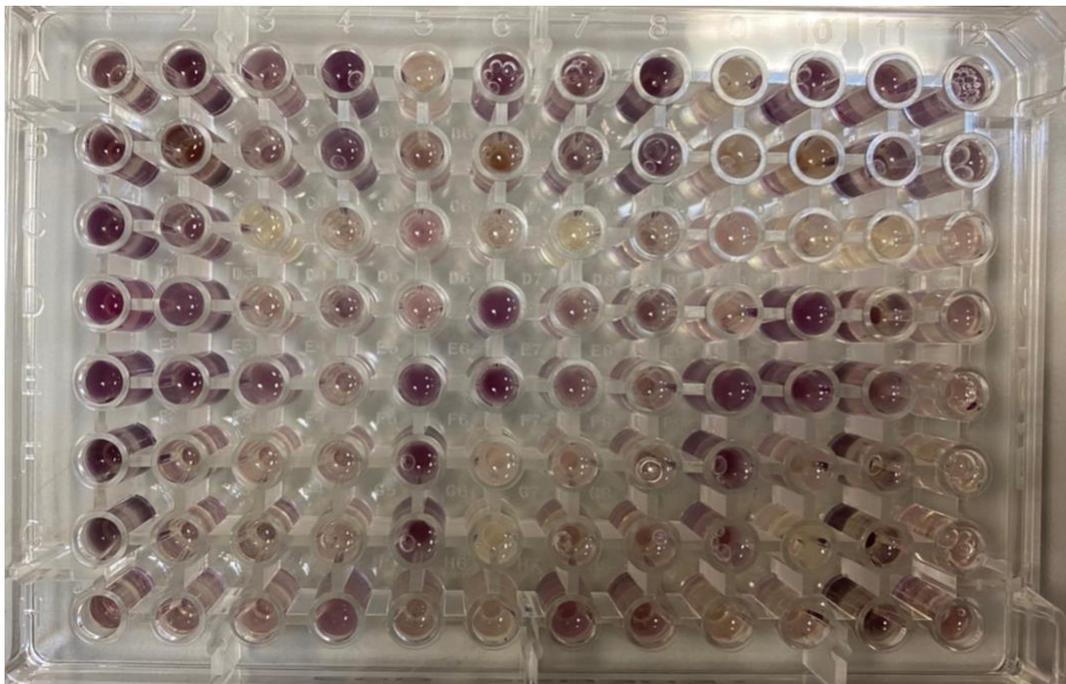
Figura III.5. Disposición de los diferentes pocillos presentes en cada una de las BiologEcoPlates.

A1 Agua	A2 Metil-D-glucósido	A3 Ácido D-Galactónico	A4 L-Arginina	A1 Agua	A2 Metil-D-glucósido	A3 Ácido D-Galactónico	A4 L-Arginina	A1 Agua	A2 Metil-D-glucósido	A3 Ácido D-Galactónico	A4 L-Arginina
B1 Éster metílico del ácido pirúvico	B2 D-Xilosa	B3 Ácido D-galacturónico	B4 L-Asparagina	B1 Éster metílico del ácido pirúvico	B2 D-Xilosa	B3 Ácido D-galacturónico	B4 L-Asparagina	B1 Éster metílico del ácido pirúvico	B2 D-Xilosa	B3 Ácido D-galacturónico	B4 L-Asparagina
C1 Tween 40	C2 Eritritol	C3 Ácido 2-Hidroxibenzoico	C4 L-Fenilalanina	C1 Tween 40	C2 Eritritol	C3 Ácido 2-Hidroxibenzoico	C4 L-Fenilalanina	C1 Tween 40	C2 Eritritol	C3 Ácido 2-Hidroxibenzoico	C4 L-Fenilalanina
D1 Tween 80	D2 D-Manitol	D3 Ácido 4-Hidroxibenzoico	D4 L-Serina	D1 Tween 80	D2 D-Manitol	D3 Ácido 4-Hidroxibenzoico	D4 L-Serina	D1 Tween 80	D2 D-Manitol	D3 Ácido 4-Hidroxibenzoico	D4 L-Serina
E1 Ciclode-xtrina	E2 N-Acetil-D-glucosamina	E3 Ácido hidroxibutírico	E4 L-Treonina	E1 Ciclode-xtrina	E2 N-Acetil-D-glucosamina	E3 Ácido hidroxibutírico	E4 L-Treonina	E1 Ciclode-xtrina	E2 N-Acetil-D-glucosamina	E3 Ácido hidroxibutírico	E4 L-Treonina
F1 Glicógeno	F2 Ácido-D-Glucosaminico	F3 Ácido itacónico	F4 Ácido Glicol-L-Glutámico	F1 Glicógeno	F2 Ácido-D-Glucosaminico	F3 Ácido itacónico	F4 Ácido Glicol-L-Glutámico	F1 Glicógeno	F2 Ácido-D-Glucosaminico	F3 Ácido itacónico	F4 Ácido Glicol-L-Glutámico
G1 D-Celobiosa	G2 Glucosa -1-fosfato	G3 Ácido ketobutírico	G4 Feniletilamina	G1 D-Celobiosa	G2 Glucosa -1-fosfato	G3 Ácido ketobutírico	G4 Feniletilamina	G1 D-Celobiosa	G2 Glucosa -1-fosfato	G3 Ácido ketobutírico	G4 Feniletilamina
H1 D-Lactosa	H2 D,L-Glicerol fosfato	H3 Ácido D-Málico	H4 Putrescina	H1 D-Lactosa	H2 D,L-Glicerol fosfato	H3 Ácido D-Málico	H4 Putrescina	H1 D-Lactosa	H2 D,L-Glicerol fosfato	H3 Ácido D-Málico	H4 Putrescina

El fundamento de la técnica consiste en que si la microbiota de las muestras es capaz de degradar el sustrato presente en el pocillo se produce un viraje de color hacia el morado debido a que, unido al sustrato, se encuentra un cromóforo que se libera al producirse la degradación de los sustratos (Fig. III.6). Para la inoculación de las placas fue necesario realizar diluciones seriadas, empleando solución salina estéril, de la muestra objeto de estudio para obtener la dilución -3, posteriormente se incorporaron 150 µL de esa dilución en cada uno de los pocillos. Una vez inoculadas las placas, se colocaron en la cámara de incubación a 30 °C hasta que se produjo el cambio en la coloración de los pocillos. En el presente trabajo, se dejó incubando durante 48 h. Una vez retiradas las microplacas de

la cámara de incubación se realizaron medidas de absorbancia de cada una de ellas a una longitud de onda de 590 nm empleando el espectrofotómetro EON para microplacas (Biotek, USA). Una vez obtenidos los datos de las diferentes absorbancias (ODi), se realizó la corrección de estas utilizando la ODi del control (agua). Estos resultados se usaron para calcular los diferentes índices de biodiversidad tales como la riqueza funcional (R) (suma de los pocillos cuya $ODi \geq 0,15$), el índice de Shannon ($H' = -\sum p_i \ln(p_i)$, donde $p_i = ODi/N$) y el desarrollo promedio de la coloración en cada pocillo ($AWCD = \sum ODi/N$). Los resultados también fueron expresados como desarrollo de color promedio de cada uno de los sustratos (SAWCD) para cada subcategoría de estos, en porcentaje. El cálculo de estos índices de biodiversidad se realizó según el método desarrollado por Sala *et al.* (2010) y fueron representados en una gráfica teniendo en cuenta el promedio del AWCD, el promedio del índice de Shannon, el promedio de la riqueza funcional y sus respectivas desviaciones estándar para cada una de las muestras. Los grupos homogéneos fueron obtenidos mediante un análisis ANOVA realizado con el programa Statgraphics Centurion 19.

Figura III.6. Viraje de color debido a la degradación de los sustratos.



IV. Resultados y Discusión

A continuación, se describen los resultados obtenidos tras el desarrollo experimental de este trabajo, así como la discusión correspondiente a los mismos. Estos resultados están organizados en tres epígrafes diferentes, por lo que, en primer lugar, se desarrollan los resultados relativos a los recuentos microbianos de las muestras procedentes de los tanques alimentados con diferentes parámetros nutricionales; en segundo lugar, se abordan los resultados obtenidos mediante citometría de flujo en relación con los recuentos de microorganismos totales; y, en tercer lugar, se muestran los datos obtenidos tras el desarrollo de la técnica BiologEcoPlates para el estudio de la biodiversidad

metabólica una vez transcurridos 45 días desde el inicio de los ensayos llevados a cabo en el presente trabajo.

IV.1. Estudio de la composición microbiana en función de los parámetros nutricionales aportados al sistema

Se realizó la determinación de microorganismos Heterótrofos y Nitrificantes mediante técnicas microbiológicas de siembra en placas de Petri al inicio del proceso y a los 45 días del inicio del mismo. Los estudios estadísticos correspondientes se muestran en las Tablas IV.1-16 y en las Figuras IV.1-4.

Tabla IV.1. Análisis de Varianza para Heterótrofos al inicio del proceso mediante Suma de Cuadrados Tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	P
Efectos Principales					
Repetición	2,99736	3	0,999119	3,32	0,0271
C/N	4,17547	4	1,04387	3,07	0,0141
Fuente de C	0,786305	2	0,393152	1,31	0,2798
Residuos	15,0456	50	0,300913		
Total (corregido)	23,0048	59			

GL: Grado de Libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación). Se marcan en rojo los factores significativos.

Figura IV.1. Gráfico de medias para Heterótrofos al inicio del proceso. Se ve representada, para cada una de las muestras, la media del logaritmo de las unidades formadoras de colonias por mililitro. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar, donde n=4 (LSD 95%).

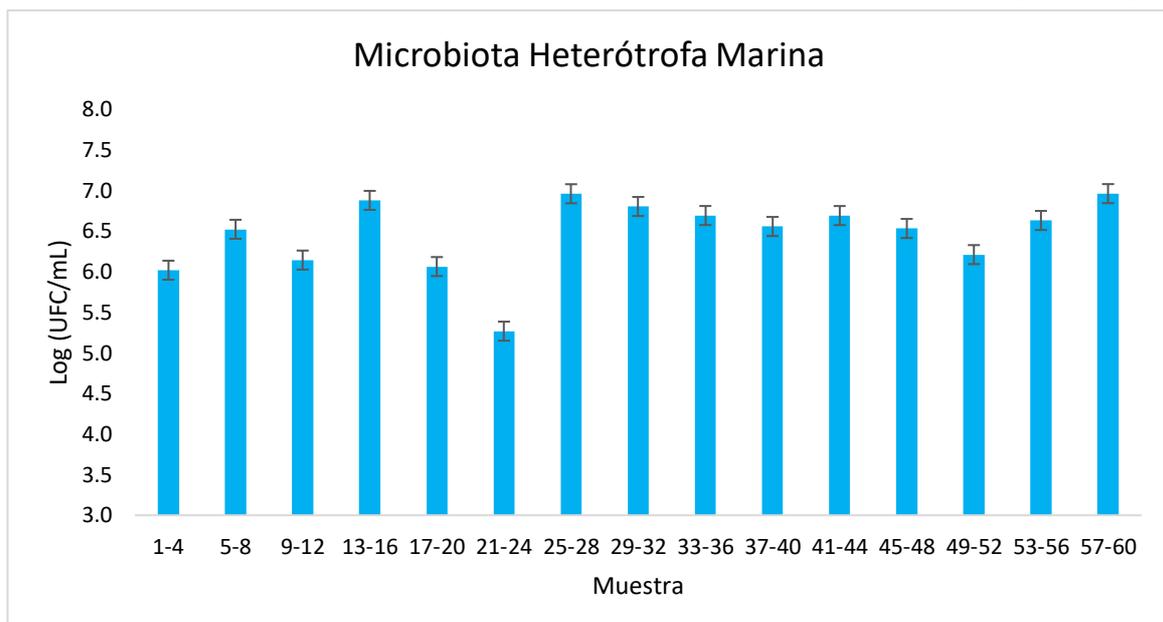


Tabla IV.2. Prueba de rango múltiple para Heterótrofos al inicio del proceso para el factor Relación C/N.

C/N	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
10:1	12	5,99059	0,168432	A
18:1	12	6,38355	0,168432	AB
26:1	12	6,52504	0,168432	B
14:1	12	6,66936	0,168432	B
22:1	12	6,73148	0,168432	B

Tabla IV.3. Prueba de rango múltiple para Heterótrofos al inicio del proceso para el factor Fuente de Carbono.

Fuente de C	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
Melaza	20	6,32296	0,130467	A
Levadura	20	6,45387	0,130467	A
Biopolímeros	20	6,32296	0,130467	A

Tabla IV.4. Prueba de rango múltiple para Heterótrofos al inicio del proceso para el factor Repetición.

Repetición	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
3	15	6,22377	0,141636	A
4	15	6,25405	0,141636	AB
1	15	6,63734	0,141636	BC
2	15	6,72486	0,141636	C

Los datos recogidos en las Tablas IV.1-4 y en la Figura IV.1 muestran que tanto el factor Repetición como el factor Relación C/N son estadísticamente significativos, con un nivel de confianza del 95% debido a que el valor-P es menor que 0,05. La Relación C/N que mejores resultados dio en cuanto a crecimiento de Heterótrofos fue la 22:1, seguida de la 14:1, con lo cual se puede concluir que un aporte deficitario o, por el contrario, muy elevado de carbono resultaría perjudicial para la formación de Bioflocs maduros al inicio del proceso.

Tabla IV.5. Análisis de Varianza para Heterótrofos a los 45 días del inicio del proceso mediante Suma de Cuadrados Tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	P
Efectos Principales					
Repetición	0,149606	3	0,0498688	0,54	0,6551
C/N	1,10032	4	0,275081	3,00	0,0271
Fuente de C	3,90405	2	1,95202	21,26	0
Residuos	6,14773	59	0,0918341		
Total (corregido)	11,71	68			

GL: Grado de Libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación). Se marcan en rojo los factores significativos.

Figura IV.2. Gráfico de medias para Heterótrofos a los 45 días del inicio del proceso. Se ve representada, para cada una de las muestras, la media del logaritmo de las unidades formadoras de colonias por mililitro. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar, donde n=4 (LSD 95%).

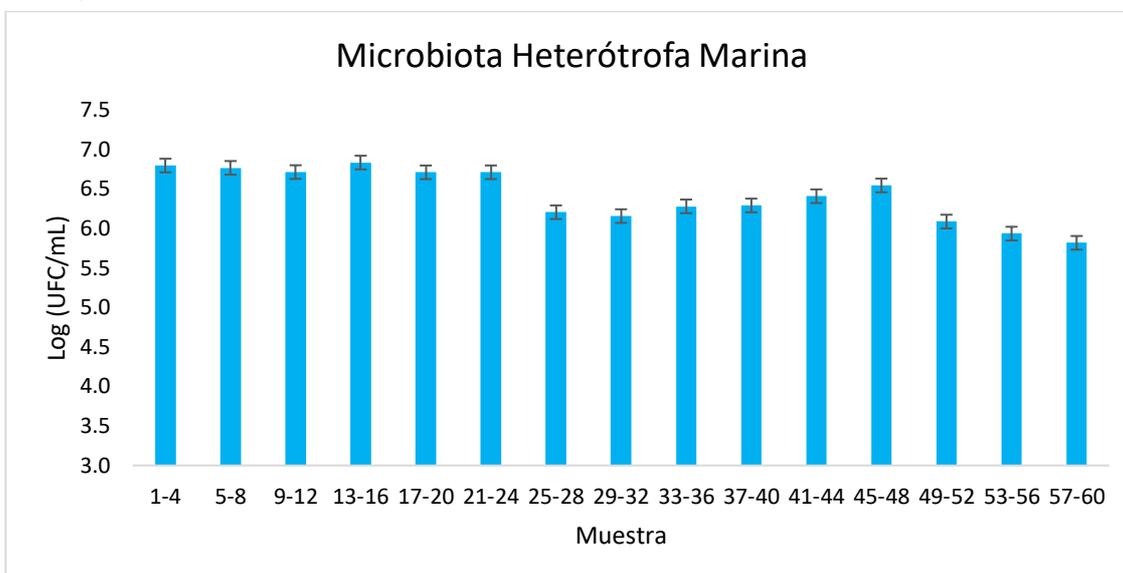


Tabla IV.6. Prueba de rango múltiple para Heterótrofos a los 45 días del inicio del proceso para el factor Relación C/N.

C/N	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
26:1	12	6,27281	0,0874805	A
18:1	12	6,31869	0,0874805	A
22:1	12	6,34914	0,0874805	A
14:1	12	6,50501	0,0874805	AB
10:1	12	6,6381	0,0874805	B

Tabla IV.7. Prueba de rango múltiple para Heterótrofos a los 45 días del inicio del proceso para el factor Fuente de Carbono.

Fuente de C	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
Biopolímeros	20	6,15805	0,0677621	A
Levadura	20	6,32837	0,0677621	B
Melaza	20	6,76383	0,0677621	C

Tabla IV.8. Prueba de rango múltiple para Heterótrofos a los 45 días del inicio del proceso para el factor Repetición.

Repetición	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
3	15	6,36073	0,078245	A
2	15	6,40893	0,078245	A
1	15	6,43027	0,078245	A
4	15	6,37723	0,078245	A

En el caso de los Heterótrofos a los 45 días del inicio del proceso (Tablas IV.5-8 y Figura IV.2), tanto la Relación C/N como la Fuente de Carbono son factores estadísticamente significativos. La mejor relación C/N en cuanto a unidades logarítmicas obtenidas de microorganismos Heterótrofos fue la 10:1, mientras que la mejor Fuente de Carbono fue la melaza.

Tabla IV.9. Análisis de Varianza para Nitrificantes al inicio del proceso mediante Suma de Cuadrados Tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	P
Efectos Principales					
Repetición	0,0565422	3	0,0188474	0,07	0,9767
C/N	3,60103	4	0,900258	3,43	0,0144
Fuente de C	1,85041	2	0,925207	3,53	0,0365
Residuos	13,8507	53	0,277014		
Total (corregido)	19,3587	59			

GL: Grado de Libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación). Se marcan en rojo los factores significativos.

Figura IV.3. Gráfico de medias para Nitrificantes al inicio del proceso. Se ve representada, para cada una de las muestras, la media del logaritmo de las unidades formadoras de colonias por mililitro. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar, donde n=4 (LSD 95%).

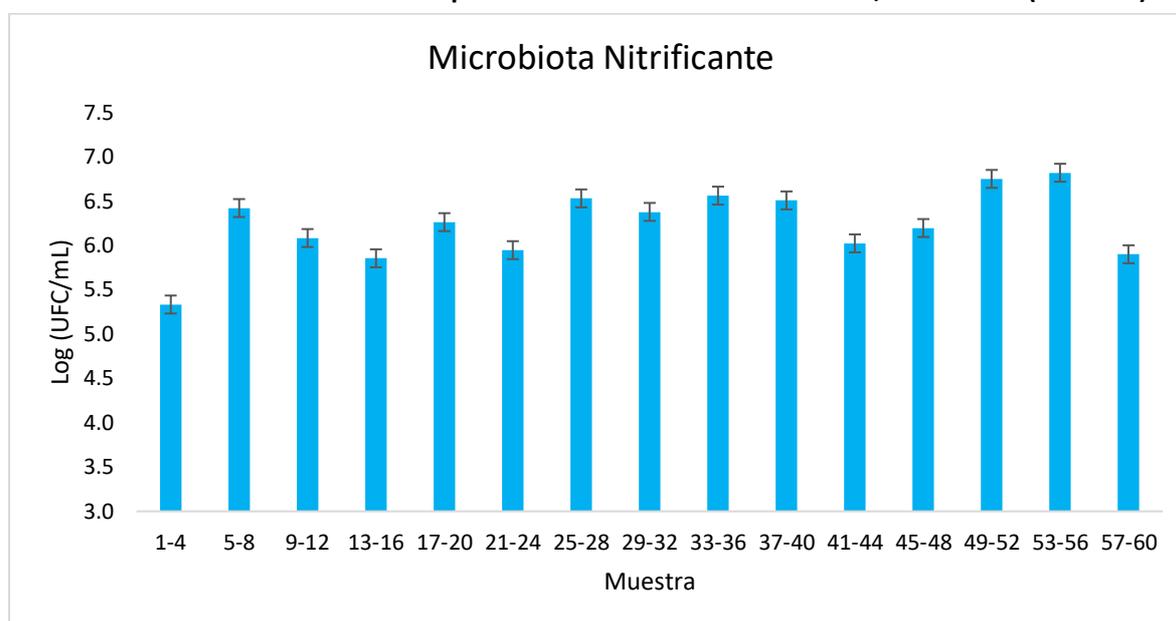


Tabla IV.10. Prueba de rango múltiple para Nitrificantes al inicio del proceso para el factor Relación C/N.

C/N	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
10:1	12	5,76729	0,147874	A
26:1	12	6,22302	0,147874	B
14:1	12	6,38218	0,147874	B

C/N	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
18:1	12	6,40334	0,147874	B
22:1	12	6,41168	0,147874	B

Tabla IV.11. Prueba de rango múltiple para Nitrificantes al inicio del proceso para el factor Fuente de Carbono.

Fuente de C	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
Melaza	20	5,99064	0,114543	A
Biopolímeros	20	6,33737	0,114543	B
Levadura	20	6,3845	0,114543	B

Tabla IV.12. Prueba de rango múltiple para Nitrificantes al inicio del proceso para el factor Repetición.

Repetición	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
2	15	6,1879	0,135896	A
1	15	6,23693	0,135896	A
4	15	6,2576	0,135896	A
3	15	6,26758	0,135896	A

Por su parte, los microorganismos Nitrificantes, los datos correspondientes al inicio del proceso aparecen recogidos en las Tablas IV.9-12 y en la Figura IV.3. En ellas se puede observar como tanto el factor Fuente de Carbono como el factor Relación C/N resultaron estadísticamente significativos debido a que el valor-P en ambos casos fue menor que 0,05 con un nivel de confianza del 95%. En este sentido, se observa que la mejor Fuente de Carbono para la proliferación de Nitrificantes al inicio del proceso fue la levadura junto con los biopolímeros y, en cuanto a la relación C/N, se observa que no existieron diferencias significativas entre ninguno de los valores, excepto en la relación C/N 10:1. Al igual que en el caso de los microorganismos Heterótrofos, se ha observado que las Relaciones C/N más próximas a la moderación fueron las más adecuadas para el aumento en el número de microorganismos Nitrificantes. También se puede observar que el número de Heterótrofos al inicio del proceso fue cercano a las 7 unidades logarítmicas (Figura IV.1), mientras que los Nitrificantes se situaron en torno a 6,4 (Figura IV.3.), esto pudo deberse a que los Heterótrofos se alimentaban de la materia orgánica para generar los nitratos y nitritos de los que se aprovechaban los microorganismos nitrificantes conforme el proceso iba evolucionando.

Tabla IV.13. Análisis de Varianza para Nitrificantes a los 45 días del inicio del proceso mediante Suma de Cuadrados Tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	P
Efectos Principales					
Repetición	0,0683196	3	0,0178033	0,11	0,951
C/N	0,218205	4	0,158873	0,28	0,8927
Fuente de C	0,561623	2	0,384207	1,42	0,2522

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	P
Residuos	9,9136	50	0,180021		
Total (corregido)	10,7618	59			

GL: Grado de Libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación).

Figura IV.4. Gráfico de medias para Nitrificantes a los 45 días del inicio del proceso. Se ve representada, para cada una de las muestras, la media del logaritmo de las unidades formadoras de colonias por mililitro. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar, donde n=4 (LSD 95%).

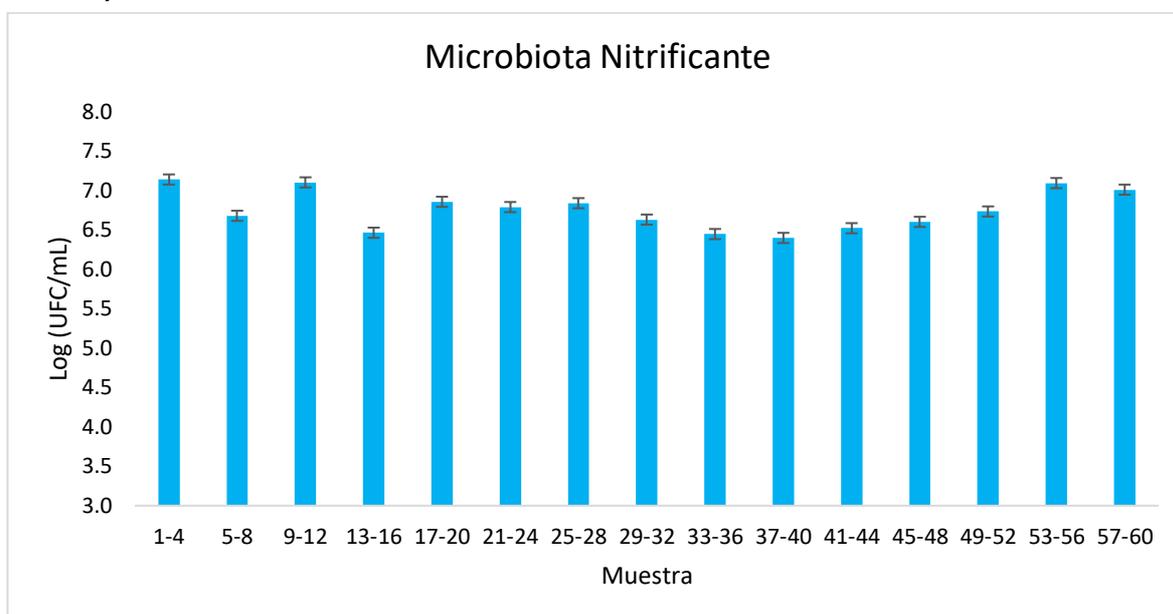


Tabla IV.14. Prueba de rango múltiple para Nitrificantes a los 45 días del inicio del proceso para el factor Relación C/N.

C/N	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
22:1	12	6,66694	0,128541	A
14:1	12	6,70508	0,128541	A
26:1	12	6,75359	0,128541	A
10:1	12	6,81531	0,128541	A
18:1	12	6,82082	0,128541	A

Tabla IV.15. Prueba de rango múltiple para Nitrificantes a los 45 días del inicio del proceso para el factor Fuente de Carbono.

Fuente de C	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Levadura	20	6,61937	0,0995671	A
Biopolímeros	20	6,79093	0,0995671	A
Melaza	20	6,84674	0,0995671	A

Tabla IV.16. Prueba de rango múltiple para Nitrificantes a los 45 días del inicio del proceso para el factor Repetición.

Repetición	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	15	6,71751	0,11497	A
2	15	6,72019	0,11497	A
3	15	6,79145	0,11497	A
4	15	6,78024	0,11497	A

En las Tablas IV.13-16 y en la Figura IV.4 se recopilan los datos estadísticos correspondientes a los microorganismos Nitrificantes a los 45 días del inicio del ensayo. Se puede observar que ningún factor fue estadísticamente significativo. Sin embargo, la mejor Relación C/N fue la 18:1 y la mejor Fuente de Carbono la melaza.

Según Dauda *et al.* (2020), cuando se desconoce la relación C/N óptima, se adopta una relación próxima a 15:1. Sin embargo, en otros estudios se ha indicado que incrementar la relación C/N a niveles superiores no tiene efectos negativos en cuanto a la calidad del animal cultivado o a la calidad de los Bioflocs. Por ejemplo, en un estudio realizado por Xu y Pan (2013) no se encontraron diferencias significativas en la eliminación de las formas tóxicas del nitrógeno, en la formación de Bioflocs ni en el rendimiento del crecimiento de *L. vannamei* criado con relaciones C/N situadas entre 15:1 y 20:1. Esto es muy importante, ya que, en el presente trabajo, las relaciones C/N óptimas al inicio del proceso para la proliferación de Heterótrofos se situaron entre 14:1 y 22:1 (Tabla IV.2), al igual que en el caso de los Nitrificantes (Tabla IV.10). A los 45 días se observó como la relación C/N óptima para los microorganismos Nitrificantes fue de 18:1 (Tabla IV.14) y en el caso de los Heterótrofos existió una mayor proliferación en torno a la relación C/N 10:1 (Tabla IV.6). Estos datos concuerdan con lo relatado en estudios realizados por Dauda *et al.* (2020) en los que se afirmó que las relaciones C/N situadas en torno a 15:1 son las óptimas para el rendimiento del Biofloc en cualquier momento del proceso, ya sea al inicio o durante el trascurso de este, mientras que la relación 10:1 sería la óptima únicamente cuando los Bioflocs han alcanzado su madurez. No obstante, cuando no existen diferencias significativas, lo ideal es trabajar bajo las condiciones más cómodas, es decir, con relaciones C/N bajas.

En el caso del factor Fuente de Carbono, se pudo observar como en el caso de los Heterótrofos al inicio del proceso la que mejores resultados presentó en cuanto a unidades logarítmicas, respecto a valores promedio, fueron los biopolímeros (Tabla IV.3), aunque este hecho no es significativamente estadístico por lo que podríamos emplear cualquier Fuente de Carbono sin alterar la maduración de los Bioflocs. Sin embargo, a los 45 días la mejor Fuente de Carbono fue la melaza (Tabla IV.7). En el caso de los Nitrificantes, al inicio del proceso la mejor Fuente de Carbono fue la adición de levadura (Tabla IV.11) mientras que a los 45 días fue la melaza (Tabla IV.15). Esto es de gran interés ya que, al igual que en el presente Trabajo Final de Máster, en un estudio realizado por Khanjani *et al.* (2017) se indicó que en los ensayos en los que se empleó melaza como fuente de carbono el crecimiento fue mejor en comparación con otras fuentes de carbono más complejas como la harina de trigo o el almidón. Sin embargo, no existieron diferencias significativas en cuanto a la eliminación de formas tóxicas del nitrógeno, al igual que en lo que concierne a este trabajo, o respecto a la calidad del

crecimiento del langostino. De hecho, en la Tabla IV.13 se puede observar como la fuente de carbono no resultó ser un factor significativo para la proliferación de Nitrificantes, que son los microorganismos encargados de mejorar la calidad del agua mediante la eliminación de las formas tóxicas del Nitrógeno. A pesar de esto, los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman que, aunque sin diferencias significativas, la melaza es la fuente de carbono que mejores datos de crecimiento permite obtener. Este hecho es de gran interés, ya que la melaza es la fuente carbonada económicamente más rentable de las que han sido utilizadas en los ensayos relativos al presente trabajo.

Como se ha explicado con anterioridad, una de las cualidades más importantes de los Bioflocs es su capacidad para mantener una calidad del agua elevada. Esto se consigue mediante la presencia de microorganismos nitrificantes, debido a que son los encargados de oxidar el amonio para generar nitratos y nitritos. Al inicio de estos ensayos, se pudo observar como la presencia de microorganismos heterótrofos fue mayor en comparación con la presencia de microorganismos nitrificantes (Tablas IV.1-4 y Tablas IV.9-12), este hecho concuerda con los datos aportados por Ahmad *et al.* (2017) y por Dauda *et al.* (2020), ya que en estos estudios se afirmó que los microorganismos heterótrofos son indispensables al inicio de los ensayos con Bioflocs puesto que son los encargados de generar biomasa mediante la que se producirá amonio, que es el sustrato de los microorganismos nitrificantes. Por esta razón, a los 45 días del inicio del ensayo se detectó una mayor cantidad de microorganismos nitrificantes que de heterótrofos. Además, también coincide con el hecho de que en aquellos parámetros nutricionales donde se registró una mayor cantidad de Heterótrofos coincidió con una menor cantidad de Nitrificantes, y viceversa.

IV.2. Estudio del crecimiento microbiano, mediante citometría de flujo, en función de los parámetros nutricionales aportados al sistema acuícola

Se realizó la cuantificación de microorganismos Totales mediante citometría de flujo tanto al inicio del proceso como a los 45 días. Los resultados se recogen en las Tablas IV.17-22 y en las Figuras IV.13-16.

Tabla IV.17. Análisis de Varianza para Totales al inicio del proceso mediante Suma de Cuadrados Tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	P
Efectos Principales					
C/N	0,827663	4	0,206916	1,8	0,164
Fuente de C	0,249567	2	0,124783	1,08	0,3551
Residuos	2,64914	23	0,11518		
Total (corregido)	3,72636	29			

GL: Grado de Libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación).

Figura IV.5. Gráfico de medias para Totales al inicio del proceso. Se ve representada, para cada una de las muestras, la media del logaritmo de las unidades formadoras de colonias por mililitro.

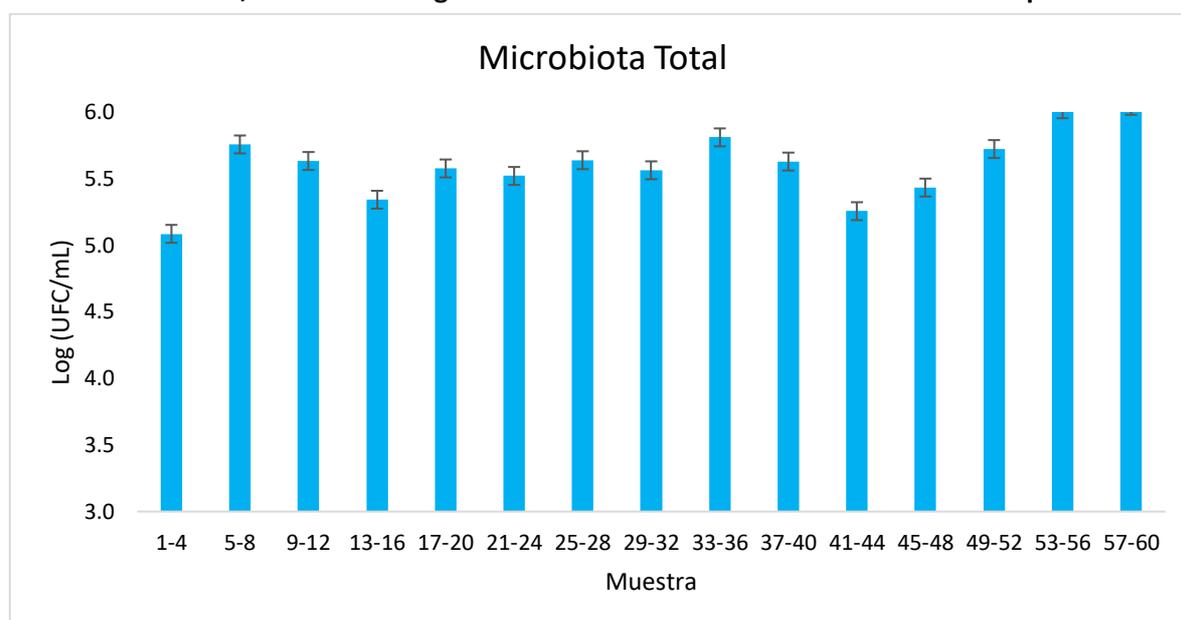


Tabla IV.18. Prueba de rango múltiple para Totales al inicio del proceso para el factor Relación C/N.

C/N	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
10:1	6	5,29017	0,138552	A
14:1	6	5,61289	0,138552	AB
18:1	6	5,64274	0,138552	AB
22:1	6	5,72791	0,138552	B
26:1	6	5,75412	0,138552	B

Tabla IV.19. Prueba de rango múltiple para Totales al inicio del proceso para el factor Fuente de Carbono.

Fuente de C	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
Melaza	10	5,48195	0,107322	A
Levadura	10	5,63547	0,107322	A
Biopolímeros	10	5,69928	0,107322	A

En las Tablas IV.17-19 y en la Figura IV.5 se pueden observar los datos estadísticos procedentes de los resultados obtenidos mediante citometría de flujo para el recuento de microorganismos totales al inicio del proceso. En este caso, ni el factor Relación C/N ni el factor Fuente de Carbono fueron estadísticamente significativos puesto que el valor-P es superior a 0,05 en ambos casos. Debido a esto se podría utilizar como Fuente de Carbono la melaza, debido a su rentabilidad económica, y como relación C/N un valor superior a 10:1, que es el valor que peores resultados mostró.

Tabla IV.20. Análisis de Varianza para Totales a los 45 días del inicio del proceso mediante Suma de Cuadrados Tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	P
Efectos Principales					
C/N	0,00262108	4	0,000655269	0,02	0,9992
Fuente de C	0,0647961	2	0,032398	0,98	0,3924
Residuos	0,660723	20	0,0330362		
Total (corregido)	0,734129	26			

GL: Grado de Libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación).

Tabla IV.21. Prueba de rango múltiple para Totales a los 45 días del inicio del proceso para el factor Relación C/N.

C/N	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
22:1	6	7,33571	0,0742026	A
14:1	5	7,34133	0,0819022	A
10:1	6	7,3473	0,0742026	A
26:1	5	7,35534	0,0819441	A
18:1	5	7,36399	0,0819441	A

Figura IV.6. Gráfico de medias para Totales a los 45 días del inicio del proceso. Se ve representada, para cada una de las muestras, la media del logaritmo de las unidades formadoras de colonias por mililitro.

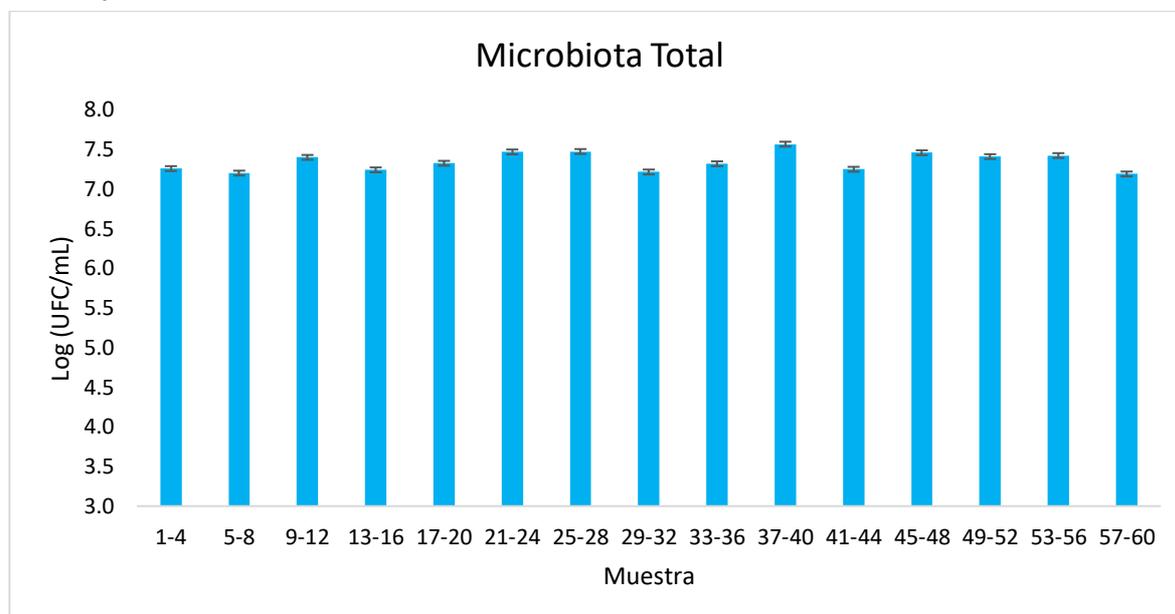


Tabla IV.22. Prueba de rango múltiple para Totales a los 45 días del inicio del proceso para el factor Fuente de Carbono.

Fuente de C	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Melaza	8	7,27615	0,065203	A
Biopolímeros	10	7,38041	0,0574771	A
Levadura	9	7,38963	0,0611254	A

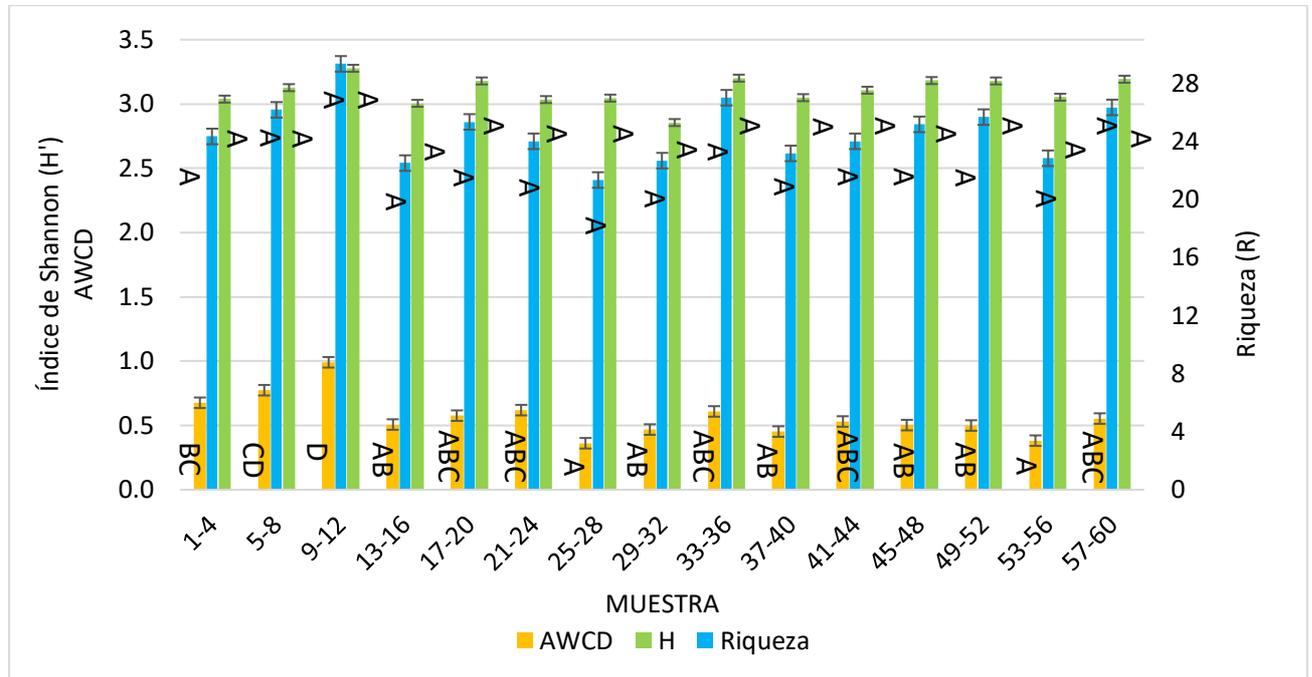
En las Tablas IV.20-22 y en la Figura IV.6 se disponen los datos estadísticos de los microorganismos Totales a los 45 días del inicio del proceso. En estas tablas y figuras se puede apreciar que ningún factor fue estadísticamente significativo en el caso de la totalidad de los microorganismos presentes en las muestras.

En el caso de los recuentos microbianos mediante citometría de flujo, en las Tablas IV.17-19 y en las Tablas IV.20-22 se puede apreciar que, a los 45 días del inicio del proceso se registró una mayor cantidad de microorganismos totales debido a que las unidades logarítmicas se situaron en torno a 7, mientras que al inicio del proceso se situaron en torno a 6. Por otro lado, los recuentos microbianos tanto de Nitrificantes como de Heterótrofos se encontraban en el mismo orden que los recuentos de microorganismos totales con lo cual el porcentaje de viabilidad microbiana resultó ser muy elevado y, a su vez, se confirmó la solidez de los datos obtenidos mediante recuentos microbianos empleando siembras en placas de Petri. Se ha comprobado también, con estos resultados, que los Bioflocs son capaces de estabilizarse y madurar una vez transcurridos los 45 días del inicio del proceso. Cabe destacar que las muestras de Bioflocs analizadas maduraron en ausencia de crías de langostino por lo que la maduración se podría haber acelerado con la incorporación de dichos crustáceos, ya que éstos son capaces de generar aún más materia orgánica.

IV.3. Análisis metabólico de las muestras seleccionadas en función de los parámetros nutricionales aportados

Con los datos obtenidos, una vez procesados los resultados conseguidos mediante las BiologEcoPlates, se elaboró la Figura IV.7 donde se representa el promedio de las seis repeticiones para cada una de las muestras y para cada uno de los índices de biodiversidad funcional estudiados (AWCD, índice de Shannon y Riqueza).

Figura IV.7. Representación gráfica del promedio del AWCD, del promedio del índice de Shannon y del promedio de la riqueza funcional. También se representan, sobre cada una de las barras, los grupos homogéneos (LSD 95%) de cada una de las muestras para cada uno de los índices de biodiversidad. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar, donde n=6.

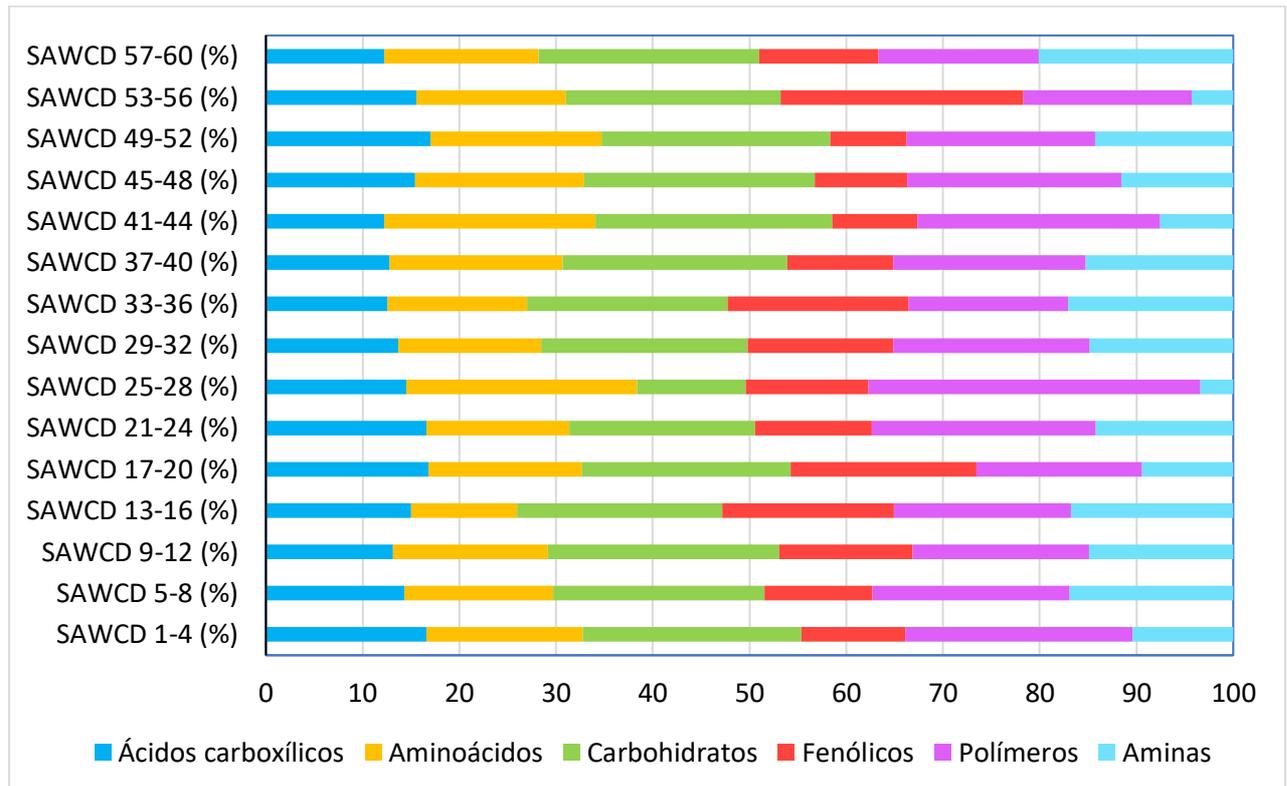


En el presente trabajo, las muestras, de forma general, presentaron un perfil metabólico bastante amplio puesto que, tanto la riqueza funcional, como el AWCD y el índice de Shannon alcanzaron valores elevados. El índice de Shannon varía, normalmente, entre 0,5 y 5, aunque su valor estándar oscila entre 2 y 3, por lo que valores por encima de 3 indican una elevada biodiversidad (Fedor y Zvaríková, 2019). Se puede observar que, en todas las muestras estudiadas, los valores se situaron por encima de 2 e incluso en la mayoría de ellas por encima de 3 (Fig. IV.7) por lo que se puede afirmar que las muestras analizadas exhibieron una elevada biodiversidad. Estos datos coinciden con el estudio realizado por Zhao *et al.* (2022) donde se estudió la diversidad funcional bacteriana presente en tanques acuícolas de cultivo de langostinos, obteniendo unos valores para los índices de Shannon que oscilaron entre 2,646 y 3,235. En el caso del AWCD para el presente trabajo, los datos oscilaron entre 0,2 y 1,2, mostrando que la capacidad metabólica de los microorganismos presentes en las muestras era bastante elevada. Al igual que en el caso del índice de Shannon, los datos obtenidos en el presente trabajo coincidieron con los valores obtenidos en el estudio realizado por Zhao *et al.* (2022) donde el valor más bajo obtenido fue 0,1214 y el más elevado fue 0,85. Debido a esto se pudo afirmar que los resultados obtenidos se encontraban dentro de los límites normales, pero las muestras objeto de estudio, en este caso, presentaron una capacidad metabólica superior debido a que el valor más elevado fue de 1,1842.

Por otro lado, en el estudio estadístico realizado, se pudo observar que el AWCD se vio influenciado por la fuente de carbono (Fig. IV.7), siendo las muestras cultivadas con melaza las que mejores resultados mostraron, así como aquellas relaciones C/N situadas en torno a 10:1 y 14:1. Este

hecho viene en consonancia con lo estudiado en los epígrafes previos de resultados, siendo de gran interés, ya que la melaza fue la fuente de carbono más rentable económicamente y el proceso requiere de menor cantidad de insumos si se emplean relaciones C/N bajas.

En la Figura IV.8 se puede ver la representación gráfica de SAWCD. Esta representación es muy clarificadora a la hora de observar, de forma visual, qué tipo de sustrato presentan mayor afinidad con las muestras analizadas.



Según los datos recogidos en esta gráfica (Fig. IV.8) se puede afirmar, de forma general, que los compuestos fenólicos y las aminas fueron los sustratos por los que las muestras presentaron una menor afinidad. En contraposición, los ácidos carboxílicos y los carbohidratos fueron más sencillos de descomponer para nuestros microorganismos. Los aminoácidos y los polímeros también presentaron unos elevados valores en cuanto a afinidad. Todo ello se asemeja con los datos antes comentados debido a que la capacidad metabólica medida por desarrollo de color (AWCD) y los índices de Shannon demostraron que existió una gran capacidad degradadora debido a una elevada biodiversidad presente en las muestras. En este sentido, en el estudio antes mencionado realizado por Zhao *et al.* (2022), se pudo observar como los carbohidratos y los ácidos carboxílicos fueron los compuestos con mayor porcentaje de afinidad y los fenólicos y las aminas, los de menor afinidad, existiendo muestras con un 0% de afinidad por estas últimas, por lo que este estudio corrobora los datos obtenidos en el presente TFM. Por otro lado, estudios previos han obtenido resultados donde la comunidad microbiana presente en las muestras de agua procedentes de cultivos de langostinos tenía mayor afinidad por polímeros, carbohidratos y ácidos carboxílicos. Estos resultados sugieren que, un elevado nivel de acumulación de nitrógeno puede conducir a la microbiota a usar, de forma preferente, este tipo de compuestos para equilibrar la relación C/N (Zhao *et al.*, 2021). Además, la elevada afinidad por

los ácidos carboxílicos, es debida a que la mayor parte de la microbiota presente en muestras de Bioflocs se asocia al phylum *Proteobacteria* (Zhou, 2020) y los microorganismos de este grupo microbiano presentan la maquinaria enzimática necesaria para procesar este tipo de sustratos. En definitiva, el elevado potencial degradativo que presenta el microbioma del Biofloc, refuerza la idea de que el mantenimiento de éste es relativamente sencillo y económico, y posibilita la creación de una base microbiana que sirve al langostino como fuente importante de nutrientes, que reduce la elevada dependencia de piensos tradicionales, implantando modelos claros de economía circular sostenibles en el tiempo para la acuicultura intensiva.

V. Conclusiones

- 1- El proceso de formación de Bioflocs maduros es un proceso dinámico en el que la microbiota se ve modificada con el paso del tiempo de forma que al inicio del ensayo la cantidad de microorganismos heterótrofos marinos es superior en comparación con la cantidad de microorganismos nitrificantes. Esto es debido a que la microbiota nitrificante necesita de las formas amoniacales originadas debido a la actividad heterótrofa.
- 2- La biodiversidad de las muestras de Biofloc estudiadas es elevada independientemente de los parámetros nutricionales aportados a cada uno de los tanques, ya que los índices de biodiversidad metabólica superan el valor umbral en todos y cada uno de los casos analizados, lo que refleja la elevada complejidad e interdependencia de comunidades existentes en el microbioma del Biofloc.
- 3- Los Bioflocs maduros presentaron una elevada carga microbiana nitrificante. Este hecho es fundamental debido a que son los microorganismos los encargados de mantener la calidad del agua gracias a la eliminación de las formas tóxicas del nitrógeno, que, en caso contrario, se acumularían en los tanques de producción debido a la actuación metabólica de los heterótrofos marinos.
- 4- La relación C/N óptima varía en función del momento del ensayo. Sin embargo, cuando no existen diferencias estadísticamente significativas lo óptimo es trabajar aplicando relaciones C/N bajas, en torno a 10:1 o 14:1, para aumentar la eficiencia del proceso.
- 5- De forma general, todas las fuentes de carbono del estudio fueron asimilables por la microbiota que compone los Bioflocs debido a que presenta una gran capacidad de degradación de sustratos carbonados por su elevada biodiversidad metabólica. Sin embargo, a los 45 días del proceso, la melaza potencia el contenido en heterótrofos en los Bioflocs analizados. Este hecho es de gran interés, además, porque la melaza supone la fuente de carbono más rentable económicamente para estos sistemas de producción.

VI. Financiación

La realización del presente Trabajo Final de Máster 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 langostino”, que ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (PID2020-114574RB-C21). Este proyecto se ha realizado en colaboración con la Universidad Politécnica de Valencia.

VII. Bibliografía

- Ahmad, I., Rani, A. M. B., Verma, K., Maqsood, M., 2017. Biofloc technology: an emerging avenue in aquatic animal healthcare and nutrition. *Aquaculture International* 25: 1215–1226.
- Ajadi, A., Sabri, M. Y., Dauda, A. B., Ina-Salwany, M. Y., Haslisa, A. H., 2016. Immunoprophylaxis: a better alternative protective measure against shrimp vibriosis – a review. *PJSRR* 2: 58–69.
- Arnold, S. J., Sellars, M. J., Crocos, P. J., Coman, G. J., 2005. Response of juvenile brown tiger shrimp (*Penaeus esculentus*) to intensive culture conditions in a flow through tank system with threedimensional artificial substrate. *Aquaculture* 246: 231–238.
- Avnimelech, Y., 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture* 264: 140–147.
- Avnimelech, Y., 2012. *Biofloc Technology. A Practical Guide Book*, 2nd ed. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- Avnimelech, Y., 2015. *Biofloc Technology—A Practical Guide Book*, 3rd ed.; The World Aquaculture Society: Baton Rouge, LA, USA.
- Belton, B., Reardon, T., Zilberman, D., 2020. Sustainable commoditization of seafood. *Natural Sustainability*, 3, 677–684.
- Betiku, O. C., Yeoman, C. J., Gibson Gaylord, T., Duff, G. C., Hamerly, T., Bothner, B., Block, S. S., Sealey, W. M., 2017. Differences in amino acid catabolism by gut microbes with/without prebiotics inclusion in GDDY-based diet affect feed utilization in rainbow trout. *Aquaculture*, 490, 108–119.
- Bossier, P., Ekasari, J., 2017. Biofloc technology application in aquaculture to support sustainable development goals. *Microbial Biotechnology* 10: 1012–1016.
- Bostock, J., Lane, A., Hough, C., Yamamoto, K., 2016. An assessment of the economic contribution of EU aquaculture production and the influence of policies for its sustainable development. *Aquaculture International*. 24, 699-733.

- Boyd, C. E., 2018. Aquaculture pond fertilization. *CAB Reviews*, 13, 1–12.
- Boyd, C. E., D’Abramo, L. R., Glencross, B. D., Huyben, D. C., Juárez, L. M., Lockwood, G. S., McNevin, A. A., Tacon, A. G. J., Teletchea, F., Tomasso, J. R., Tucker, C. S., Valenti, W. C., 2020. Achieving sustainable aquaculture: Historical and current perspectives and future needs and challenges. *World Aquaculture Society*. 51, 578-633.
- Chapin, F. S., Kofinas, G. P., Folke, C., 2009. *Principles of ecosystem stewardship*. New York, NY: Springer.
- Chen, Z., Ge, H. X., Chang, Z. Q., Song, X. F., Zhao, F. Z., Li, J., 2018. Nitrogen Budget in Recirculating Aquaculture and Water Exchange Systems for Culturing *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Ocean University of China*, 17, 905–912.
- Clarke, R., Bostock, J., 2017. *Regional Review on Status and Trends in Aquaculture Development in Europe, 2015*. FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1135/1.
- Crab, R., Kochva, M., Verstraete, W., Avnimelech, Y., 2009. Bio-flocs technology application in overwintering of tilapia. *Aquacultural Engineering* 40, 105–112.
- Crab, R., Chielens, B., Wille, M., Bossier, P., Verstraete, W., 2010. The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. *Aquaculture Research* 41, 559–567.
- Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W., 2012. Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. *Aquaculture* 356, 351–356.
- Dai, W.F., Zhang, J.J., Tu, Q.C., Deng, Y., Qiu, Q.F., Xiong, J.B., 2017. Bacterioplankton assembly and interspecies interaction indicating increasing coastal eutrophication. *Chemosphere* 177, 317–325.
- Dauda, A. B., Romano, N., Ebrahimi, M., Karim, M., Natrah, I., Kamarudin, M. S., Ekasari, J., 2017. Different carbon sources affected biofloc volume, water quality and the survival and physiology of African Catfish *Clarias gariepinus* fingerlings reared in intensive biofloc technology system. *Fisheries Science* 83, 1037–1048.
- Dauda, A. B., 2020. Biofloc technology: a review on the microbial interactions, operational parameters and implications to disease and health management of cultured aquatic animals. *Reviews in Aquaculture* 12, 1193-1210.

- De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., Verstraete, W., 2008. The basics of bioflocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture* 277, 125–137.
- Dimitroglou, A., Reynolds, P., Ravnoy, B., & Johnsen, F., Sweetman, F., Johansen, W., & Davies, S. J. (2011). The effect of mannan oligosaccharide supplementation on Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.) fed diets with high levels of plant proteins. *Journal of Aquaculture Research and Development*, 1.
- Edwards, P., Zhang, W., Belton, B., Little, D. C., 2019. Misunderstandings, myths, and mantras in aquaculture: Its contribution to world food supplies has been systematically over reported. *Marine Policy*, 106, 103547.
- Ekasari, J., Angela, D., Waluyo, S.H., Bachtiar, T., Surawidjaja, E.H., Bossier, P., De Schryver, P., 2014. The size of biofloc determines the nutritional composition and the nitrogen recovery by aquaculture animals. *Aquaculture*. 426, 105–111.
- Emerenciano, M., Gaxiola, G., Cuzon, G., 2013. Biofloc technology (BFT): a review for aquaculture application and animal food industry. In: *Biomass Now – Cultivation and Utilization* pp 1-28.
- Esparza-Leal, H. M., Ponce-Palafox, J. T., Alvarez-Ruiz, P., López-Álvarez, E. S., Vázquez-Montoya, N., López-Espinoza, M., Montoja-Mejía, 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 biofloc in intensive nursery phase. *Aquaculture International* 1–11.
- FAO, 2018. The state of world fisheries and aquaculture: Meeting The sustainable development goals (p, 227).
- Faust, K., Lahti, L., Gonze, D., de Vos, W.M., Raes, J., 2015. Metagenomics meets time series analysis: unraveling microbial community dynamics. *Current Opinion in Microbiology* 25, 56–66.
- Fedor, P., Zvaríková, M., 2019. Biodiversity Indices. University of Bratislava. *Encyclopedia of Ecology (Second Edition)* 1, 337-346.
- Feigl, V., Ujaczki, É., Vaszita, E., Molnár, M., 2017. Influence of red mud on soil microbial communities: Application and comprehensive evaluation of the Biolog EcoPlate approach as a tool in soil microbiological studies. *Science of the Total Environment* 595, 903-911.
- Giatsis, C., Sipkema, D., Smidt, H., Heilig, H., Benvenuti, G., Verreth, J., Verdegem, M., 2015. The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. *Scientific Reports* 5, 18206.

- Hamilton, S., 2013. Assessing the Role of Commercial Aquaculture in Displacing Mangrove Forest. *Bulletine of Marine Science*, 89, 585–601.
- Han, S., Wang, B., Wang, M., Liu, Q., Zhao, W., Wang, L., 2017. Effects of ammonia and nitrite accumulation on the survival and growth performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Invertebrate Survival Journal* 2017, 14, 221–232.
- Hargreaves, J. A., 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacultural Engineering* 34: 344–363.
- Hatje, V., de Souza, M. M., Ribeiro, L. F., Eca, G. F., Barros, F., 2016. Detection of environmental impacts of shrimp farming through multiple lines of evidence. *Environmental Pollution*, 219, 672–684.
- Hostins, B., Braga, A., Lopes, D. L. A., Wasielesky, W., Poersch, L. H., 2015. Effect of temperature on nursery and compensatory growth of pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* reared in a super-intensive biofloc system. *Aquacultural Engineering* 66: 62–67.
- Huang, L., Guo, H., Chen, C., Huang, X., Chen, W., Bao, F., Liu, W., Wang, S., Zhang, D., 2020. The bacteria from large-sized bioflocs are more associated with the shrimp gut microbiota in culture system. *Aquaculture*, 523, 735159.
- Joffre, O. M., Klerkx, L., Khoa, T. N. D., 2018. Aquaculture innovation system analysis of transition to sustainable intensification in shrimp farming. *Agronomy for Sustainable Development*, 38, 34.
- Kamada, N., Chen, G.Y., Inohara, N., Núñez, G., 2013. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nature Immunology* 14, 685.
- Khanjani, M. H., Sajjadi, M. M., Alizadeh, M., Sourinejad, I., 2017. Nursery performance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) cultivated in a biofloc system: the effect of adding different carbon sources. *Aquaculture Research* 48: 1491–1501.
- Kim, S. K., Pang, Z., Seo, H. C., Cho, Y. R., Samocha, T., Jan, I. K., 2014. Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture Research* 45, 362–371.
- Liu, G., Zhu, S., Liu, D., Guo, X., Ye, Z., 2017. Effects of stocking density of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) on immunities, antioxidant status, and resistance against *Vibrio harveyi* in a biofloc system. *Fish & Shellfish Immunology* 67, 19–26.
- Luminex Muse Documentation. <https://www.luminexcorp.com/eu/muse/#documentation>

- Ma, Z., Song, X.F., Wan, R., Gao, L., 2013. A modified water quality index for intensive shrimp ponds of *Litopenaeus vannamei*. *Ecological Indicators*. 24, 287–293.
- Malone, R., 2013. *Recirculating Aquaculture Tank Production Systems: A Review of Current Design Practice*. Southern Regional Aquaculture Center, USA.
- Martins, G. B., Tarouco, F., Rosa, C. E., Robaldo, R. B., 2017. The utilization of sodium bicarbonate, calcium carbonate or hydroxide in biofloc system: water quality, growth performance and oxidative stress of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 468: 10–17.
- Muhammad, H., Situmorang, M. L., Djohan, Y. A., Aditiawati, P., Suantika, G., 2016. Biological, technical, and financial feasibilities study of zero water discharge (ZWD) system application in low salinity white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone) urban aquaculture, study case: Gresik District, East Java, Indonesia. *Journal of Fisheries & Livestock Production*, 4, 197.
- Murray, F., Bostock, J., Fletcher, D., 2014. *Review of Recirculation Aquaculture System Technologies and Their Commercial Application*. Stirling Aquaculture, University of Stirling, UK.
- Navarrete, P., Tovar-Ramírez, D., 2014. Use of yeasts as probiotics in fish aquaculture. In M. Hernandez-Vergara, *Sustainable aquaculture techniques* (pp. 135–172). Rijeka, Croatia: InTech.
- Nguyen, T. A. T., Nguyen, K. A. T., Jolly, C., 2019. Is Super-Intensification the Solution to Shrimp Production and Export Sustainability? *Sustainability* 11, 5277.
- Ortiz, L. T., Rebolé, A., Velasco, S., Rodríguez, M. L., Treviño, J., Tejedor, J. L., & Alzueta, C., 2013. Effects of inulin and fructooligosaccharides on growth performance, body chemical composition and intestinal microbiota of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition*, 19, 475–482.
- Perez, K. R., 2006. *Fishing for gold*. Tuscaloosa, AL: The University of Alabama Press.
- Ponce-Palafox, J. T., Alcalá, A., Mendoza, D. G., Arredondo-Figueroa, J. L., Lango-Reynoso, F., Castañeda-Chávez, M. R., Esparza-Leal, H., Ruiz-Luna, A., Páez-Ozuna, F., Castillo-Vargasmachuca, S. G., Peraza-Gómez, V., 2019. Response Surface analysis of temperatura-salinity interaction effects on water quality, growth and survival of shrimp *Penaeus vannamei* postlarvae raised in biofloc intensive nursery production. *Aquaculture* 503, 312-321.
- Rajkumar, M., Pandey, P. K., Aravind, R., Vennila, A., Bharti, V., Purushothaman, C. S., 2016. Effect of different biofloc system on water quality, biofloc composition and growth performance in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture Research* 47: 3432–3444.

- Ran, C., Huang, L., Liu, Z., Xu, L., Yang, Y., Tacon, P., Auclair, E., Zhou, Z., 2015. A comparison of the beneficial effects of live and heat-inactivated baker's yeast on Nile Tilapia: Suggestions on the role and function of the secretory metabolites released from the yeast. 10(12).
- Ray, A. J., Lewis, B. L., Browdy, C. L., Leffer, J. W., 2010. Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. *Aquaculture*, 299, 89–98.
- Ringo, E., Salinas, I., Olsen, R., Nyhaug, A., Myklebust, R., Mayhew, T., 2007. Histological changes in intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following in vitro exposure to pathogenic and probiotic bacterial strains. *Cell and Tissue Research*, 328, 109–116.
- Ringo, E., Olsen, R. E., Vecino, J. G., Wadsworth, S., Song, S. K., 2012. Use of immunostimulants and nucleotides in aquaculture: A review. *Journal of Marine Science: Research and Development*, 2(1), 104.
- Ringo, E., Hossein, S., Ghosh, K., Doan, H. V., Beck, B. R., Song, S., 2018. Lactic acid bacteria in finfish—An update. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1818.
- 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*, 1–22.
- Rodríguez, A., Mau, S., Piedra, L., Jiménez, R., Herrera, J. P., 2017. Isolation of ammonium- and nitrite-oxidizing bacterial strains from soil, and their potential use in the reduction of nitrogen in household waste water. *International Journal of Tropical Biology*, 65 (4), 1527-1539.
- Romano, N., Dauda, A. B., Ikhsan, N., Karim, M., Kamarudin, M. S., 2018. Fermenting rice bran as a carbon source for biofloc technology improved the water quality, growth, feeding efficiencies and biochemical composition of African catfish *Clarias gariepinus* juveniles. *Aquaculture Research* 49, 3691–3701.
- Rooks, M.G., Garrett, W.S., 2016. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nature Reviews Immunology*, 16, 341.
- Sala, M.M., Arrieta, J.M., Boras, J.A., Duarte, C.M., Vaqué, D., 2010. The impact of ice melting on bacterioplankton in the Arctic Ocean. *Polar Biology*. 33(12), 1683-1694.
- Samocha, T. M., Prangnell, D. I., Hanson, T. R., Treece, G. D., Morris, T. C., Castro, L. F., Staresinic, N., 2017. Design and Operation of Super Intensive, Biofloc-Dominated Systems for Indoor

Production of the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*—The TexasA&MAgriLife Research Experience; TheWorld Aquaculture Society: Baton Rouge, LA.

- Schweitzer, R., Arantes, R., Costodio, P. F. S., Santo, C. M. D., Arana, L. V., Seiffert, W. Q., Andreatta, E. R., 2013. Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. *Aquacultural Engineering*, 56, 59–70.
- Semova, I., Carten, J.D., Stombaugh, J., Mackey, L.C., Knight, R., Farber, S.A., Rawls, J.F., 2012. Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish. *Cell Host Microbe*. 12, 277–288.
- Sinha, A. K., Baruah, K., Bossier, P., 2008. Horizon scanning: the potential use of biofloc as an anti-infective strategy in aquaculture – an overview. *Aqua Health International* 13: 8–10.
- Situmorang, M. L., Suantika, G., Santoso, M., Khakim, A., Wibowo, I., Aditiawati, P., Haniswita, 2020. Poly- β -Hydroxybutyrate (PHB) improves nursery-phase Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* defense against vibriosis. *North American Journal of Aquaculture*, 82(1), 108–114.
- Suantika, G., Turendro, O. R., & Situmorang, M. L., 2017. Use of nitrifying bacteria for promoting giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) nursery phase in indoor system. *Journal of Fisheries & Livestock Production*, 5(2), 228.
- Suantika, G., Situmorang, M. L., Nurfathurahmi, A., Taufik, I., Aditiawati, P., Yusuf, N., Aulia, R., 2018. Application of indoor recirculation aquaculture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei* grow-out super-intensive culture at low salinity condition. *Journal of Aquaculture Research and Development*, 9, 1–6.
- Suantika, G., Situmorang, M. L., Saputra, F. I., Putri, S. L. E., Putri, S. P., Aditiawati, P., Fukusaki, E., 2020. Metabolite profiling of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* from super-intensive culture in closed aquaculture systems: a recirculating aquaculture system and a hybrid zero water discharge–recirculating aquaculture system. *Metabolomics*, 16 (49).
- Thitamadee, S., Prachumwat, A., Srisala, J., Jaroenlak, P., Salachan, P. V., Sritunyalucksana, K., Flegel, T. W., Itsathitphaisarn, O., 2016. Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture*, 452, 69–87.
- Thong, P. Y., 2014. Biofloc technology in shrimp farming: success and failure. *Aquaculture Asia Pacific Magazine* 10: 13–16.

- Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M. J., Montero, D., Ginés, R., Sweetman, J., Izquierdo, M., 2011. Improved feed utilization, intestinal mucus production and immune parameters in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). *Aquaculture Nutrition*, 17, 223–233.
- Torrecillas, S., Montero, D., Izquierdo, M., 2014. Improved health and growth of fish fed mannan oligosaccharides: Potential mode of action. *Fish & Shellfish Immunology*, 36, 525–544.
- Tucker, C. S., Hargreaves, J. A., 2012. Freshwater ponds. In J. Tidwell (Ed.), *Aquaculture production methods* (pp. 191–244). Ames, IA: Wiley-Blackwell Publishing.
- Tucker, C. S., Brune, D. E., Torrans, E. L., 2014. Partitioned pond aquaculture systems. *World Aquaculture*, 45(2), 9–17.
- Ventola, C. L., 2015. The antibiotic resistance crisis, Part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics* 40: 277–283.
- Vlaeminck, S.E., Terada, A., Smets, B.F., De Clippeleir, H., Schaubroeck, T., Bolca, S., Demeestere, L., Mast, J., Boon, N., Carballa, M., 2010. Aggregate size and architecture determine microbial activity balance for one-stage partial nitrification and anammox. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 900–909.
- Wang, X.H., Li, J., Liu, R., Hai, R.T., Zou, D.X., Zhu, X.B., Luo, N., 2017. Responses of bacterial communities to CuO nanoparticles in activated sludge system. *Environmental Science and Technology*. 51, 5368–5376.
- Wasielensky, W., Froes, C., Froes, G., Krummenauer, D., Lara, G., Poersch, L., 2013. Nursery of *Litopenaeus vannamei* reared in a biofloc system: the effect of stocking densities and compensatory growth. *Journal of Shellfish Research* 32: 799–806.
- Wei, C.L., Zeng, Y.H., Tang, K.X., Jiao, N.Z., 2009. Comparison of bacterioplankton communities in three mariculture ponds farming different commercial animals in subtropical Chinese coast. *Hydrobiologia* 632, 107–126.
- Wei, Y. F., Liao, S. A., Wang, A. L., 2016. The effect of different carbon sources on the nutritional composition, microbial community and structure of bioflocs. *Aquaculture* 465: 88–93.
- World Commission on Environment and Development, 1987. *Our common future*. Oxford, England: Oxford University Press.

- Xiong, J.B., Zhu, J.Y., Dai, W.F., Dong, C.M., Qiu, Q.F., Li, C.H., 2017. Integrating gut microbiota immaturity and disease-discriminatory taxa to diagnose the initiation and severity of shrimp disease. *Environmental Microbiology*. 19, 1490–1501.
- Xu, W. J., Pan, L. Q., 2013. Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. *Aquaculture* 412–413: 117–124.
- Xu, W. J., Pan, L. Q., 2014. Dietary protein level and C/N ratio manipulation in zero-exchange culture of *Litopenaeus vannamei*: Evaluation of inorganic nitrogen control, biofloc composition and shrimp performance. *Aquaculture Research* 45: 1842–1851.
- 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.
- Zhang, K., Pan, L., Chen, W., Wang, C., 2017. Effect of using sodium bicarbonate to adjust the pH to different levels on water quality, the growth and the immune response of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in zero-water exchange biofloc-based culture tanks. *Aquaculture Research* 48, 1194–1208.
- Zhao, D., Pan, L., Huang, F., Wang, C., Xu, W., 2016. Effects of different carbon sources on bioactive compound production of biofloc, immune response, antioxidant level, and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange culture tanks. *Journal of the World Aquaculture Society* 47, 566–576.
- Zhao, Q., Zhou, K., Zhang, F., Zhao, Y., Sun, H., Xie, F., 2021. Effect of aquaculture water eutrophication on color development in Biolog EcoPlates. *Aquaculture International* 29 (1), 373–386.
- Zhao, Q., Xie, F., Zhang, F., Zhou, K., Sun, H., Zhao, Y., Yang, Q., 2022. Analysis of bacterial community functional diversity in late-stage shrimp (*Litopenaeus vannamei*) ponds using Biolog EcoPlates and PICRUSt2. *Aquaculture* 546, 737288.
- 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.
- Zhu, Z. M., Lin, X. T., Pan, J. X., Xu, Z. N., 2016. Effect of cyclical feeding on compensatory growth, nitrogen and phosphorus budgets in juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research* 47, 283–289.

