



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PHYTOBUTYRIN EN LA
MICROBIOTA Y LA CALIDAD DEL AGUA DE UN SISTEMA DE

CULTIVO BIOFLOC

T E S I S

PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

Manuel Jacob Casariego Martínez

Ensenada, Baja California, México

Junio 2024

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PHYTOBUTYRIN EN LA
MICROBIOTA Y LA CALIDAD DEL AGUA DE UN SISTEMA DE
CULTIVO BIOFLOC

PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

Presenta

Manuel Jacob Casariego Martínez

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

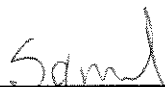
EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PHYTOBUTYRIN EN LA MICROBIOTA Y LA
CALIDAD DEL AGUA DE UN SISTEMA DE CULTIVO BIOFLOC

PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

Presenta

Manuel Jacob Casariego Martínez

Aprobada por:



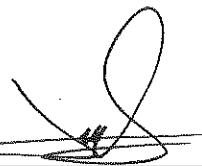
Dr. Samuel Sánchez Serrano

Director de tesis



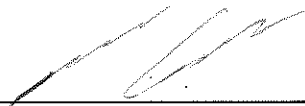
Dr. André Luiz Braga de Souza

Co - director



Dr. Ernesto Larios Soriano

Sinodal



Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza

Sinodal



Dr. Fernando Barreto Curiel

Sinodal

**Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Maestría**

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Giffard:

Me dirijo a usted en mi calidad de **Sinodal** encargado de revisar la tesis de Maestría presentada por el estudiante **Manuel Jacob Casariego Martínez**, como parte de los requisitos para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi **Voto Aprobatorio** sobre la tesis titulada:

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PHYTOBUTYRIN EN LA MICROBIOTA Y LA CALIDAD DEL AGUA DE UN SISTEMA DE CULTIVO BIOFLOC.

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 16 de mayo de 2024

Atentamente,



Dr. Ernesto Larios Soriano
Sinodal

c.c.p. Expediente

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo de tesis de grado de Maestría

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Giffard:

Me dirijo a usted en mi calidad de **Director de Tesis** encargado de revisar la tesis de Maestría presentada por el estudiante **Manuel Jacob Casariego Martínez**, como parte de los requisitos para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi **Voto Aprobatorio** sobre la tesis titulada:

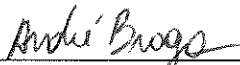
EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PHYTOBUTYRIN EN LA MICROBIOTA Y LA CALIDAD DEL AGUA DE UN SISTEMA DE CULTIVO BIOFLOC.

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, las referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 16 de mayo de 2024

Atentamente,



Dr. André Luiz Braga de Souza
Co-Director de Tesis

c.c.p. Expediente

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Maestría

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Giffard:

Me dirijo a usted en mi calidad de Director de Tesis encargado de revisar la tesis de Maestría presentada por el estudiante Manuel Jacob Casariego Martínez, como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi **Voto Aprobatorio** sobre la tesis titulada:

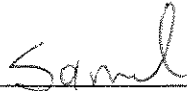
EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PHYTOBUTYRIN EN LA MICROBIOTA Y LA CALIDAD DEL AGUA DE UN SISTEMA DE CULTIVO BIOFLOC.

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 16 de mayo de 2024

Atentamente,



Dr. Samuel Sánchez Serrano
Director de Tesis

c.c.p. Expediente

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Maestría

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Giffard:

Me dirijo a usted en mi calidad de **Sinodal** encargado de revisar la tesis de Maestría presentada por el estudiante **Manuel Jacob Casariego Martínez**, como parte de los requisitos para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi **Voto Aprobatorio** sobre la tesis titulada:

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PHYTOBUTYRIN EN LA MICROBIOTA Y LA CALIDAD DEL AGUA DE UN SISTEMA DE CULTIVO BIOFLOC.

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 16 de mayo de 2024

Atentamente,



Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza
Sinodal

c.c.p. Expediente

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Maestría

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Giffard:

Me dirijo a usted en mi calidad de **Sinodal** encargado de revisar la tesis de Maestría presentada por el estudiante **Manuel Jacob Casariego Martínez**, como parte de los requisitos para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi **Voto Aprobatorio** sobre la tesis titulada:


EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PHYTOBUTYRIN EN LA MICROBIOTA Y LA CALIDAD DEL AGUA DE UN SISTEMA DE CULTIVO BIOFLOC.

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 16 de mayo de 2024

Atentamente,



Dr. Fernando Barreto Curiel
Sinodal

c.c.p. Expediente

Resumen de tesis para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA que presenta Manuel Jacob Casariego Martínez, como requisito parcial para su titulación en la Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada, Baja California, México. Marzo 2024

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PHYTOBUTYRIN EN LA MICROBIOTA Y LA CALIDAD DEL AGUA DE UN SISTEMA DE CULTIVO BIOFLOC

Resumen aprobado por:

Dr. Samuel Sánchez Serrano

Dr. André Luiz Braga de Souza

Los fitogénicos son extractos de plantas que se utilizan en la dieta de los animales de consumo, debido a los beneficios que presentan, como son: antiestrés, antimicrobianos, antioxidantes y promotores de crecimiento lo que en conjunto ayuda al bienestar de los organismos cultivados, sin embargo, el uso de fitogénicos con propiedades antimicrobianas en conjunto con sistemas de producción biofloc es un tema poco explorado, por lo que en este trabajo se evaluó el efecto que tiene el Phytobutyryn en la microbiota y su influencia en la calidad del agua de un sistema de cultivo BFT expuesto a distintas concentraciones de Phytobutyryn tanto de manera crónica como aguda. El diseño experimental fue de 1 factor y 4 niveles (C, T1, T2 y T3), en donde se añadieron 0, 0.5, 1 y 2 mg Kg⁻¹ de Phytobutyryn respectivamente directamente al sistema. Se utilizaron 12 unidades experimentales de 19L (23 x 23 x 15 cm) en donde se mantuvieron constantes la temperatura, el oxígeno disuelto y la salinidad y se evaluó la concentración de amonio, nitrito y nitrato, así como el pH y la alcalinidad del biofloc, se evaluó la normalidad de los datos con una prueba de Shapiro-

Wilk y para evaluar los datos obtenidos de la calidad del agua de cada una de las unidades experimentales se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), y si se encontraban diferencias significativas se realizó una prueba de Tukey. Para evaluar la estructura de la comunidad bacteriana, se tomó una muestra de cada unidad experimental y se extrajo el ADN metagenómico, y se secuenciaron los genomas completos. Se descartaron las secuencias de baja calidad ($Q < 30$) y se realizó la asignación taxonómica utilizando la herramienta KAIJU y la base de datos del NCBI. Se evaluó la riqueza, abundancia y diversidad α de especies de cada una de las unidades experimentales, para después evaluar la diversidad β para buscar diferencias entre las comunidades. Se encontraron diferencias significativas en el consumo de alcalinidad en el T3, pero no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la concentración de amonio (2.6 ± 0.6), nitrito (0.3 ± 0.3) y nitrato (80.1 ± 46.0), así como en el pH (7.9 ± 0.1) de las unidades experimentales. No se encontraron diferencias significativas en la riqueza de especies ($11,803 \pm 2482$) o la diversidad α de especies (6.754 ± 0.04) mientras que los análisis de diversidad β indican que la microbiota presente en los distintos tratamientos es similar ($p > 0.05$) y el PCoA indicó que las diferencias encontradas no fueron provocadas por el efecto de Phytobutyryn (stress = 0.0014). Se concluye que el fitogénico Phytobutyryn no provocó cambios significativos en la microbiota del biofloc, en donde se mantuvieron los principales phylums bacterianos, lo cual permite al sistema mantener una buena calidad del agua.

Palabras clave: Fitogénicos, Biofloc, Microbiota

Phytogenics are plant extracts used in the diet of livestock animals due to their beneficial properties, such as anti-stress, antimicrobial, antioxidant, and growth-promoting effects, which collectively contribute to the well-being of cultured organisms. However, the use of phytogenics with antimicrobial properties in conjunction with biofloc production systems is an underexplored area. Therefore, this study evaluated the effect of Phytobutylin on the microbiota and its influence on water quality in a Biofloc Technology (BFT) cultivation system exposed to different concentrations of Phytobutylin, both chronically and acutely. The experimental design involved a single factor with four levels (C, T1, T2, and T3), where 0, 0.5, 1, and 2 mg Kg⁻¹ of Phytobutylin were added directly to the system, of each experimental unit. Twelve experimental units of 19L (23 x 23 x 15 cm) were used, maintaining constant temperature, dissolved oxygen, and salinity. The concentrations of ammonia, nitrite, and nitrate, as well as pH and alkalinity of the biofloc, were evaluated. Normality of the data was assessed using the Shapiro-Wilk test, and one-way analysis of variance (ANOVA) was performed to evaluate water quality data from each experimental unit. If significant differences were found, a Tukey test was conducted to analyze the differences. To assess the community structure, a sample was taken from each experimental unit, and metagenomic DNA was extracted and sequenced. Low-quality sequences (Q < 30) were discarded, and taxonomic assignment was performed using the KAIJU tool and the NCBI database. Richness, abundance, and α diversity of species in each experimental unit were evaluated, followed by β diversity analysis to identify differences between communities. Significant differences were found in alkalinity consumption in T3, but no significant differences ($p > 0.05$) were observed in the concentrations of ammonia (2.6 ± 0.6), nitrite (0.3 ± 0.3), and nitrate (80.1 ± 46.0), as well as pH (7.9 ± 0.1) of the experimental units. No significant differences were found in species richness ($11,803 \pm 2482$) or α diversity (6.754 ± 0.04), while β diversity analyses indicated that the microbiota present in different treatments were similar ($p > 0.05$). Principal Coordinates Analysis (PCoA) indicated that the

differences found were not caused by the effect of Phytobutylin (stress = 0.0014). In conclusion, Phytobutylin did not induce significant changes in the biofloc microbiota, maintaining the major bacterial phyla, thereby allowing the system to maintain good water quality.

Key words: Phytogenics, Biofloc, Microbiota

Dedicatoria

A mi Papá y Lula que no pudieron venir.

A mi mamá, y mis hermanas Lore y Pau, las quiero mucho, a las tres, las amo.

“Si necesitas algo que adorar
Entonces adora la vida -- toda la vida
cada pequeña parte de ella
Estamos todos en esta belleza juntos”

Frank Herbert.

Agradecimientos

Al posgrado en ciencias en oceanografía costera de la Universidad Autónoma de Baja California. Así como al conahcyt por la beca de maestría (N° 1139384) para realizar mis estudios de maestría.

Agradezco a mis tutores Doctor Samuel Sánchez Serrano, Doctor André Luíz Braga de Souza, Doctor Ernesto Larios Soriano, Doctor Fernando Barreto Curiel, y el Doctor Mario Alberto Galaviz Espinoza, por sus enseñanzas, tiempo y compromiso con este proyecto de tesis.

A todos los amigos con los que tuve la suerte de coincidir en Ensenada y que ayudaron a que Ensenada se volviera un hogar para mí. Kevin y Liz, David, Edu, Álvaro, Poncho, Arantxa, Ricardo, Ángel, Susy, Erika y Oscar por abrirme las puertas de su casa en donde siempre encontré un hogar acogedor.

A mis amigos y compañeros de la UABC que compartieron su cultura y su cariño, Juan, Wilson, Alex, Lalo, Tatiana, Marce, Ari y Pere.

A la comunidad estudiantil de CICESE que me recibió como un amigo más.

Y a la familia que a la distancia siempre se hizo presente, que me ayudaron a navegar días lluviosos y noches oscuras. A los que me visitaron en Ensenada y los que mandaban donas en días especiales. Los que se conectaban en zoom a tirar dados y brindar por los nuevos logros. Los que, a pesar de leer mi primera tesis, siguieron para leer la segunda. Jorge, Arantxa, Nico, Karina, Witsy, Aban, Meche, Ana y Dany, gracias, por tanto, perdón por tan poco.

Índice

Resumen.....	iii
Agradecimientos.....	viii
Índice.....	viii
Índice de figuras.....	xi
Índice de Tablas.....	xiii
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	10
2.1. Microbiota.....	10
2.2 Carvacrol.....	12
2.3 Cinamaldehído.....	13
2.4 Ácido butírico.....	15
4. Hipótesis.....	19
5. Objetivos.....	20
5.1. Objetivo general.....	20
6. Metodología.....	21
6.1. Diseño experimental.....	21
6.1.2 Efecto agudo.....	21
Figura 2. Sistema experimental biofloc.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 2. Sistema experimental biofloc.....	23
6.1.3 Efecto crónico.....	23
6.2 Extracción de ADN.....	25
Figura 3. Proceso de extracción de ADN metagenómico.....	25
6.3 Secuenciación de genomas completos.....	26
6.4 Análisis bioinformático.....	26
6.5 Clasificación taxonómica.....	27
6.6 Análisis ecológicos.....	28
7. Resultados.....	29
7.1 Temperatura y Oxígeno disuelto.....	29
7.2 Efecto agudo.....	29
7.3 Efecto crónico.....	31

7.3.1 Alcalinidad	31
7.3.2 pH	32
7.3.3 Amonio	33
7.3.4 Amoniaco	34
7.3.5 Nitrito	35
7.3.6 Nitrato	36
7.4 Metagenómica	37
7.4.1 Esfuerzo de muestreo	37
7.4.2 Secuenciación	38
7.4.3 Estructura de la comunidad	38
7.4.5 Abundancia relativa Phylums	41
7.4.6 Abundancia relativa Clase	42
7.4.7 Abundancia relativa Familias	43
7.4.8 Abundancia relativa de géneros	44
7.4.9 Abundancia relativa especie	45
7.5 Diversidad beta	46
7.5.1 PCoA	46
7.5.2 ANOSIM	47
7.5.3 Análisis de Jaccard	48
8. Discusión	49
8.1 Calidad del agua	49
8.2 Metagenómica	50
9. Conclusiones	62
10. Bibliografía	64
11. Anexos	85

Índice de figuras

Figura 1 Tomado de (Thamdrup, 2012) Ciclo del nitrógeno.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 2. Sistema experimental biofloc.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 3. Proceso de extracción de ADN metagenómico	25
Figura 4. Efecto agudo del Phytobutyryn en el Consumo de amonio y nitrito, después de la adición de 0 mg, 60 mg, 120 mg y 240 mg de Phytobutyryn, representando la dosis máxima a agregar durante el periodo de engorda en una sola exhibición. Los muestreos se realizaron cada hora hasta que se consumieron los 2mg L ⁻¹ añadidos al inicio del experimento.....	30
Figura 5 Efecto crónico del Phytobutyryn sobre la concentración y el consumo de alcalinidad en el biofloc durante el periodo experimental.	31
Figura 6. Efecto crónico del Phytobutyryn en la dinámica del pH durante el periodo experimental.....	32
Figura 7 Efecto del Phytobutyryn sobre la dinámica del amonio durante el periodo experimental.....	33
Figura 8 Efecto del Phytobutyryn sobre la dinámica del amoníaco durante el periodo experimental.....	34
Figura 9. Efecto del Phytobutyryn sobre la dinámica del nitrito durante el periodo experimental.....	35
Figura 10. Efecto del Phytobutyryn sobre la dinámica del nitrato durante el periodo experimental.....	36
Figura 11. Curvas de acumulación de especies. las distintas unidades de muestreo bajo los 4 tratamientos de phytobutirin el punto de inflexión de la curva está marcado después de las 20,000 muestras, y un rectángulo marca el punto de aplanamiento de la curva, todos los tratamientos tuvieron un correcto tamaño de muestra.....	37
Figura 12. Gráfica de la abundancia relativa de los Dominios presentes en la comunidad, los tratamientos C (0 mg Kg ⁻¹), T1(0.5 mg Kg ⁻¹), T2(1 mg Kg ⁻¹), T3 (2 mg Kg ⁻¹)	40
Figura 13 Gráfica de la abundancia relativa de los phylums presentes en la comunidad. Los tratamientos C (0 mg Kg ⁻¹), T1(0.5 mg Kg ⁻¹), T2(1 mg Kg ⁻¹), T3 (2 mg Kg ⁻¹). Los 9 phylums representan al menos el 1% de la comunidad.....	41
Figura 14. Gráfica de la abundancia relativa de las clases presentes en la comunidad. ...	42
Figura 15. Gráfica de la abundancia relativa de familias presentes en la comunidad. Los tratamientos C (0 mg Kg ⁻¹), T1(0.5 mg Kg ⁻¹), T2(1 mg Kg ⁻¹), T3 (2 mg Kg ⁻¹)	43
Figura 16 Gráfica de la abundancia relativa de Géneros presentes en la comunidad. Los tratamientos C (0 mg Kg ⁻¹), T1(0.5 mg Kg ⁻¹), T2(1 mg Kg ⁻¹), T3 (2 mg Kg ⁻¹)	44
Figura 17. Gráfica de la abundancia relativa de especies presentes en la comunidad.....	45
Figura 18. Análisis de coordenadas principales, se consideraron las especies presentes en cada tratamiento para modelar la comunidad en función de las variables ambientales consideradas fueron: Temperatura, Salinidad, oxígeno disuelto, las concentración de amonio, nitrito y nitrato, y los tratamientos de Phytobutyryn C (0 mg Kg ⁻¹), T1(0.5 mg Kg ⁻¹), T2(1 mg Kg ⁻¹), T3 (2 mg Kg ⁻¹).	46

Figura 19. Gráfica representando la disimilitud entre comunidades de acuerdo con la concentración de Phytobutyryn C (0 mg Kg¹), T1(0.5 mg Kg⁻¹), T2(1 mg Kg⁻¹), T3 (2 mg Kg⁻¹)..... 47

Figura 20. Dendograma representando la disimilitud mínima entre muestras. Se construyó a través de una matriz de similitud de Jaccard, utilizando la base de datos de especies de cada una de las muestras y comparando su presencia o ausencia en las diferentes muestras para establecer las diferencias entre ellas. De acuerdo con la concentración de Phytobutyryn C (0 mg Kg¹), T1(0.5 mg Kg⁻¹), T2(1 mg Kg⁻¹), T3 (2 mg Kg⁻¹)..... 48

Índice de Tablas

Tabla 1. Índices de diversidad alfa de la comunidad bacteriana del biofloc	47
--	----

1. Introducción

En el 2020 la acuicultura aportó el 49.2% del volumen total de productos acuícolas que se consumieron en el mundo; incluyendo la producción de peces, crustáceos, algas y moluscos (FAO, 2022). Estos productos son de alto valor nutricional, una excelente fuente de proteína, ácidos grasos, vitaminas y minerales. Por lo tanto, la acuicultura se percibe como una actividad económica viable en sus diferentes escalas de producción ya sea desde unidades productivas de traspatio, o como grandes empresas (Campos et al., 2012).

Gracias a los distintos sistemas de producción, la industria de la acuicultura ha tenido un crecimiento estable de 8% anual en los últimos años, en 2020 se produjeron 122.6 millones de toneladas en peso vivo y siguiendo esta tendencia se estima que para 2050 la acuicultura será la fuente principal de proteína animal del mundo (FAO, 2022). Aunque para cumplir con estas expectativas, existen problemáticas que hacen falta solucionar, principalmente el uso eficiente del agua, un adecuado tratamiento de los desechos, las descargas de los desechos, el control de patógenos, el aumento en la diversidad de especies cultivadas, encontrar ingredientes alternativos a la harina y aceite de pescado de pescado, entre otras (Costa-Pierce y Chopin, 2021).

En México la acuicultura representa el 18% de la producción pesquera nacional (CONAPESCA, 2020). Aunque este porcentaje incluye a distintas especies, la acuicultura más desarrollada es la de crustáceos, en específico el camarón blanco (*Penaeus vannamei*), donde en 2020 la producción fue de 214,546 toneladas, representando el 79 % de la pesquería total de dicha especie. Comparando esta producción con otros países, México ocupa el séptimo lugar a nivel mundial en la producción de crustáceos, siendo superado en el Continente americano solo por Ecuador (FAO, 2022). Estos niveles de producción han sido alcanzados a pesar de la limitación tecnológica que existe en el sector

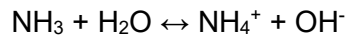
acuícola, dado que la mayoría de las unidades productivas del país operan bajo sistemas de producción extensiva. Lo cual limita la eficiencia del cultivo, generando bajos rendimientos (Platas y Vilaboa, 2014; Secretaría de Agricultura y Desarrollo rural, 2015).

Dada la importancia de la acuicultura en México, el Plan Nacional de Desarrollo considera distintas estrategias para que el país se encuentre a la vanguardia biotecnológica internacional en acuicultura. Dentro de ellas, se plantea el desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías que contribuyan no solo a la seguridad alimentaria del país, sino el crecimiento económico mediante el impulso a esta industria (Campos et al., 2012). En este sentido, se buscan tecnologías que reduzcan los costos de producción, favorezcan el bienestar animal y sean más responsables con el medio ambiente (Calabrese et al., 2017; Shourbela et al., 2021).

En años recientes los sistemas de cultivo intensivos han sido considerados alternativas prometedoras para volver a la acuicultura más eficiente, lo cual, puede impulsar la industria acuícola (Barraza et al., 2009). En este mismo sentido, el control de los parámetros de calidad del agua dentro del sistema de producción es crucial. Dentro de estos parámetros, los compuestos nitrogenados reciben especial atención ya que pueden acumularse y ser tóxicos para los organismos cultivados (Murray et al., 2014). Dentro de los parámetros de mayor importancia a contemplar en la acuicultura se encuentran: el pH, salinidad, temperatura, oxígeno disuelto, las concentraciones de nitrógeno amoniacal total (NH_4^+ , NH_3), nitrito (NO_2) y nitrato (NO_3), los sólidos suspendidos y la alcalinidad (Mohanty et al., 2018).

Entre los compuestos nitrogenados de mayor importancia en los sistemas acuícolas se encuentran el amonio (NH_4^+) y el amoníaco (NH_3), esta última es mucho más tóxica para los organismos acuáticos (Thurston y Russo, 1981). La suma de ambos compuestos se

representa como el nitrógeno amoniacal total (NAT) y la relación entre ambos es representada con la siguiente fórmula:



El equilibrio del amonio en una solución es dependiente de factores como: la temperatura, fuerza iónica y pH influyen en el equilibrio del NAT (Ip et al., 2001). Los ambientes ácidos favorecen la protonación del amoníaco hacia amonio, sin embargo, en ambientes básicos, la presencia del ion hidróxido genera un cambio hacia amoníaco (Duborow et al., 1997). En ambientes con un pH mayor a 7.5 el 95% del nitrógeno amoniacal total se encontrará en forma de amonio, este es el caso del pH fisiológico de muchos organismos usados en acuicultura (Wilkie, 2002). Por ende, la misma cantidad de amonio sería 10 veces más tóxica para los peces a un pH de 8.5 que a 7.5 (Thurston y Russo, 1981).

Se estima que los peces y camarones asimilan solamente alrededor del 25% del nitrógeno agregado en la dieta, el resto termina siendo excretado como amonio o como nitrógeno orgánico en las heces y restos de alimento (Avnimelech, 1999), siendo las branquias, donde se lleva la mayor parte de la excreción de amonio a través de un intercambio sodio – amonio ($\text{Na}^+ / \text{NH}_4^+$) (Wilkie, 2002). La acumulación del amonio en el sistema puede provocar una intoxicación de los organismos cultivados, causando daños en las branquias, estrés oxidativo, problemas en la regulación iónica, disminución en el intercambio de gases, neurotoxicidad, convulsiones y finalmente la muerte del organismo (Wilkie, 2002).

En un sistema acuícola el amonio puede ser asimilado por las algas o ser oxidado por bacterias en la nitrificación, donde el amonio es oxidado a nitrito (NO_2) seguido de una segunda oxidación para formar nitrato (NO_3) (Duborow et al., 1997). El nitrato NO_3 solo puede ser metabolizado en condiciones anaerobias para ser reducido a través de la

oxidación anaerobia del amonio (Anammox) formando óxido nitroso (N_2O) o nitrógeno molecular (N_2) los cuales, al ser gaseosas se liberan a la atmósfera (Fig. 1) (Thamdrup, 2012).

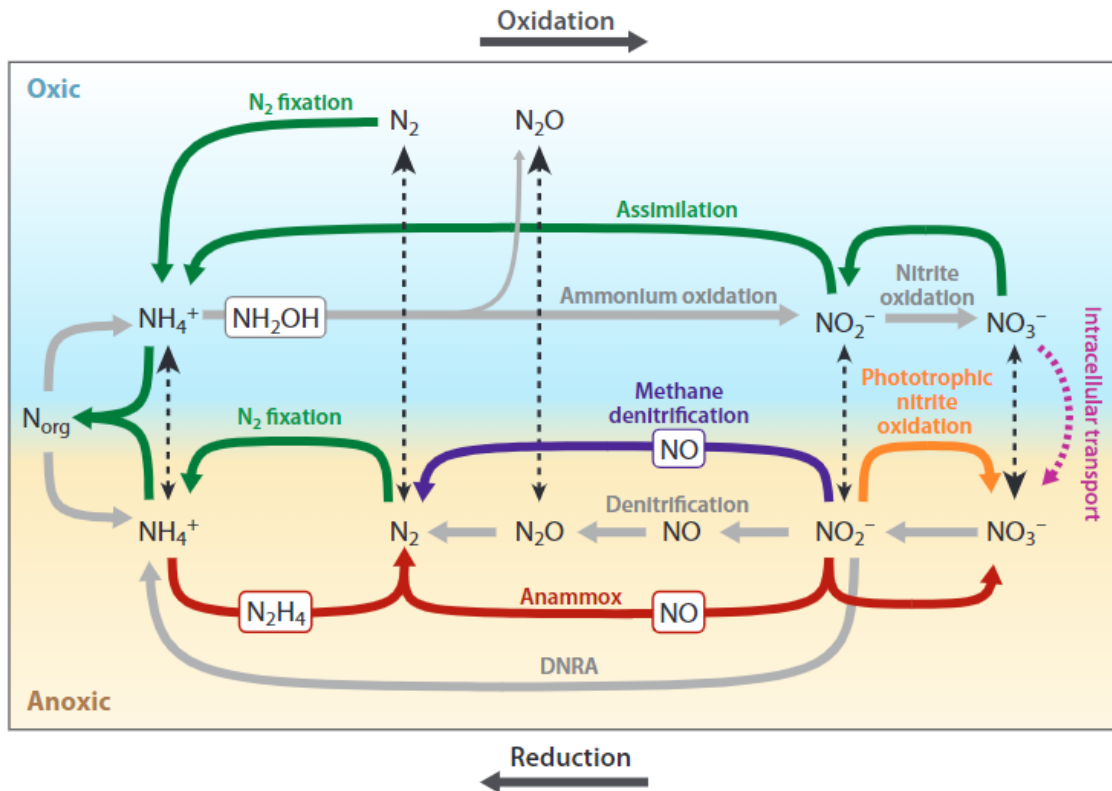


Figura 1. Ciclo del nitrógeno Tomado de (Thamdrup, 2012)

La implementación de un sistema de filtración biológica, donde los compuestos nitrogenados son removidos del sistema a través de la nitrificación, disminuye el consumo de agua en los sistemas acuícolas (Otte y Rosenthal, 1979). Este proceso es llevado a cabo por dos grupos bacterianos diferentes, las bacterias oxidantes de amonio y las bacterias oxidantes de nitrito, los cuales acoplan sus metabolismos y controlan el nivel de amonio en el sistema (Ruiz et al., 2020).

Las bacterias oxidantes de amonio obtienen energía al catabolizar amonio a nitrito, estas bacterias pertenecen a dos linajes β -proteobacteria (*Nitrosomonas*, *Nitrosovibrio*, *Nitrolobus*, y *Nitrospira*) y γ -proteobacteria (*Nitrosococcus*), el segundo paso es la oxidación de nitrito a nitrato la cual es realizada por bacterias oxidantes de nitrito las cuales

pertenecen a 7 géneros diferentes (*Nitrobacter*, *Nitrotoga*, *Nitrospira*, *Nitrococcus*, *Nitrospina*, *Nitrolacea* y *Nitromaritima*) (Daims et al., 2016).

Estas bacterias pueden vivir en suspensión o formar parte de una biopelícula, la cual es definida como una comunidad de microorganismos adheridos a un sustrato (Emparanza, 2009). El sustrato puede ser sólido o líquido, y está inmerso en una matriz extracelular generada por la misma comunidad bacteriana (Malone 2013). Esta asociación les confiere a las bacterias una mayor resistencia al estrés ambiental (Davey et al., 2000). Dentro de esta matriz los distintos grupos bacterianos, compiten por espacio, sustrato, fuentes de carbono y oxígeno (Ruiz et al., 2020). Las primeras capas en los biofilms están conformadas en su mayoría por bacterias heterotóficas las cuales son consideradas neutrales o benéficas para los organismos en la acuicultura y ayuda a las bacterias nitrificantes a asegurarse al sustrato (Røder et al., 2016).

La tecnología biofloc (BFT, por sus siglas en inglés), es un sistema de cultivo acuícola en donde se promueve el crecimiento de microorganismos y el metabolismo de los compuestos nitrogenados mediante la adición de carbohidratos (sucrosa, glucosa, celulosa) (Emerenciano et al., 2013). Dependiendo de la relación Carbono / Nitrógeno el metabolismo de la comunidad puede favorecer el metabolismo heterotrófico con una relación alta, mientras que relaciones bajas promueve un metabolismo autotrófico (Liu et al., 2019), aunque la presencia de ambos metabolismos siempre estará presente en cierta proporción en el sistema (Xu et al., 2016). En el caso de los sistemas BFT en donde se favorece un metabolismo quimioautotrófico por parte de bacterias oxidantes de amonio a nitrito y posteriormente a nitrato, este tipo de metabolismo consume fuentes inorgánicas de carbono como el carbonato de calcio (CaCO_3) y a diferencia del metabolismo heterotrófico la producción de biomasa bacteriana es reducida. (Ebeling et al., 2006).

Se ha identificado que las especies pioneras en los sistemas BFT son del género *Bacillus* jugando un papel importante en la formación de los primeros flóculos, lo que da lugar al establecimiento de los siguientes grupos funcionales. (Zhao et al, 2012). La disponibilidad de carbohidratos también influye en la abundancia de distintos grupos heterotróficos como el phylum Actinobacteria (*Mycobacterium*, *Mycrobacterium*), las cuales, a través de la producción de micelio promueven la formación de los flóculos, además de estar relacionados con la degradación de carbohidratos complejos (polisacáridos, celulosa, almidón, quitina) (Liu et al., 2019; Hazarika & Thakur, 2020). El phylum Proteobacterias (*Nitrobacter*, *Nitrospira*) tiende a ser el grupo dominante no sólo en el ambiente si no en el intestino de las especies cultivadas, los grupos β y γ – proteobacteria juegan un papel muy importante en la mineralización de compuestos orgánicos y oxidación de compuestos nitrogenados (Liu et al., 2019; Robles-Porchas et al., 2020)

Cuando los organismos cultivados consumen los flóculos, reciben una contribución de lipopolisacáridos, peptidoglicanos y β -glucanos de origen bacteriano, los cuales, se han visto que están relacionados con la estimulación del sistema inmune no específico de los camarones (Kim et al., 2014). Estos efectos también se ven reflejados en el cultivo de tilapias, donde se mejora la calidad y rendimiento de alevines y organismos reproductores, siendo más resistentes a infecciones y estrés osmótico (Ekasari et al., 2015). En general los organismos cultivados en sistemas de cultivo biofloc tienen un mejor estado de salud comparados con organismos cultivados en otros sistemas (Avnimelech, 1999a).

Los sistemas BFT han tenido especial éxito en el cultivo de tilapia (*Oreochromis spp.*) y camarón (*Penaeus vannamei*) (Avnimelech, 1999a; Hopkins et al., 1993), obteniendo un, menor factor de conversión alimenticia y una mayor productividad por m² disminuyendo la demanda de espacio necesario para poder establecer unidades de producción funcionales (Luo et al., 2014; El-Sayed, 2021).

Se ha demostrado que la microbiota del medio de cultivo ya sea tradicional, BFT o RAS, son influenciadas por los organismos cultivados y viceversa (Gatesoupe, 1999). En sistemas productivos con BFT se promueve un aumento en la diversidad bacteriana, tanto en el medio de cultivo y especialmente en el intestino de los organismos (Liu et al., 2019).

La microbiota se define como el conjunto de microorganismos presentes en un ambiente específico (Berg et al., 2020). Se ha reportado que la microbiota tiene una gran influencia en procesos fisiológicos vitales como: la obtención de nutrientes de difícil acceso (Wu et al., 2015; Li et al., 2018), actividad inmunológica (Tepaamorndech et al., 2020) y en la producción de neurotransmisores (Johnson y Foster, 2018). La modificación de la microbiota puede traer beneficios a la industria acuícola (Ikeda-Ohtsubo et al., 2018) y convertirse en una estrategia para mitigar enfermedades emergentes en la acuicultura (Xiong et al., 2019).

En sistemas de cultivo intensivos como los sistemas BFT se busca un aumento en la densidad de cultivo, lo cual se ha reportado como una fuente de estrés crónico, esto puede llevar a alteraciones en el comportamiento y fisiología de los organismos cultivados (Liu et al., 2018). Las altas densidades de organismos vuelven a los cultivos susceptibles a enfermedades, aumentando la tasa de transmisión de vectores y facilitando la aparición de brotes infecciosos como salmonelosis y enfermedad de columnaris (Boyen et al., 2008; Declerk, et al., 2013). Ante esta problemática, la solución más común es la medicación de dichos cultivos, incrementando de manera excesiva el uso de antibióticos. por lo que hoy en día se han buscado alternativas que ayuden a mitigar el uso desmedido de los fármacos.

Las recientes limitaciones en el uso de antibióticos en la acuicultura ha incrementado el uso de fitogénicos en la producción de alimentos (Kuppusamy et al., 2018), ya que presentan diversos efectos benéficos como: antimicrobianos (Baba et al., 2016), antiestrés (da Cunha et al., 2019), promotores de crecimiento (El-Hawarry et al., 2018),

incentivar el apetito (Harikrishnan et al., 2003), estimulación del sistema inmune (Sutili et al., 2015), estimulación del sistema digestivo, e incluso pueden modificar la composición de la microbiota (Sutili et al., 2018), en conjunto estos efectos promueven el bienestar de los organismos cultivados (Franz et al., 2010)

Los fitogénicos se definen como compuestos extraídos de plantas e incorporados al alimento con la finalidad de mejorar la productividad a través de la mejora en la digestibilidad, absorción de nutrientes y la eliminación de patógenos (Alloui et al., 2014). Los fitogénicos agrupan una gran variedad de metabolitos secundarios de plantas como: alcaloides, flavonoides, pigmentos, fenoles, terpenos, esteroides y aceites esenciales. Los fitogénicos juegan un papel importante en la adaptación de las plantas al ambiente, y representan una fuente importante de compuestos activos (García-Beltrán y Esteban, 2022) por ello, los fitogénicos son comúnmente usados como remedios alternativos a enfermedades en muchas culturas (Arts y Hollman, 2005).

Una ventaja de los fitogénicos en comparación con los antibióticos sintéticos es que suelen estar presentes en la naturaleza como una mezcla compleja en lugar de presentarse como compuestos aislados, disminuyendo las probabilidades de que se genere una resistencia a estos compuestos por parte de los patógenos (Franz et al., 2010) y generando sinergias en los efectos obtenidos (Zhou et al., 2007). Entre los fitogénicos más estudiados podemos encontrar el carvacrol y el cinamaldehído.

Aunque el uso de fitogénicos en la acuicultura va en aumento, la información disponible sobre: los efectos, los mecanismos de acción y las sinergias que pueden presentar estos compuestos aún es escasa, y es necesario desarrollar investigaciones que ayuden a soportar la demanda de los fitogénicos en la industria. Existen diversos estudios que demuestran los beneficios de los fitogénicos en la acuicultura como la modulación de la respuesta inmune en camarón, aumentando la expresión de genes relacionados con el

sistema inmune (Faikoh et al., 2014), estimulando la actividad de enzimas como AKP, ACP, SOD y lisozima (Shan et al., 2021) lo que, sumado a su poderoso efecto antioxidante, puede prevenir infecciones de distintos patógenos (Y. Wang et al., 2021).

2. Antecedentes

2.1. Microbiota

El estudio de la microbiota, se ha visto beneficiado con el desarrollo de técnicas de secuenciación de última generación (NGS), permitiendo la identificación de especies minoritarias, mismas que no han podido ser cultivadas (Scholz et al., 2012) o que debido a los nichos ecológicos que habitan su abundancia en el ambiente tiende a cambiar con el tiempo (Berg et al., 2020) y facilitado el entendimiento de la capacidad metabólica de la comunidad, así como sus potenciales interacciones con el hospedero (Barko et al., 2018).

En los sistemas de cultivo BFT el metabolismo de la comunidad bacteriana se ve reflejado en la dinámica de los nutrientes, por lo que, si se observa una alteración en la dinámica de estos, es posible que exista una perturbación comunidad bacteriana. (Ferreira et al., 2021). De manera particular, en los sistemas de producción BFT al existir una gran diversidad bacteriana, existe una redundancia metabólica lo que le confiere al sistema una gran resiliencia ante algún disturbio, y de la misma manera las bacterias patógenas pueden quedar excluidas de su nicho ecológico por competencia interespecífica (Abakari et al., 2021; Emerenciano et al., 2013).

Se han descrito de manera general la estructura de la comunidad microbiana tanto del tracto digestivo como de los medios de cultivo (Egerton et al., 2018). Se han identificado los cambios en la comunidad en distintas partes del desarrollo de los organismos (Stephens et al., 2016), así como los principales factores que pueden modificarla siendo estos la especie hospedera, su alimentación y el ambiente donde se desarrollan. Se ha reportado que la microbiota puede variar al interior de una unidad de producción, manteniendo una presencia constante en los phylums más abundantes (Proteobacteria, Tenericutes, Bacteroidetes y Cyanobacteria) (Zhang et al., 2019).

Los estudios sobre la microbiota también incluyen la descripción de la comunidad bacteriana del biofloc. Tapaamorndech et al., (2020) describió la comunidad bacteriana presente en los flóculos de un sistema de cultivo biofloc para cultivo de camarón (*Penaeus vannamei*), describiendo que el sistema era dominado por el género *Vibrio*, el cual representaba $90.2 \pm 9.8\%$ de la población total. Se encontraron diferencias entre los distintos muestreos a lo largo del ciclo de cultivo indicando que en la comunidad del biofloc ocurre un proceso de sucesión durante el periodo de cultivo, y esta comunidad tiene efecto sobre la microbiota de los camarones cultivados en este cultivo, encontrando diferencias significativas en la microbiota del tracto digestivo de camarones.

Por otro lado, Meenakshisundaram et al., (2021) describe la comunidad bacteriana de un sistema de cultivo biofloc para un cultivo de tilapia (*Oreochromis niloticus*), describiendo que el 70% de la comunidad estaba conformada por bacterias, 5% de eucariotas, 0.6% de arqueas, 0.1 % de virus. Siendo los phylums más abundantes: Proteobacteria (46%), Actinobacteria (14%) y Bacteroidetes (8%). Las clases más abundantes fueron Alphaproteobacteria (20%), Betaproteobacteria (16%) y Actinobacteria (15%). Las familias más abundantes fueron *Streptomyces* (13%), *Mycrocistis* (7%) y *Caldilinea* (6%). Estos resultados indican que el sistema al ser dominado por el filo proteobacteria se impone principalmente el metabolismo de carbohidratos, y concluye, que la descripción de la comunidad presente en el biofloc puede ayudar a en un futuro promover ciertos taxones que puedan mejorar el crecimiento de las especies cultivadas.

Se tienen evidencias que los organismos sanos presentan comunidades microbianas con índices de diversidad alfa mayores en comparación con los enfermos (Nie et al., 2017). La reducción en la diversidad de la comunidad bacteriana en organismos enfermos puede ser debido a que los patógenos desplazan a las poblaciones de bacterias comensales disminuyendo la diversidad (Xiong et al., 2019). En adición a lo anterior, el uso

de antibióticos suele afectar de manera considerable la diversidad de la microbiota, dejando a los organismos susceptibles a una disbiosis por la colonización de patógenos externos (He et al., 2017) por otro lado, se ha reportado que los fitogénicos como alicina, timol y carvacrol pueden modificar la composición de la microbiota y promover el bienestar de los organismos cultivados (Sutili et al., 2018; Franz et al., 2010) favoreciendo la presencia de Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Verrucomicrobia y Fusobacteria phylums que se han asociado con organismos con un alto rendimiento en cultivos (Zaminhan-Hassemmer et al., 2022). y aunque no existe evidencia de su efecto directo sobre la comunidad bacteriana del biofloc, una mayor abundancia de bacterias benéficas en el sistema de cultivo biofloc podría mejorar el rendimiento del cultivo.

2.2 Carvacrol

El carvacrol (2-Metil-5-1[1-metil etil]-fenol) es un fenol aromático, isomérico con el timol, su fórmula química es $C_6H_3CH_3(OH)(C_3H_7)$ y está presente de manera natural en el tomillo (*Thymus vulgaris*), la bergamota (bergamia Lois var. *Citrus aurantium*), la pimienta (*Lepidium flavum*) y el orégano (*Origanum vulgare*), representando entre un 50 y 70% del aceite esencial del orégano. (Imran et al., 2022). Aunque los aceites esenciales son antioxidantes de manera natural, la presencia de un grupo hidroxilo en su estructura es la principal razón de su potencial de absorber radicales libres, esto sumado a su naturaleza como un ácido débil, facilita la donación de electrones de los átomos de hidrógeno con electrones sobrantes (Mir et al., 2020).

Se ha reportado que el carvacrol tiene distintos efectos como: mejorar la eficiencia en la absorción de nutrientes, digestión, crecimiento, efectos antiinflamatorios y antimicrobianos, antioxidantes y modulación del sistema inmune, (Alagawany et al., 2021). Se ha reportado que la actividad antimicrobiana del carvacrol se debe a la interacción que

tiene con la membrana celular tanto de bacterias gran positivas como negativas, en donde a través de la formación de puentes de hidrógeno con la membrana celular, forma poros que la permeabilizan, impidiendo que puedan mantener el balance osmótico y terminan por liberar el contenido citoplasmático (Imran et al., 2022) incluyendo a bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* (Zhou, Ji, Zhang, Jiang, Yang, Li, Li, Ren, et al., 2007).

También se ha visto que el carvacrol tiene la capacidad de inhibir la formación de biofilms, y la actividad de *Aeromonas hydrophila* (da Cunha et al., 2019; J. Wang et al., 2022), presentando sinergias con otros fitogénicos y antibióticos (Bandeira Junior et al., 2018) lo cual es una ventaja en el tratamiento de patógenos con resistencia a múltiples antibióticos. Aunque se desconoce con precisión el mecanismo de acción en contra de la formación de biofilms, la teoría más aceptada es que debido a la parcial estructura hidrofílica, le puede ayudar a difundirse por la matriz de polisacáridos del biofilm, mientras que la parte hidrofóbica es la que interactúa con la membrana celular (Raei et al., 2017).

2.3 Cinamaldehído

El cinamaldehído consiste en un fenol aromático con un aldehído insaturado adherido (C_9H_8O). Principalmente se obtiene de la corteza interna de diversos árboles del género *Cinnamomum*, siendo las más común *Cinnamomum zeylanicum*, la cual puede contener entre 85.3 y 90.5 % de trans-cinamaldehído como aceite esencial (Zinn et al., 2015). Entre los efectos que se han reportado sobre el cinamaldehído están su efecto antioxidante, antiinflamatorio, antifúngico y antibacteriano, así como su capacidad de inhibir la transcripción de genes y promover apoptosis en tumores cancerígenos (Zinn et al., 2015)

El cinamaldehído tiene distintos sitios activos en la molécula, lo que le permite tener distintas rutas de interacción con otras moléculas, facilitando su función como antimicrobiano y antifúngico, uno de estos mecanismos es a través de la inhibición de las proteínas FtsZ, las cuales son pieza clave en el proceso de división celular en bacterias y arqueas, por lo que actúa de manera específica en estos grupos (Domadia et al., 2007). También, se ha demostrado que tiene un efecto desestabilizador donde el mecanismo de acción es la permeabilización tanto de la membrana celular de bacterias como de la pared celular, afectando a las bacterias Gram positivas y negativas (Doyle y Stephens, 2018) aunado a esto el cinamaldehído tiene la capacidad de provocar una oxidación de los ácidos grasos que la componen, provocando la lisis de las bacterias (Shen et al., 2015)

Un efecto importante del cinamaldehído, es su capacidad de afectar la formación de biofilms por parte de las bacterias, actuando de dos maneras diferentes; la primera, disminuyendo la expresión del gen *sarA*, el cual, es un regulador de proteínas asociadas con la formación de biofilms, provocando una disrupción en la arquitectura del biofilm y reduciendo el número de células viables que lo forman (Silva et al., 2018). La segunda, inhibiendo la comunicación intracelular de las bacterias (quorum-sensing), inhibiendo las proteasas extracelulares, y la síntesis de moléculas AI-2, las cuales, son señalizadores que facilitan la comunicación inter e intra-especies, la movilidad de las bacterias en el medio y su agregación (Shafreen et al., 2014).

Se ha reportado que el cinamaldehído puede limitar la transferencia horizontal del virus de la mancha blanca (WSV), y aunque no se sabe cuál es el mecanismo de acción, el cinamaldehído inhibe la replicación del virus y su transferencia horizontal, aumentando la sobrevivencia de las larvas de camarón un 33% lo que podría interrumpir el brote de esta enfermedad en cultivos de camarón. El efecto antiviral del cinamaldehído puede deberse a

la interacción que tiene con la membrana celular, compitiendo por sitios de ensamblaje bloqueando la adsorción de los virus (Zhang et al., 2023).

De manera general, se ha reportado que existen sinergias entre los efectos del cinamaldehído y el carvacrol en su actividad antimicrobiana, donde el carvacrol podría facilitar el transporte del cinamaldehído dentro de las células bacterianas, y con ello, disminuir las dosis necesarias para tener el efecto deseado (Zhou et al., 2007). También se ha reportado que la mezcla de cinamaldehído y carvacrol, puede modular la microbiota de los organismos cultivados, inhibiendo el establecimiento de bacterias patógenas en el intestino y mejorando la absorción de nutrientes, lo que genera una mejora en el crecimiento de los organismos cultivados (Zaminhan-Hassemer et al., 2022).

2.4 Ácido butírico

El ácido butírico es un ácido graso de cadena corta (4 carbonos), el cual es formado por la hidrólisis del etil-butirato, el cual ha atraído la atención por los múltiples efectos que tiene en el crecimiento y expresión de genes por lo que las investigaciones en este compuesto tienen más de 50 años (Prasad, 1980). En general los ácidos grasos de cadena corta, como el ácido butírico actúan de tres formas diferentes de actuar sobre la fisiología de los organismos que los consumen, como la acidificación del tracto digestivo, lo cual inhibe el crecimiento de bacterias gram (-), a través de la disociación de los ácidos, lo que provoca la generación de aniones al interior de las células bacterianas. (Hoseinifar et al., 2017), esto se ha visto que modula la microbiota intestinal, aumentando la proporción de las bacterias Gram (+) reduciendo así grupos patogénicos (da Silva et al., 2016).

La acidificación del tracto digestivo debido a los ácidos grasos de cadena corta, facilitan la absorción de minerales en intestino como por ejemplo el fósforo y otros elementos traza (Sugiura et al., 1998). Se ha reportado que el ácido butírico promueve la

proliferación de células epiteliales en la mucosa gastrointestinal, lo cual, aumenta la superficie de contacto y por lo tanto aumenta el área de absorción de nutrientes (Baruah et al., 2007). También debe de considerarse el aporte energético que pueden tener estos ácidos grasos, ya sea directamente en la producción de ATP en el ciclo del ácido cítrico o como sustrato intermediario en el metabolismo (Shah et al., 2015).

El ácido butírico se ha reportado que puede modular la respuesta inmune tanto de organismos con un sistema inmune, aumentando la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune en la mucosa como son los genes LYZ, (TNF-alfa) para la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias (IL1B), la protección de radicales libres como (SOD, CAT) y protectores de shock térmico (HSP70) (Liu et al., 2017). Estudios recientes indican que esta modulación se debe a la interacción entre el ácido butírico y los receptores de proteínas GPR43, el cual se expresa principalmente en el sistema inmune innato y las células inflamatorias (Maslowski y MacKay, 2011).

Existe muy poca información sobre el uso de fitogénicos en sistemas de cultivo biofloc, volviendo este campo de investigación muy novedoso, ya que, aunque se sabe que el uso de probióticos puede promover el crecimiento de los organismos acuícolas (Eissa et al., 2023), no se ha investigado el efecto que tiene el uso de fitogénicos con actividad bacteriostática y bactericida sobre la comunidad bacteriana del biofloc y los estudios suelen estar enfocados al efecto que tienen sobre las especies cultivadas.

Van Doan et al. (2020) evaluaron el efecto de la inclusión de polifenoles de castaña en el alimento de tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultivada en un sistema de cultivo BFT, encontrado un aumento en la actividad de lisozima y peroxidasa del mucus intestinal, así como, un aumento significativo en el crecimiento y una reducción del factor de conversión alimenticia, comparada con el control. También se encontró que los organismos alimentados con las dietas enriquecidas tuvieron una supervivencia mayor ante

Streptococcus agalactiae en comparación con los organismos alimentados con la dieta control. Estos efectos pueden deberse al alto contenido de moléculas bioactivas que contiene la castaña como polifenoles y flavonoides, los cuales se han asociado con la estimulación del sistema inmune y la producción de enzimas antioxidantes (Steiner y Syed, 2015). La inclusión de polifenoles en la dieta de organismos de cultivo se ha visto que puede mejorar la respuesta del sistema inmune de los organismos acuáticos activando diferentes mecanismos del sistema inmune, como la explosión respiratoria, la actividad de los fagocitos, aumento en la actividad de la lisozima y la anti-proteasa (Wu et al., 2010; Rui Wu et al., 2013).

Por otro lado, Outama et al., (2022) evaluaron el efecto de la inclusión de polvo de cáscara de mango (*Mangifera indica L.*) en la dieta de tilapia (*Oreochromis niloticus*) bajo un sistema de cultivo BFT. Se ha reportado que la cáscara de mango contiene una gran cantidad de nutrientes y compuestos bioactivos como fenoles, flavonoides y carotenoides, además de las vitaminas C y E, los cuales se ha reportado que pueden tener efectos en la estimulación del sistema inmune, anti-inflamatorios y agentes antibacterianos. Este estudio concluye que, aunque la inclusión de polvo de cáscara de mango podría mejorar la respuesta del sistema inmune innato de la tilapia y sobre la expresión de genes relacionados con la respuesta innata del sistema inmune.

Tanto en el estudio de (Van Doan et al., 2020) como de (Outama et al., 2022) se plantea la inclusión de fitogénicos (polifenoles, flavonoides y carotenoides) enfocados en el efecto que tienen sobre las especies cultivadas, mientras que los fitogénicos utilizados en ambos estudios, no se ha reportado que tengan un efecto bactericida o bacteriostático. Lo cual podría representar un riesgo en la capacidad del biofloc para seguir funcionando como un biofiltro.

3. Justificación

Los fitogénicos se presentan como una solución a la necesidad de encontrar alternativas al uso de antibióticos en la acuicultura, este es el caso del Phytobutylin un producto que agrupa el ácido butírico con el cinamaldehído y carvacrol, compuestos ampliamente estudiados por los beneficios que presentan para la acuicultura, en donde los sistemas de cultivo se enfocan cada vez más en la producción intensiva. Esto abre la puerta a la investigación sobre la compatibilidad del uso de fitogénicos en sistemas de cultivo biofloc, ya que existe la incógnita sobre si la actividad antimicrobiana y la inhibición sobre el desarrollo de biopelículas, pueda generar la pérdida de grupos funcionales en el biofloc y limitar la capacidad de este sistema de cultivo como biofiltro.

4. Hipótesis

La adición de Phytobutyryn a un sistema de cultivo biofloc afectará significativamente la composición y diversidad de la comunidad bacteriana presente lo que alteraría la capacidad de la comunidad bacteriana de metabolizar los compuestos nitrogenados provocando un aumento en la concentración de estos en el sistema de cultivo afectando la calidad del agua.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general.

- Evaluar el efecto del fitogénico Phytobutyryn en la composición y diversidad de la microbiota de un sistema de cultivo biofloc y su influencia en la calidad del agua del sistema de cultivo

5.2. Objetivos específicos

- Caracterizar la estructura de la comunidad bacteriana presente en un sistema de cultivo biofloc sometidos a distintas concentraciones de Phytobutyryn (0.5, 1, y 2 mg Kg⁻¹)
- Identificar los cambios que puede generar el uso de fitogénicos en tres diferentes concentraciones (0.5, 1, y 2 mg*Kg⁻¹) en la estructura de la comunidad bacteriana del sistema de cultivo biofloc.
- Evaluar la calidad del agua del sistema de cultivo biofloc, con el uso de tres concentraciones diferentes de phytobutyryn (0.5, 1, y 2 mg Kg⁻¹) tanto de manera aguda como de manera crónica.

6. Metodología

6.1. Diseño experimental

Se realizaron 2 experimentos para evaluar el efecto del fitogénico de manera aguda como de manera crónica. Esto se llevó a cabo en el invernadero de acuicultura de la facultad de ciencias marinas de la UABC, ubicada en el municipio de Ensenada, Baja California.

Para los fines de esta investigación se utilizó un sistema quimioautotrófico, el inóculo para el sistema de cultivo biofloc fue proporcionado por el laboratorio de reproducción de camarones, el cual ya era un biofloc maduro de acuerdo con lo propuesto por Ferreira et al. (2021), donde se demuestra que los niveles de amonio y nitrito se mantienen constantes, y la acumulación paulatina de nitrato en el medio, era presente. El Biofloc era ocupado para mantener un cultivo de camarón blanco (*Penaeus vannamei*), se ocupaba una relación C:N de (10:1), una concentración de oxígeno disuelto mayor a 4 mg L⁻¹, una alcalinidad de 150 CaCO₃ L⁻¹, la salinidad de 32 (‰), y se mantenía a temperatura ambiente.

6.1.2 Efecto agudo

El diseño experimental para evaluar el efecto del fitogénico de manera aguda fue de 1 factor y 4 niveles de concentración de Phytobutylin, C (0), T1 (0.5), T2 (1) y T3 (2) (mg Kg⁻¹) de alimento concentraciones consideradas por ser las recomendadas por el fabricante del fitogénico (Laboratorio Alivira-Karizoo). Por cada tratamiento se realizaron 3 repeticiones. El Biofloc se repartió en 12 contenedores de 19 L (23 x 23 x 15) (Fig. 2) y tuvo una duración de 12 horas.

Con la finalidad de observar si el metabolismo de la comunidad se veía afectado por el uso del phytobutylin, se midió la concentración de amonio y nitrito presente en las unidades experimentales. Para establecer el punto de referencia inicial, se agregaron 2mg

L⁻¹ de cloruro de amonio (BASF) y 20mg L⁻¹ de azúcar para incentivar el metabolismo de la comunidad bacteriana. Se calculó la cantidad total de alimento que se requeriría para alimentar a los camarones considerando una densidad de cultivo de 210 organismos m³, con un peso final de 15g, al cabo de 120 días de cultivo, contemplando un factor de conversión alimenticia de 2:1. Con base en este dato, se calculó la cantidad de phytobutyryn que se agregaría en ese periodo de tiempo. Diariamente, junto con el alimento, el phytobutyryn fue agregado directamente a los sistemas finalmente, se midió la concentración del amonio y nitrito cada hora hasta que todo el amonio agregado fuera metabolizado.



Figura 2. Sistema experimental biofloc

6.1.3 Efecto crónico

El diseño experimental para evaluar el efecto del phytobutyryn de manera crónica fue de 1 factor y 4 niveles de concentración de Phytobutyryn, Control (0), T1 (0.5), T2 (1) y T3 (2) mg Kg⁻¹ de alimento. Por cada tratamiento se realizaron 3 repeticiones. El Biofloc se repartió en 12 contenedores de 19 L (23 x 23 x 15) (Figura 2) con 4 camarones, es decir, una densidad de 210 organismos m³, con un peso promedio de 8g ± 1.2g. Los camarones fueron proporcionados por el laboratorio de reproducción de camarón, habituados a un sistema de cultivo BFT quimioautótrofo. Se calculó la cantidad de alimento diario de acuerdo con la biomasa programada y se agregó la proporción correspondiente de phytobutyryn directamente al medio de cultivo. Las concentraciones utilizadas fueron de acuerdo con las

recomendaciones del productor (KARIZOO). Por cada tratamiento se realizaron 3 repeticiones. Y el experimento tuvo una duración de 30 días en un espacio cerrado.

Se mantuvo un monitoreo de las condiciones ambientales de la misma manera en ambos experimentos. La salinidad (‰) se midió con un refractómetro (Deltatrak, Mod. 24240), y se mantuvo controlada añadiendo agua dulce para reponer las pérdidas por evaporación, manteniendo un volumen de agua de 19 L por unidad experimental. Para mantener el agua en movimiento y como método de aireación, se utilizó una piedra difusora cúbica de 1.5 cm (Sweet Water, Mod. As3). Misma, que se colocó y se fijó al fondo del contenedor. La temperatura del ambiente (°C) se mantuvo constante con 2 calentadores de 300 Watts (Thermojet). El oxígeno disuelto se monitoreo (mg L^{-1}), dos veces al día utilizando un oxímetro (YSI pro 20i. Los sólidos sedimentables (ml L^{-1}) se evaluaron cada semana tomando una muestra homogénea de 1L de agua de cada unidad experimental y colocándola en un cono Imhoff (Nalgene Mod. 1000-0010), donde se dejaba precipitar a la sombra durante 60 min. Pasado este tiempo se media en la parte inferior del cono el volumen de sólidos que se habían sedimentado, los datos se registraron cada dos semanas siguiendo las recomendaciones de Samocha et al., (2019). La alcalinidad se midió por titulación utilizando una solución indicadora de bromocresol y rojo de metilo (APHA, 1998), el resultado en ml es multiplicado por 50 para obtener la cantidad de mg ml^{-1} de $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ presentes en la muestra. El pH y los compuestos nitrogenados se monitorearon cada tercer día en el caso del experimento para evaluar el efecto crónico. El pH se evalúa tomando una muestra de 20 ml de agua por unidad experimental para posteriormente analizarla con un potenciómetro (Thermo Orion Star 3). Los compuestos nitrogenados amonio (mg L^{-1}), nitrito (mg L^{-1}), nitrato (mg L^{-1}) y NAT (mg L^{-1}) se evaluaron utilizando un fotómetro (YSI 9500 Ecosense), el cual, utiliza el método de indofenol para evaluar la concentración de estos compuestos en la muestra.

Las muestras para evaluar la comunidad bacteriana del medio de cultivo se colectaron en tubos Falcón estériles y libres de DNAsas al final del experimento crónico, estas muestras fueron conservadas en congelación a -80°C hasta que fueron procesadas. Se realizó la extracción de ADN metagenómico y posteriormente una secuenciación de genomas completos con la finalidad de obtener información sobre la estructura de la comunidad (riqueza, abundancia y diversidad de especies) así como información sobre los grupos funcionales que se encuentran presentes (metabolismos).

6.2 Extracción de ADN

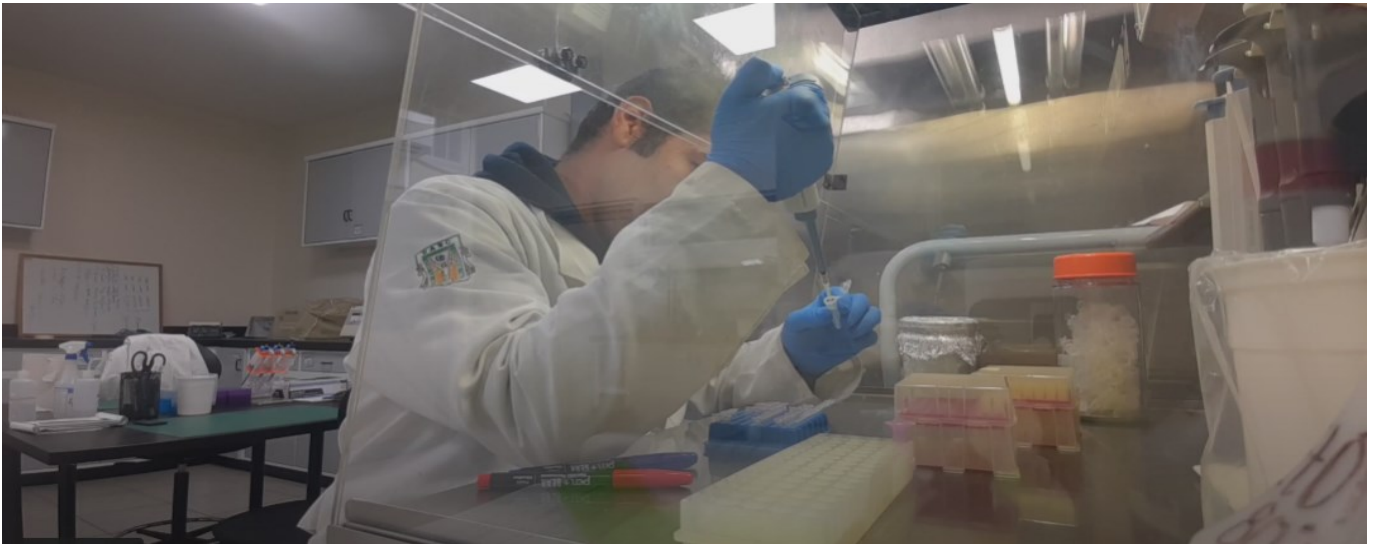


Figura 3. Proceso de extracción de ADN metagenómico

Se colectó una muestra homogénea de biofloc de cada unidad experimental, al inicio y al término del experimento, las muestras fueron colectadas en un tubo Falcón de 50 ml estéril y libre de DNAsas, las muestras fueron centrifugada a 10,000 RPM durante 3 min, se retiró el sobrenadante y se colecto un pellet de sedimentos de aproximadamente 200 mg en base húmeda, el cual, fue conservado en un frío congelador a -80°C , hasta su procesamiento (Fig. 3).

Se utilizó el protocolo de extracción de ADN metagenómico por la técnica CTAB y posteriormente se utilizó el kit de extracción de ADN DNAeasy Qiagen pro soil, con lo cual se logró obtener la calidad y concentración adecuada de ADN para realizar los análisis metagenómicos. El uso de las distintas técnicas para la extracción del ADN metagenómico fue debido a la dificultad de extraer ADN de alta calidad de las muestras de biofloc.

La calidad del ADN fue evaluada utilizando un Nanodrop™ considerando como parámetro mínimo una pureza A260/280 de entre 1.8 – 2.0 y una concentración de 50 ng, en todas las muestras se consiguieron estos parámetros.

6.3 Secuenciación de genomas completos

La secuenciación de las muestras de ADN se llevó a cabo en el laboratorio de genómica microbiana, del CIAD A.C. Mazatlán. Las muestras fueron secuenciadas utilizando el secuenciador Illumina miniseq para realizar una secuenciación shotgun del ADN total presente en la muestra. Se estimó una profundidad estándar de 2 millones de secuencias pair-end por muestra y se obtuvieron las secuencias en archivos separados en formato fastQ.

6.4 Análisis bioinformático.

Se obtuvieron 4.65 Gb de información de la secuenciación de las 16 muestras enviadas, de donde se obtuvieron 2 archivos por muestra R1 y R2, representando las lecturas en sentido forward y reverse para un total de 32 archivos. Las secuencias fueron procesadas utilizando el servidor bioinformático BIOBACTER del laboratorio de bioinformática del CIAD A.C.

Se evaluó la calidad de las secuencias con la herramienta Fast-QC, y de acuerdo con los resultados se eliminaron las primeras 20 pb y a partir de la 150 pb con la finalidad de eliminar las secuencias de baja calidad (>Q30). Una vez que se obtuvieron los archivos solo con las secuencias de alta calidad, se ensamblaron las secuencias pair-end R1 y R2 con la herramienta FLASH con lo cual se generó un archivo que acoplara toda la información de la muestra. Al obtener los archivos consolidados se volvió a analizar la secuencia de los archivos con la herramienta Fast-QC para comprobar la calidad de las muestras y si era necesario cambiar las especificaciones en la limpieza de secuencias. Este procedimiento se realizó con el script NEXTERA_CLEANER especificado en el servidor BIOBACTER del CIAD A.C Mazatlán.

6.5 Clasificación taxonómica

Este análisis se desarrolló utilizando la herramienta de clasificación taxonómica KAIJU, la cual compara los archivos con la información metagenómica contra una base de datos de genomas conocidos en este caso se utilizó la base de datos de NCBI (nr+euk) para comparar contra 381 millones de secuencias de bacterias, arqueas, virus y protistas. De esta manera se generó una base de datos con el porcentaje de secuencias que fueron identificadas, número de secuencias y taxones asignados por muestra, desde reino hasta el nivel especie. Con esta información es posible generar un gráfico KRONA en donde se representa gráficamente la diversidad de la muestra analizada. Estos análisis se realizaron utilizando el script KAIJU_FILE_CLASSIFIER del servidor BIOBACTER del CIAD A.C. Mazatlán.

6.6 Análisis ecológicos

Tomando los datos obtenidos del clasificador taxonómico se realizaron análisis para caracterizar la estructura de la comunidad microbiana, se cuantificó el número de especies observadas y se realizaron las curvas de rarefacción para evaluar el esfuerzo de muestreo de acuerdo con la metodología de Huberts (1971). Se realizó un análisis sobre la abundancia relativa de especies y se calcularon los índices de diversidad alfa de Chao1 y de Shannon (Aguilar-Pulido et al., 2016). Para la diversidad beta se elaboró una matriz de similitud de Jaccard de acuerdo con la metodología de Faith et al., (1987), la cual se representó con un dendrograma, se realizó un análisis de similitud (ANOSIM) de acuerdo con la metodología de Wharton et al., (2012) y un análisis de coordenadas principales (PCoA) utilizando la metodología de Whittaker. (1960) utilizando los índices descritos por Kollef et al. (2003). Estos análisis se realizaron utilizando el programa Restudio 4.3.1 con la paquetería de análisis ecológicos *Vegan*, y se graficaron utilizando la paquetería *ggplot2*.

6.7 Análisis estadísticos

Para verificar la normalidad de los datos se realizó una prueba Shapiro-Wilk para verificar la homocedasticidad en todas las series de datos. Para comparar los datos de calidad del agua y abundancia relativa en los distintos tratamientos, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y en el caso donde se encontraron diferencias significativas se realizó una prueba de Tukey para encontrar las diferencias específicas. Estos análisis se realizaron utilizando el programa R-estudio 4.3.1 con la paquetería de análisis ecológicos *Vegan*, la paquetería para manejo de bases de datos *Tidyverse*, y se graficaron utilizando la paquetería *ggplot2*.

7. Resultados

7.1 Temperatura y Oxígeno disuelto

Las variables ambientales que se mantuvieron bajo control fueron la temperatura y el oxígeno disuelto, manteniendo una temperatura promedio de 23.9 ± 0.2 y una concentración de oxígeno disuelto de 6.8 ± 0.06 .

7.2 Efecto agudo

No se observaron diferencias significativas en el consumo de compuestos nitrogenados (NH_4 y NO_2) entre los tratamientos. De manera particular tardaron 6 horas en regresar a la concentración con la que se empezó el experimento (1 mg L^{-1}). La dinámica del NH_4 como del NO_2 se muestran en la figura 4.

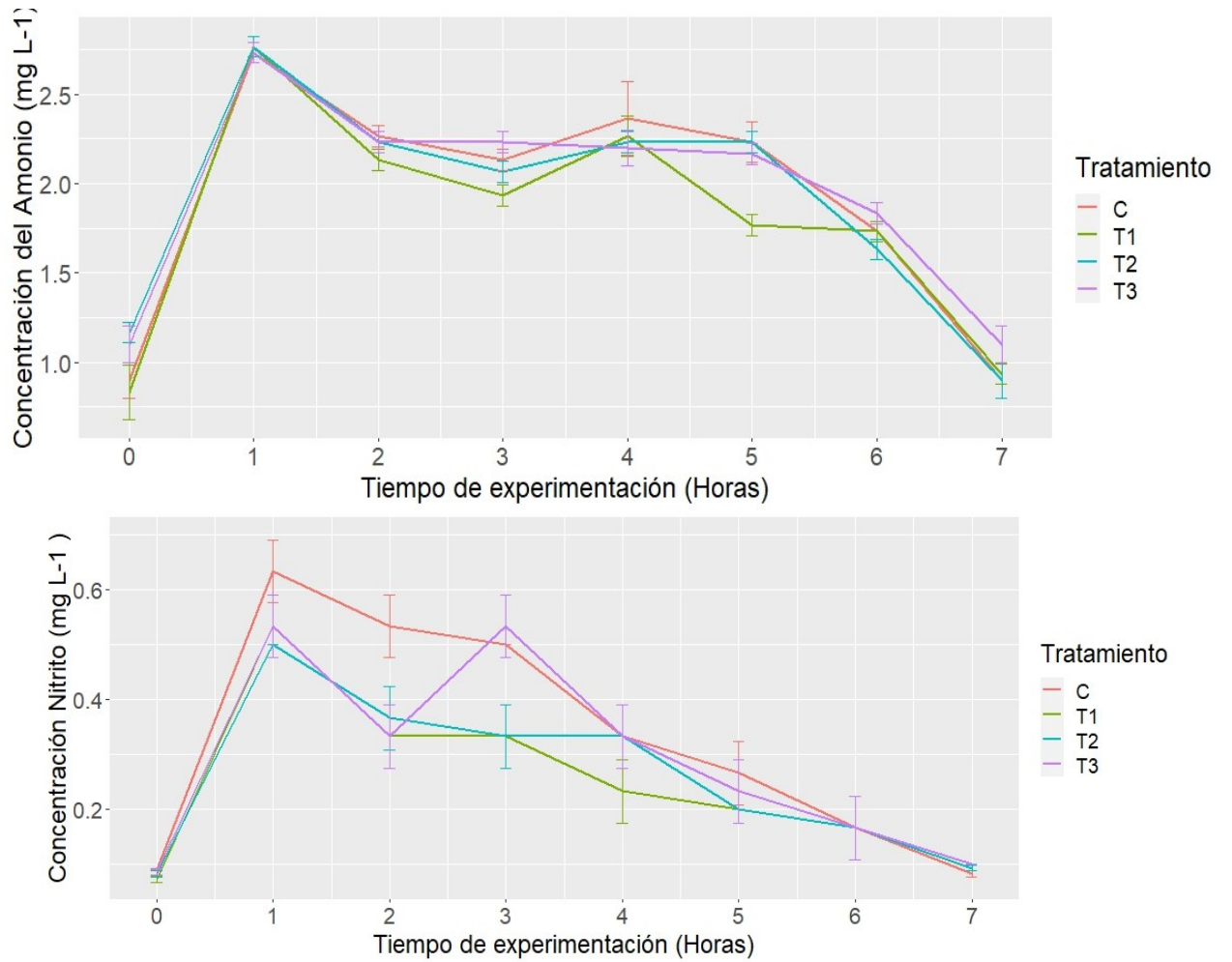


Figura 4. Efecto agudo del Phytobutyryn en el Consumo de amonio y nitrito, después de la adición de 0 mg, 60 mg, 120 mg y 240 mg de Phytobutyryn, representando la dosis máxima a agregar durante el periodo de engorda en una sola exhibición. Los muestreos se realizaron cada hora hasta que se consumieron los 2mg L⁻¹ añadidos al inicio del experimento.

7.3 Efecto crónico

7.3.1 Alcalinidad

Durante el experimento sobre el efecto crónico se mantuvo ajustada la alcalinidad a 200 mg L⁻¹ pero se notó un consumo diferencial entre los distintos tratamientos (Fig. 5), en donde se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el consumo de alcalinidad total al final del experimento, en donde el tratamiento 3 presentó el mayor consumo de alcalinidad, en comparación con los otros tratamientos. En cuanto a los tratamientos, C, T1 y T2 se presentaron diferencias en el consumo de alcalinidad estas no fueron significativas.

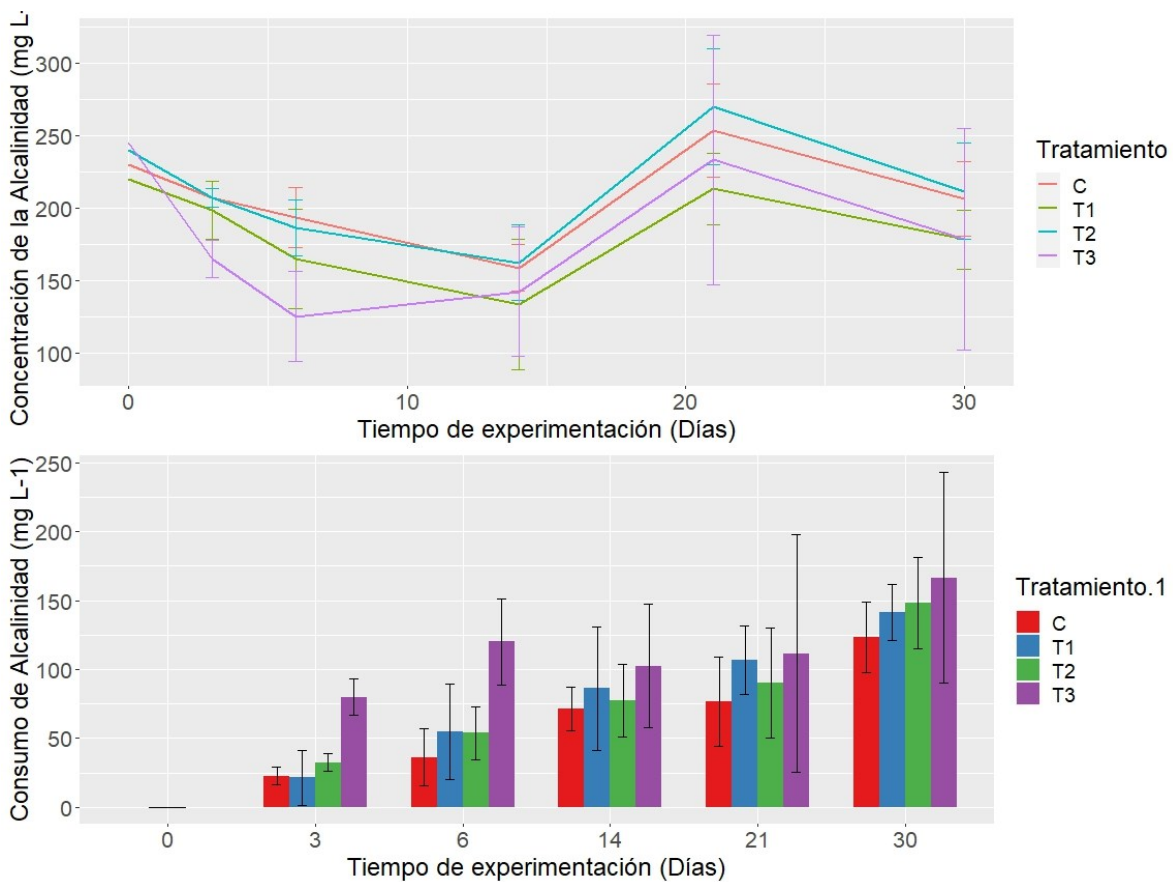


Figura 5 Efecto crónico del Phytobutyryl sobre la concentración y el consumo de alcalinidad en el biofloc durante el periodo experimental.

7.3.2 pH

Se encontraron diferencias significativas en el pH de los diferentes tratamientos (Fig. 6) siendo el T1 el que menor pH presentó ($p < 0.05$), seguido del T3, mientras que el T2 y el grupo control presentaron un comportamiento similar, estas diferencias se vieron atenuadas a partir de la semana 4 donde fue necesario hacer un ajuste en la alcalinidad. Aunque la tendencia siguió de la misma manera. Es de mencionar que los valores de pH no salieron de los parámetros adecuados para la acuicultura en un sistema de cultivo biofloc.

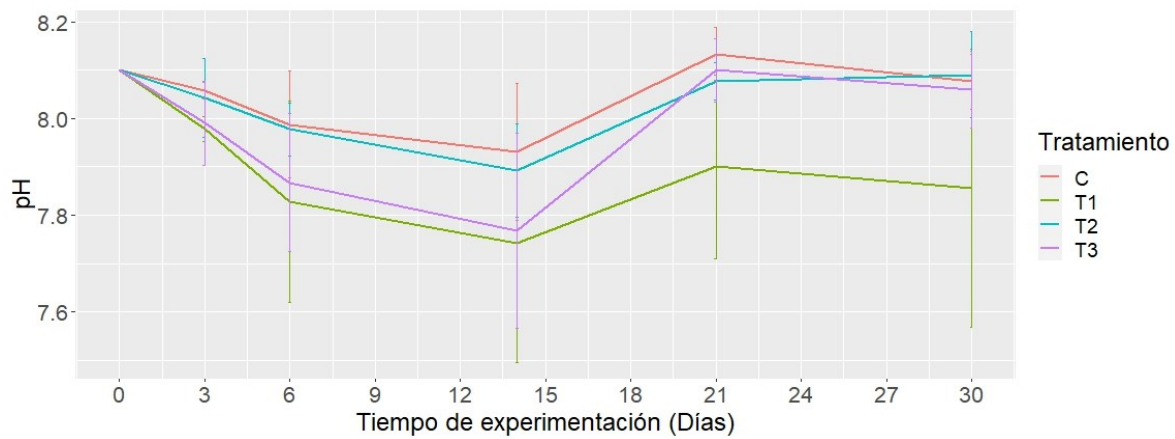


Figura 6. Efecto crónico del Phytobutyryn en la dinámica del pH durante el periodo experimental

7.3.3 Amonio

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de amonio entre los distintos tratamientos y el control ($p > 0.05$) (Fig. 7). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los distintos muestreos. Es de mencionar que los primeros días se observó un aumento en la concentración de amonio la cual con el paso de los días se ajustó a los parámetros adecuados para la acuicultura en un sistema de cultivo biofloc. Este resultado concuerda con el obtenido en el primer experimento donde el consumo de amonio no se vio afectado de manera significativa por la adición de Phytobutyryn en el medio.

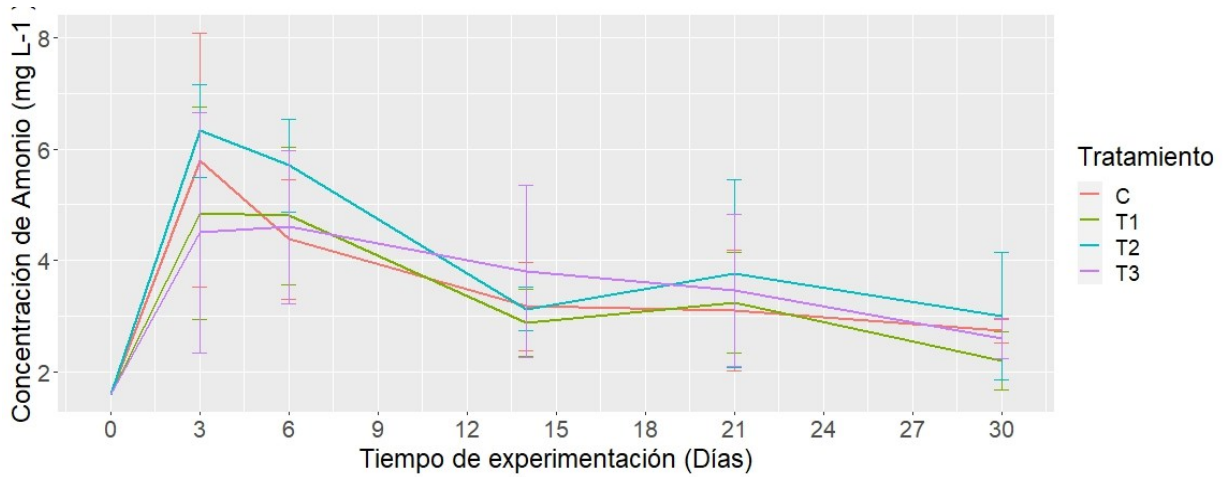


Figura 7 Efecto del Phytobutyryn sobre la dinámica del amonio durante el periodo experimental

7.3.4 Amoniaco

En el caso de la dinámica del amoníaco (Fig. 8) conforme fue transcurriendo el tiempo se puede ver una reducción en la concentración inicial, y después se mantiene constante hacia el final del experimento, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$), pero sí se encontraron diferencias entre los muestreos ($p < 0.05$) teniendo una concentración significativamente mayor al inicio del experimento en comparación con las medidas subsecuentes, en total se encontraron 3 grupos diferentes, el muestreo inicial (0) fue diferente a los demás, seguido de un grupo formado por el muestreo 1 y 2, y otro formado por los muestreos 3, 4 y 5.

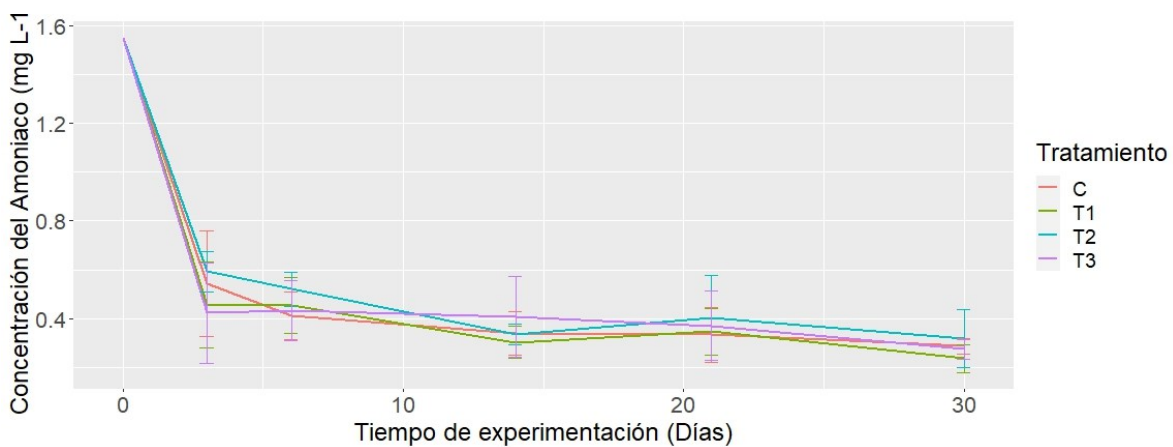


Figura 8 Efecto del Phytybutyrin sobre la dinámica del amoníaco durante el periodo experimental

7.3.5 Nitrito

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de nitrito entre los distintos tratamientos y el control ($p > 0.05$) (Fig. 9). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los muestreos, y las concentraciones de nitrito siempre se mantuvieron en un rango adecuado para un cultivo de camarón en un sistema de cultivo biofloc. Este resultado también concuerda con el obtenido en el primer experimento donde la concentración de nitrito no se vio afectada de forma significativa con la adición Phytobutyryn en el medio.

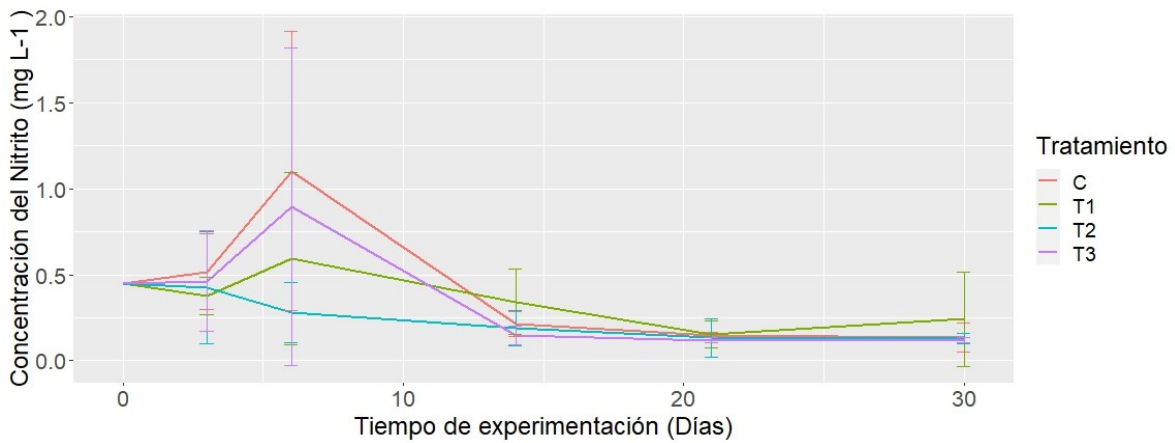


Figura 9. Efecto del Phytobutyryn sobre la dinámica del nitrito durante el periodo experimental.

7.3.6 Nitrato

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de nitrato entre los distintos tratamientos y el control ($p > 0.05$) (Fig. 10). Por otro lado, se encontró diferencias significativas entre la concentración de nitrato al inicio y al final del experimento ($p < 0.05$) este resultado es esperado debido a que es normal la acumulación de nitrato en un sistema biofloc quimiolitotrófico.

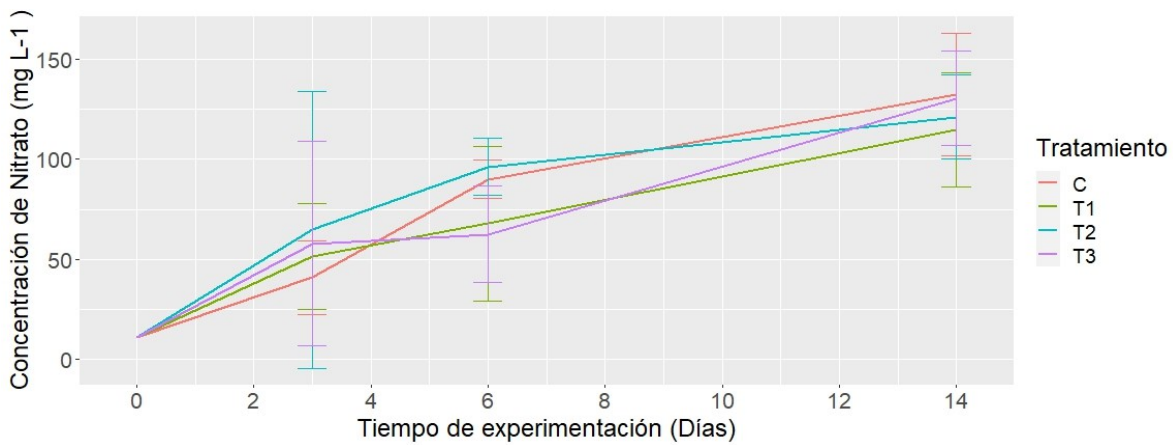


Figura 10. Efecto del Phytobutyryn sobre la dinámica del nitrato durante el periodo experimental.

7.4 Metagenómica

7.4.1 Esfuerzo de muestreo

Para la evaluación del esfuerzo de muestreo se realizó una curva de acumulación de especies mediante la rarefacción de cada muestra (Fig. 11). En todas las muestras se presentó un ligero aplanamiento en las curvas de rarefacción a partir de los 10,000 Otus observados y después de las 80,000 lecturas, en promedio la pendiente de la curva fue de 0.115 ± 0.036 , esto provoca una superposición de las muestras debido a la similitud entre sí.

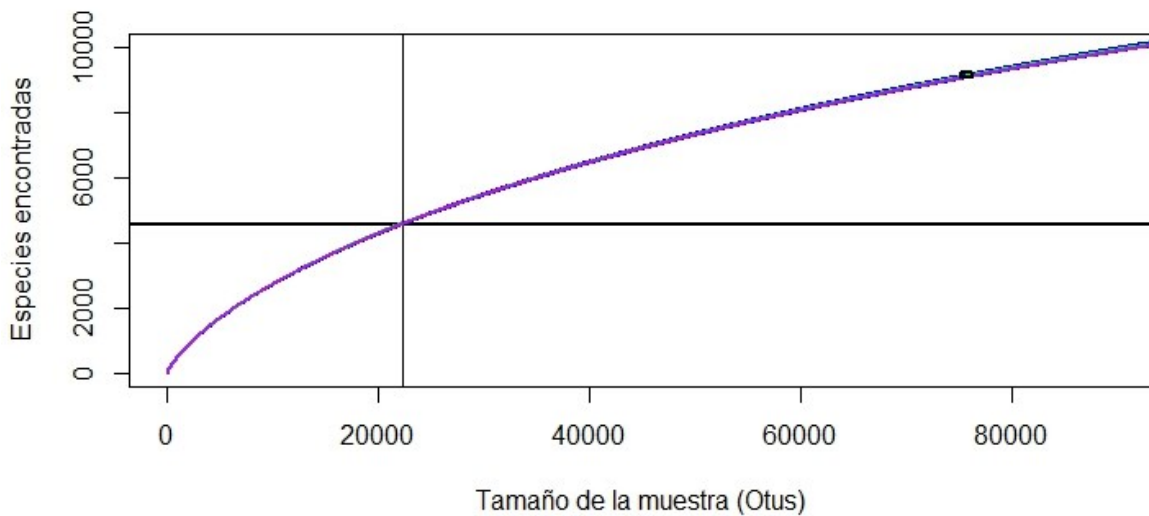


Figura 11. Curvas de acumulación de especies. las distintas unidades de muestreo bajo los 4 tratamientos de phytobutirin el punto de inflexión de la curva está marcado después de las 20,000 muestras, y un rectángulo marca el punto de aplanamiento de la curva, todos los tratamientos tuvieron

7.4.2 Secuenciación

Las muestras fueron procesadas en un secuenciador Illumina miniseq, de donde se obtuvo una base de datos de 4.45GB. Se obtuvieron $n= 2,460,315 \pm 1,405,068$ (promedio \pm desviación estándar) lecturas por muestras de biofloc, en total se obtuvieron 29,523,782 de lecturas, con un valor de calidad $q = 36$. De estas lecturas se ensamblaron $n= 606,255 \pm 366,183$ secuencias por muestra, de las cuales se lograron clasificar $216,731 \pm 159,092$ secuencias promedio por muestra, las secuencias no clasificadas fueron excluidas de los análisis.

7.4.3 Estructura de la comunidad

En total se identificaron OTU's de los 3 dominios conocidos (Procariota, Eucariota y Archaea), además de secuencias de virus. Estos OTUs se dividieron en 196 filums, 224 clases, 529 órdenes, 1,156 familias, 4,420 géneros y 26,017 especies. El tratamiento con mayor número de OTUs fue el tratamiento 3 con una riqueza promedio de $15,368 \pm 2764$, seguido del tratamiento control el cual tuvo el segundo mayor número de OTUs. Los tratamientos 1 y 2 tuvieron una menor riqueza de especies comparados con el control, aunque no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$).

El índice de riqueza de chao1 nos ayuda a estimar la riqueza de la comunidad, ya que toma en cuenta la presencia de especies raras. El tratamiento 3 fue donde el índice de chao alcanzó su valor máximo, seguido por el tratamiento control, y con valores muy similares el tratamiento 1 y 2, no se encontraron diferencias significativas entre el control y los distintos tratamientos. En cuanto al índice de diversidad Shannon se encontraron valores muy similares entre las muestras, en donde el tratamiento 3 tuvo el valor más alto siendo la comunidad más diversa, seguido del tratamiento control, el tratamiento 1 y por último el tratamiento 2. No se encontraron diferencias significativas entre los distintos

tratamientos y el control ($p > 0.05$). Complementando el índice de diversidad de Shannon tenemos el índice de Pielou, el cual evalúa la equitatividad en la distribución de especies, donde el tratamiento 2 tuvo el valor más alto, seguido del tratamiento 1, después el tratamiento control y por último el tratamiento 3. No se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos y el control ($p > 0.05$). Estos datos se encuentran representados en la tabla 1.

Tabla 1. Índices de diversidad alfa de la comunidad bacteriana del biofloc. Muestras del tratamiento con Phytobutylin de tres unidades experimentales diferentes. Sp. Obs: Especies observadas, S. chao1.: índice de riqueza de especies de chao. N.: número total de Otus. Tratamiento Control ($0 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$), Tratamiento 1 ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$), Tratamiento 2 ($1 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$), Tratamiento 3 ($2 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$)

Tratamiento	Sp. Obs	S.chao1	Shannon	Pielou	Inv. Simpson	N
Control	9133	15887.230	6.738	0.739	129.294	75830
Control	12169	18576.997	6.775	0.720	128.586	141530
Control	12893	19894.940	6.793	0.718	128.522	157084
Tratamiento 1	4633	10191.097	6.576	0.779	127.906	22605
Tratamiento 1	11250	17553.886	6.765	0.725	127.176	118861
Tratamiento 1	16483	22382.217	6.826	0.703	129.469	304386
Tratamiento 2	4621	10423.421	6.581	0.780	130.571	22338
Tratamiento 2	11746	18627.801	6.781	0.724	129.097	129222
Tratamiento 2	12612	19314.681	6.789	0.719	129.356	152127
Tratamiento 3	11884	18664.683	6.785	0.723	128.954	133888
Tratamiento 3	15575	22084.646	6.809	0.705	127.121	258690
Tratamiento 3	18645	24339.731	6.832	0.695	128.450	442812
Promedio \pm D.S.	Sp. Obs	S.chao1	Shannon	Pielou	Inv. Simpson	N
Control	11398 \pm 1628	18119.722 \pm 1667	6.768 \pm 0.023	0.726 \pm 0.009	128.8 \pm 0.350	124815 \pm 35215
Tratamiento 1	10788 \pm 4849	16709.066 \pm 5012	6.722 \pm 0.106	0.736 \pm 0.032	128.183 \pm 0.956	148617 \pm 116945
Tratamiento 2	9659 \pm 3580	16121.967 \pm 4039	6.716 \pm 0.096	0.741 \pm 0.028	129.674 \pm 0.643	101229 \pm 56563
Tratamiento 3	15368 \pm 2764	21696.353 \pm 2333	6.808 \pm 0.019	0.708 \pm 0.012	128.174 \pm 0.773	278463 \pm 126890

7.4.4 Abundancia relativa Dominio

Se identificaron en total 2,600,778 Otus, entre organismos celulares y Virus (Fig. 12) La mayoría de los organismos ($97.9 \pm 0.9 \%$) pertenecieron al dominio Bacteria, seguido del dominio Eukaryota ($1.8 \pm 1\%$), y por último el dominio Archaea ($1.5 \pm 0.02\%$). Esto por parte de los organismos celulares mientras que los Virus representan el ($0.07 \pm 0.03\%$).

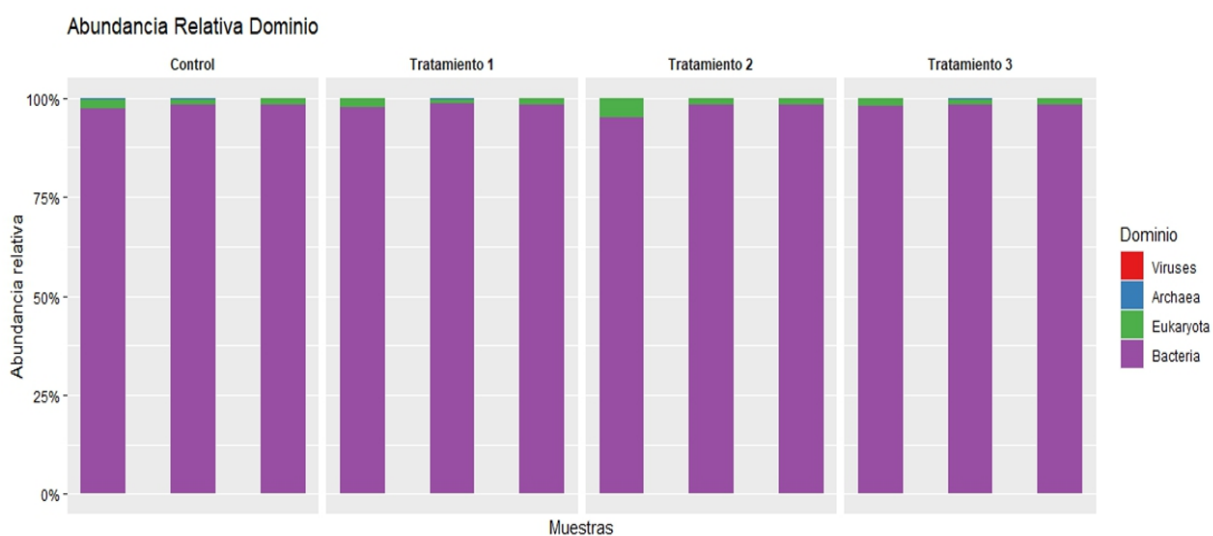


Figura 12. Gráfica de la abundancia relativa de los Dominios presentes en la comunidad, los tratamientos C (0 mg Kg^{-1}), T1(0.5 mg Kg^{-1}), T2(1 mg Kg^{-1}), T3 (2 mg Kg^{-1})

7.4.5 Abundancia relativa Phylums

La comunidad bacteriana quedó representada en un 95% por un total de 10 Phylums, mientras que el 5 % restante se divide en 185 phylums restantes, y aunque los porcentajes de abundancia relativa varían entre muestras y tratamiento, la presencia de los phylums es constante (Fig.13).

Los 10 phylums con mayor abundancia fueron las Actinobacterias (48 – 9%), seguido por Proteobacterias (36 – 21%), Planctomycetes (24 – 6%), Bacteroidetes (12 – 1%), Chloroflexi (6 % – 2 %), Nitrospirae (5 - 0.5%), Cyanobacteria (3 – 0.8 %), Firmicutes (1 – 0.6%), Cholorophyta (4 – 0.5%), otras (5.5 - 2.1%).

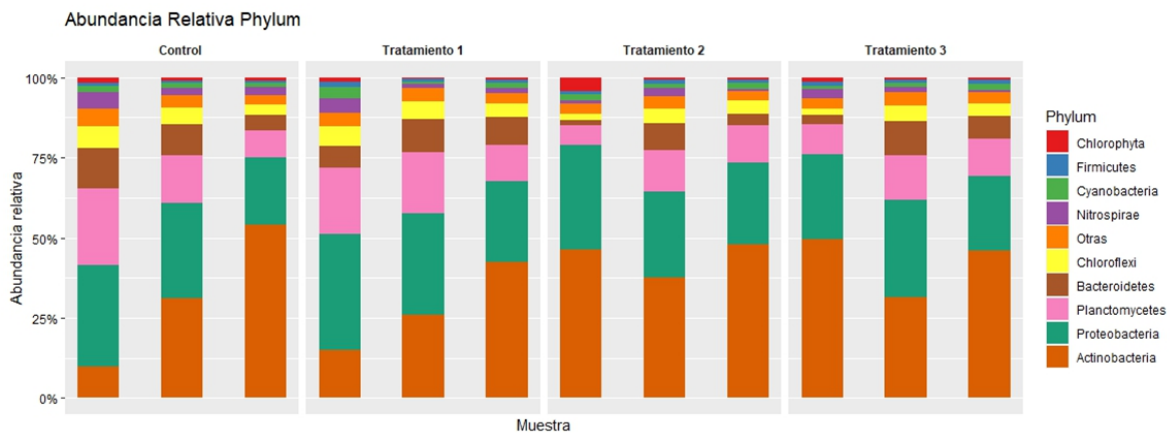


Figura 13 Gráfica de la abundancia relativa de los phylums presentes en la comunidad. Los tratamientos C (0 mg Kg⁻¹), T1(0.5 mg Kg⁻¹), T2(1 mg Kg⁻¹), T3 (2 mg Kg⁻¹). Los 9 phylums representan al menos el 1% de la comunidad

7.4.6 Abundancia relativa Clase

La comunidad bacteriana del biofloc fue representada entre un 90 y un 60 % por 9 clases, entre las cuales solamente 4 alcanzaron el 1% de la población en todas las muestras. Y aunque los porcentajes varían entre las muestras y los tratamientos, la presencia de las clases es constante y sigue los patrones antes vistos en la abundancia de los phylums (Fig.14).

Las más importantes fueron Actinomycetia (50 – 10%), Alphaproteobacteria (25 – 14%), Gammaproteobacteria (12 – 3%), Flavobacteria (14 – 0.3%), Betaproteobacteria (7 – 2%), Bacilli (5 – 0.1%), Cytophagia (4 – 0.1%), Deltaproteobacteria (2 – 0.5%), Planctomycetes (29 – 0.01%), los porcentajes restantes se dividen entre las 213 clases diferentes.

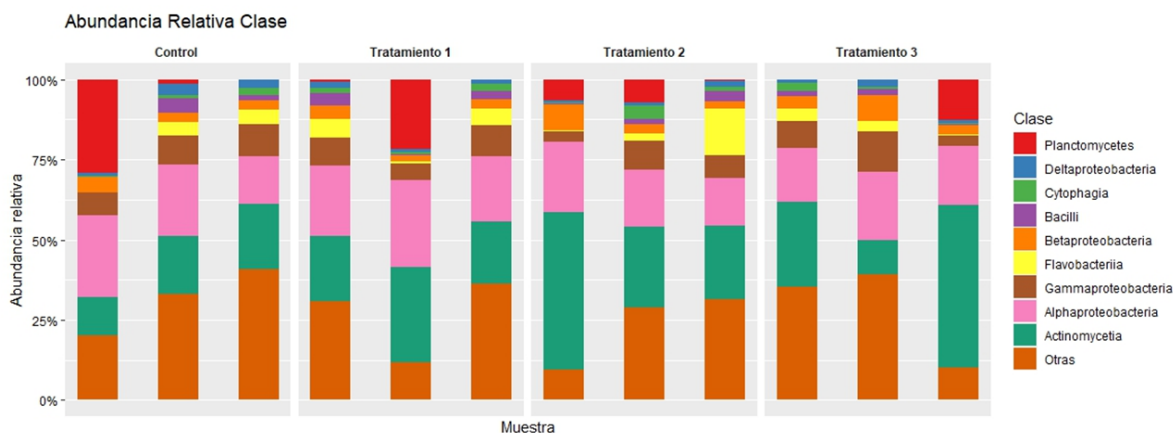


Figura 14. Gráfica de la abundancia relativa de las clases presentes en la comunidad. Los tratamientos C (0 mg Kg⁻¹), T1(0.5 mg Kg⁻¹), T2(1 mg Kg⁻¹), T3 (2 mg Kg⁻¹).

7.4.7 Abundancia relativa Familias

Solo 9 familias representaban al menos 1% de la población total de la comunidad, y en conjunto acumularon entre el 53% y el 70%. Y aunque los porcentajes varían entre las muestras y los tratamientos, la presencia de las clases es constante y sigue los patrones antes vistos en la abundancia de las clases (Fig.15).

Las clases más abundantes fueron Mycobacteriaceae (40 – 5%), Microbacteriaceae (11 – 2%), Ilumatobacteriaceae (12 – 1%), Flavobacteriaceae (12 – 1%), Lacipirellulacea (11– 3%), Phyllobacteriaceae (10 – 3%), Roseobacteraceae (5 – 3%), Planctomycetaceae (7 – 1%), Nitrosomonadaceae (7 – 1%), el porcentaje restante se divide entre 1,146 familias diferentes.

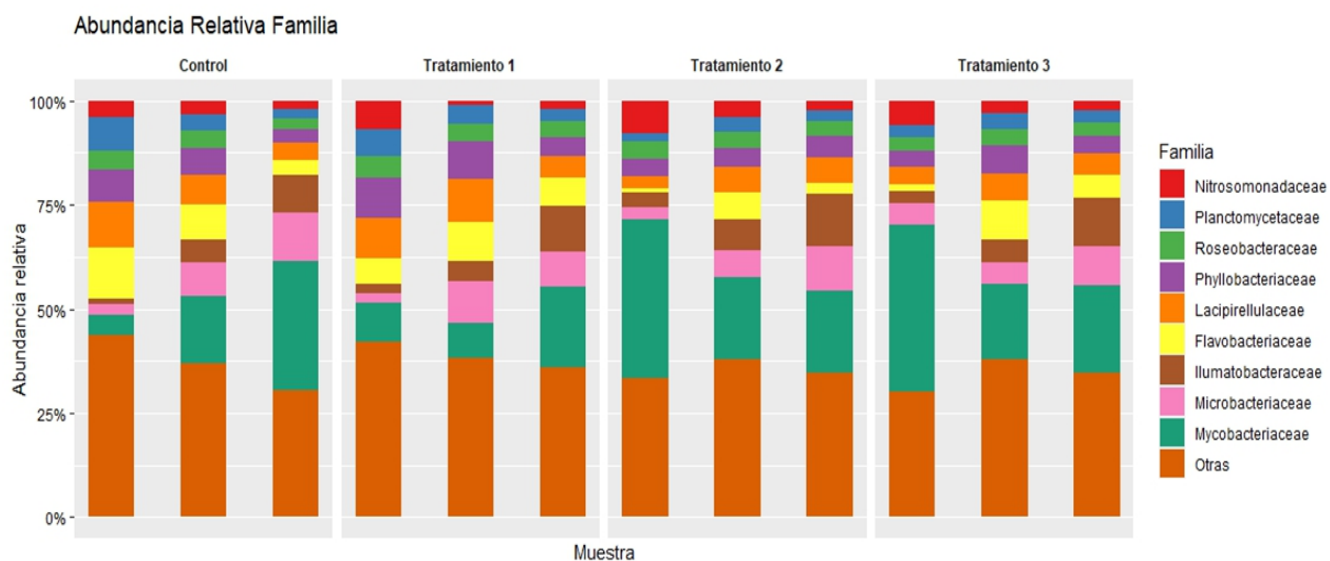


Figura 15. Gráfica de la abundancia relativa de familias presentes en la comunidad. Los tratamientos C (0 mg Kg⁻¹), T1(0.5 mg Kg⁻¹), T2(1 mg Kg⁻¹), T3 (2 mg Kg⁻¹)

7.4.8 Abundancia relativa de géneros.

Los 9 géneros más abundantes en la población acumularon entre el 63% y el 27% del total de la población, y aunque los porcentajes varían entre las muestras y los tratamientos, la presencia de los géneros es constante y sigue los patrones antes vistos en la abundancia de las familias (Fig.16).

Los géneros más abundantes fueron Mycolicibacterium (19 – 2%), Microbacterium (11 – 2%), Ilumatobacter (13 – 1%), Mycobacterium (13 – 1%), Methyloceanibacter (6 – 2%), Bythopirellula (6 – 1%), Nitrosomonas (8 – 1%), Hoeflea (6– 1%), Muricauda (4 – 0.1%), el porcentaje restante se divide entre 4,411 géneros diferentes.

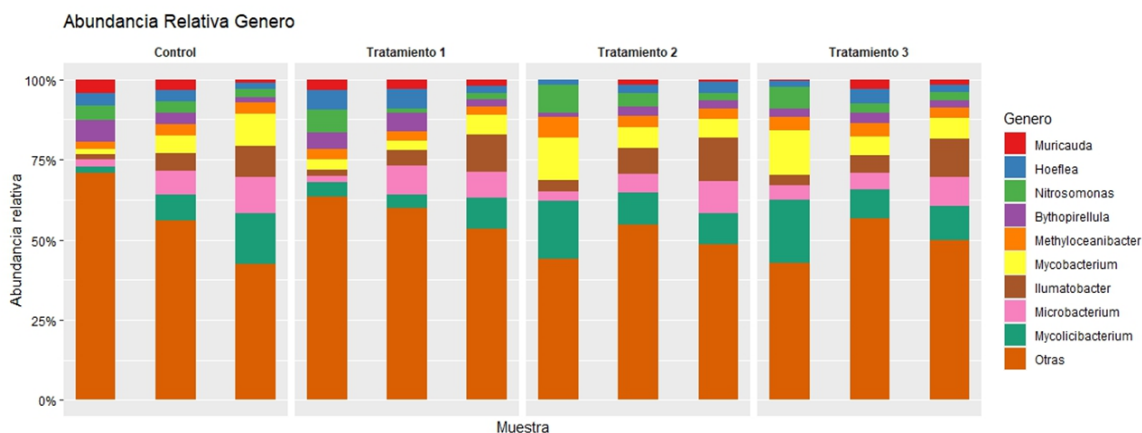


Figura 16 Gráfica de la abundancia relativa de Géneros presentes en la comunidad. Los tratamientos C (0 mg Kg⁻¹), T1(0.5 mg Kg⁻¹), T2(1 mg Kg⁻¹), T3 (2 mg Kg⁻¹)

7.4.9 Abundancia relativa especie

Los 9 géneros más abundantes en la población acumularon entre el 31% y el 34% del total de la población, y aunque los porcentajes varían entre las muestras y los tratamientos, la presencia de las especies es constante y sigue los patrones antes vistos en la abundancia de los géneros (Figura 17).

Las 9 especies más abundantes de la comunidad fueron *Ilumanobacter fluminis* (9 – 0.8%), *Nitrospirales bacterium* (6 – 0.5%), *Hoeflea sp.* (5 – 1%), *Chloroflexi bacterium* (3 – 0.9%), *Nitrosomonas sp.* (8 – 0.9%), *Actinobacteria bacterium* (2 – 0.5%), *Mycolicibacterium hippocampi* (3 – 0.2%), *Planctomycetes bacterium* (3 – 0.8%), *Bythopirellula goksoeyrii* (3 – 0.9%), el porcentaje restante se divide entre 26,008 especies diferentes.

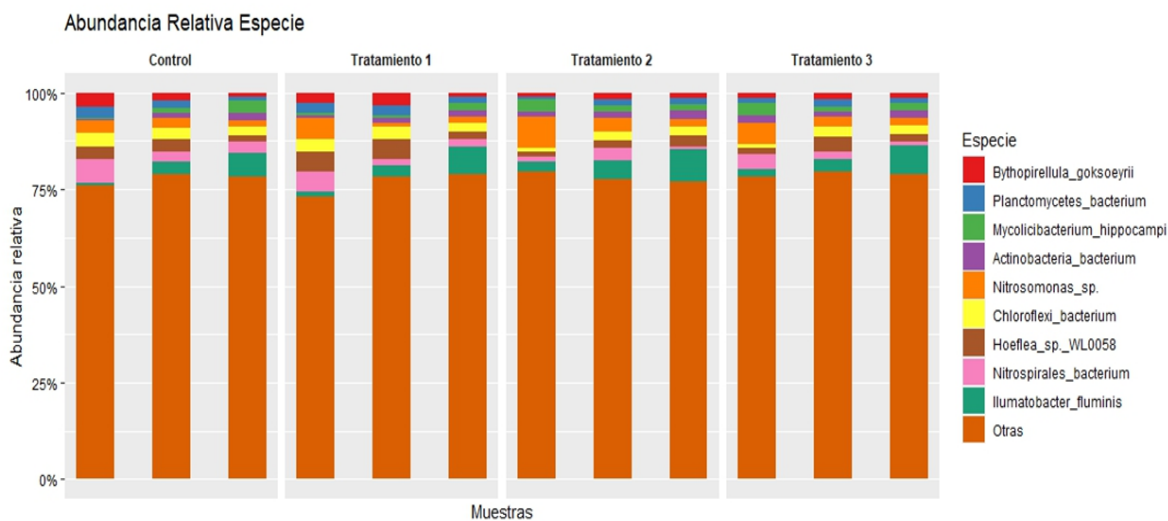


Figura 17. Gráfica de la abundancia relativa de especies presentes en la comunidad.

Los tratamientos C (0 mg Kg⁻¹), T1(0.5 mg Kg⁻¹), T2(1 mg Kg⁻¹), T3 (2 mg Kg⁻¹)

7.5 Diversidad beta.

7.5.1 PCoA

El análisis de coordenadas principales (Fig. 18) mostró que el estrés provocado por el Phytobutyryn sobre los cambios en la comunidad fue muy pequeño en cualquiera de los tratamientos (stress = 0.0014), por lo que las variaciones entre tratamientos no pueden ser adjudicadas al efecto del Phytobutyryn. En la gráfica podemos ver cómo los 4 tratamientos se concentran en un solo punto y aunque se pueden observar que los tratamientos control y el tratamiento 1 tienden a alejarse estas variaciones no son significativas.

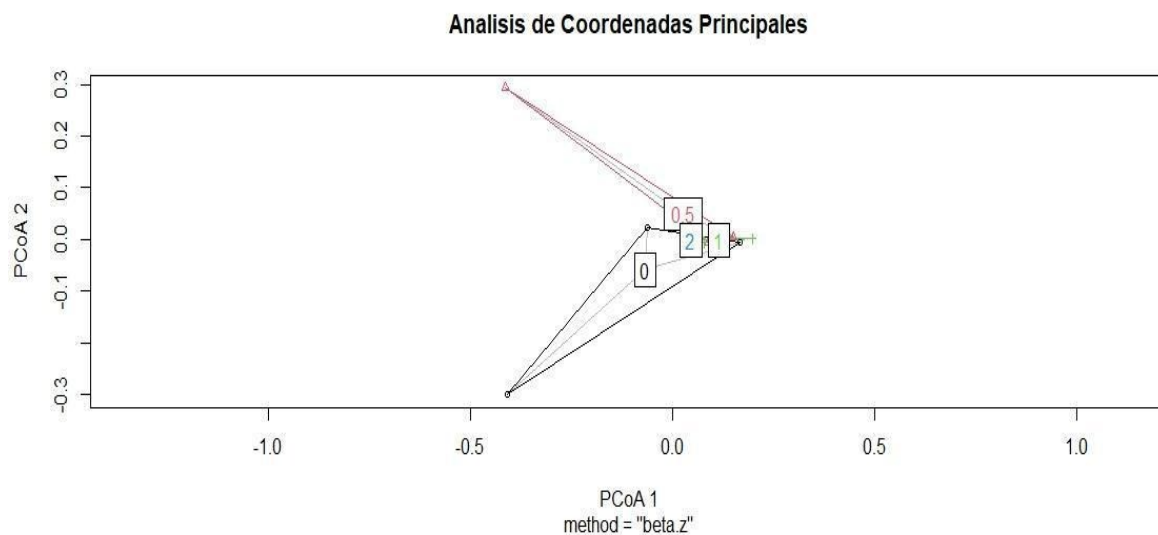


Figura 18. Análisis de coordenadas principales, se consideraron las especies presentes en cada tratamiento para modelar la comunidad en función de las variables ambientales consideradas fueron: Temperatura, Salinidad, oxígeno disuelto, las concentración de amonio, nitrito y nitrato, y los tratamientos de Phytobutyryn C (0 mg Kg⁻¹), T1(0.5 mg Kg⁻¹), T2(1 mg Kg⁻¹), T3 (2 mg Kg⁻¹).

7.5.2 ANOSIM

El análisis de similitud (ANOSIM) (Fig. 19) se puede apreciar que a mayor concentración de Phytobutyryn existe una menor variabilidad al interior de la muestra, lo cual coincide con lo encontrado en el análisis PCoA. Sin embargo, las diferencias entre las comunidades de los distintos tratamientos no fueron significativas ($P > 0.05$).

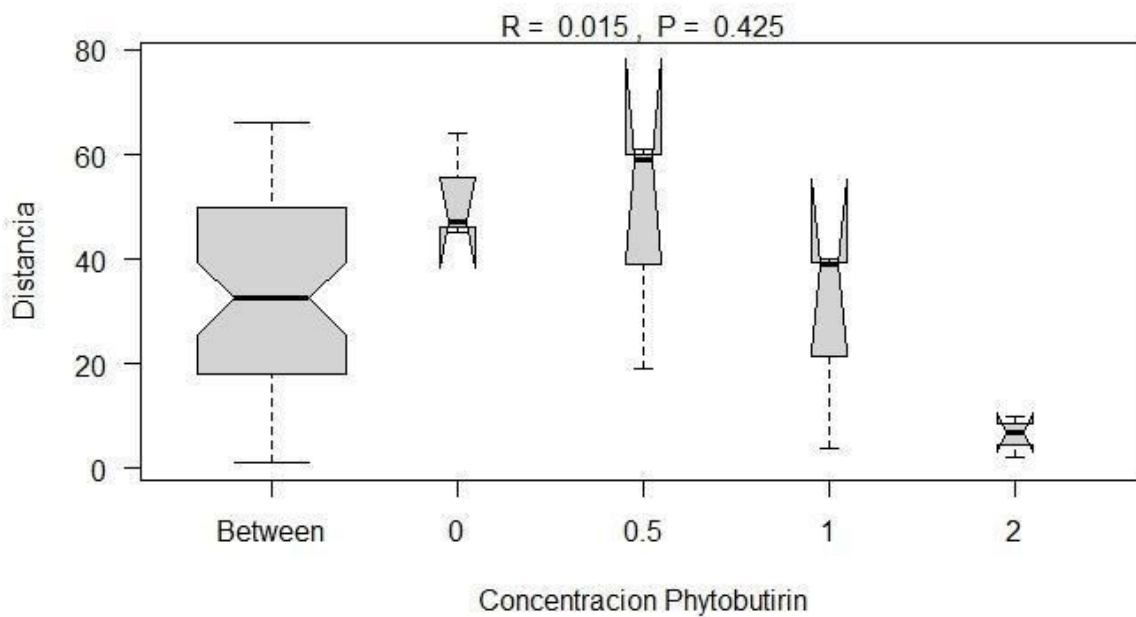


Figura 19. Gráfica representando la disimilitud entre comunidades de acuerdo con la concentración de Phytobutyryn C (0 mg Kg⁻¹), T1(0.5 mg Kg⁻¹), T2(1 mg Kg⁻¹), T3 (2 mg Kg⁻¹).

7.5.3 Análisis de Jaccard

La matriz de similitud de Jaccard se representa con un dendograma (Fig. 20) en donde, se puede apreciar que existen 3 ramas principales, el tratamiento control se agrupa al centro y los distintos tratamientos empiezan a alejarse. El tratamiento 3 y el tratamiento uno fueron los que más se alejaron del grupo control, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el ANOSIM, sin embargo, la alta variabilidad intra-grupos no permite que se puedan diferenciar por completo

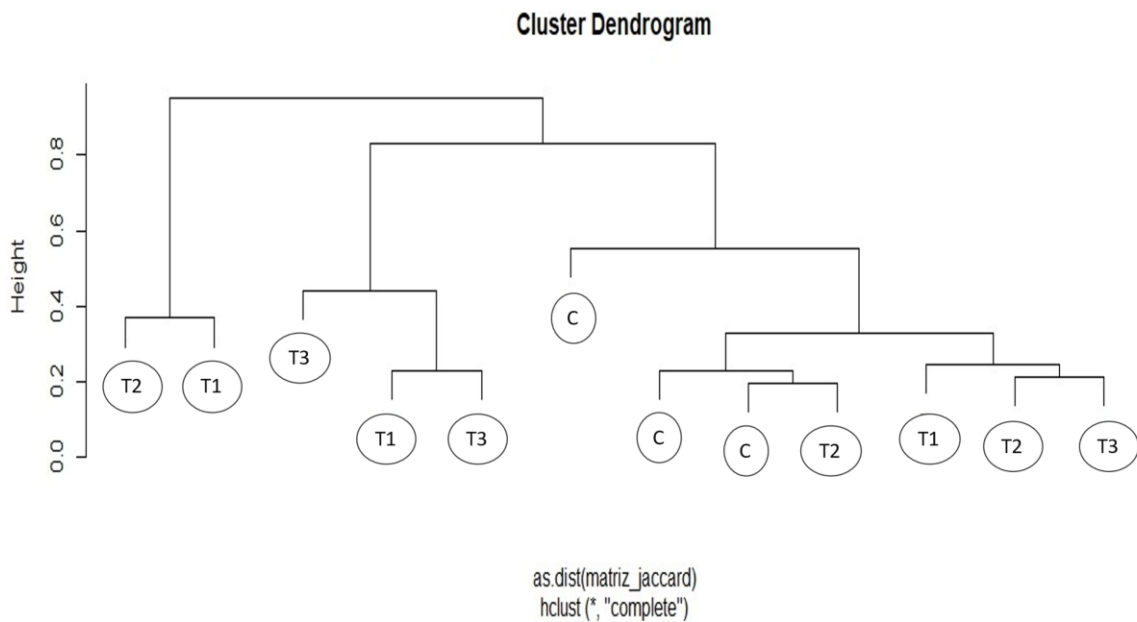


Figura 20. Dendograma representando la disimilitud mínima entre muestras. Se construyó a través de una matriz de similitud de Jaccard, utilizando la base de datos de especies de cada una de las muestras y comparando su presencia o ausencia en las diferentes muestras para establecer las diferencias entre ellas. De acuerdo con la concentración de Phytobutyryn C (0 mg Kg⁻¹), T1(0.5 mg Kg⁻¹), T2(1 mg Kg⁻¹), T3 (2 mg Kg⁻¹).

8. Discusión

8.1 Calidad del agua

Los sistemas de cultivo Biofloc representan una opción para reducir el consumo de agua en la acuicultura, debido a que la comunidad bacteriana contiene los grupos funcionales necesarios para poder consumir los compuestos nitrogenados (Kim et al., 2014). El consumo de alcalinidad es parte del metabolismo de las bacterias heterotróficas y nitrificantes, presentes en el biofloc, las cuales, se han descrito que por cada gramo de nitrógeno convertido en biomasa bacteriana se consumen 3.57 g de alcalinidad (Ebeling et al., 2006).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, el Phytobutyryn incrementó significativamente el consumo de alcalinidad, lo que podría estar indicando un aumento en el metabolismo bacteriano, lo cual traería consigo un mayor consumo de amonio. El consumo de alcalinidad por la comunidad bacteriana del biofloc es una variable a tener en cuenta en los sistemas productivos ya que en el caso del cultivo de camarón *P. vannamei*, se recomienda mantener una alcalinidad mayor a $100 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ con el fin de mantener un desarrollo ideal en los camarones (Vinatea et al., 2010), por lo que habría que considerar el aumento en el consumo de alcalinidad en el caso del uso de Phytobutyryn en un sistema de cultivo biofloc.

El pH es una variable que puede afectar de distintas maneras a los organismos en la acuicultura, ya sea directa o indirectamente ya que la toxicidad del amonio es dependiente del pH del medio (Wilkie, 2002), se ha reportado que con el aumento en la densidad de cultivo viene un aumento en la tasa de respiración, aumentando el CO_2 , lo que ocasiona una acidificación del medio (Mcintosh et al., 2000) este comportamiento en la dinámica del pH coincide con los resultados obtenidos en este experimento, donde se

puede notar un acoplamiento en la dinámica del pH y la alcalinidad, cuando se agregó bicarbonato de sodio para corregir la alcalinidad también se observa un aumento en el pH, y con el consumo de alcalinidad se ve un aumento en la acidez del medio, sin salir del umbral adecuado para el desarrollo de la acuicultura.

El control de los compuestos nitrogenados es de vital importancia para los sistemas acuícolas, debido a la toxicidad que pueden presentar sobre las especies cultivadas cuando se alcanzan concentraciones elevadas (Ip y Chew, 2010). En sistemas de cultivo biofloc el amonio es oxidado en nitrito y nitrato por bacterias nitrificantes (Avnimelech, 1999).

En los resultados obtenidos tanto en el experimento sobre el efecto agudo del Phytobutyryn como en el efecto crónico, no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato entre el uso de distintas concentraciones de Phytobutyryn y el grupo control. Esto podría indicar que si bien el uso del cinamaldehído, carvacrol y ácido butírico pueden provocar cambios en la microbiota (Zaminhan-Hassemer et al., 2022), esto no tiene un efecto significativo en las bacterias nitrificantes, ya que los resultados obtenidos concuerdan con las dinámicas normales de los compuestos nitrogenados en sistemas de cultivo intensivos tanto en sistemas biofloc como sistemas RAS (Luo et al., 2014, 2017).

Por último, en la concentración de nitrato no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos y el control, existiendo una acumulación paulatina entre el inicio y el final del experimento, lo cual concuerda con un sistema de cultivo BFT maduro de acuerdo con lo descrito por Ferreira et al. (2021).

8.2 Metagenómica

La comunidad bacteriana del biofloc tiene una gran riqueza de especies ya que en promedio se identificaron más de 11,000 especies diferentes en los distintos tratamientos,

y aunque no existieron diferencias significativas en la riqueza de especies, entre tratamientos, la comunidad con mayor riqueza de especies fue el tratamiento 3 (15,368), y el tratamiento con menor riqueza fue el tratamiento 2 (9,659). Se ha reportado que, aunque la diversidad bacteriana no cambia ante la aparición de una enfermedad, esta si disminuye conforme progresa la enfermedad (Xiong et al., 2017). Se ha reportado también que conforme disminuye la diversidad, potenciales patógenos como *Vibrio spp* suelen aumentar su abundancia. (Dai et al., 2018).

A pesar de que el índice de Chao1 registrado en este trabajo mostró que existe una gran riqueza de especies, el índice indica que la riqueza potencial podría haber sido mayor, ya que, de acuerdo con Koleff et al., (2003) podríamos estar subestimando la riqueza, debido a la gran cantidad de especies que fueron encontradas en una sola ocasión. También debe de considerarse que, en los estudios de comunidades microbianas, se trabaja con OTUS, por lo que la presencia de organismos con una sola lectura podría deberse también a errores de identificación, ya que se ha reportado que distintas cepas de una misma especie bacteriana pueden presentar micro-divergencias en el genoma (Berg et al., 2015).

En este estudio se encontró que el phytobutylin no tuvo un efecto en la diversidad α . Aunque el tratamiento 3 fue la comunidad con el índice de Shannon más elevado (6.80). El índice de Shannon pone un mayor peso en la riqueza de especies, por lo que, es de esperarse que el tratamiento 3 sea la comunidad más diversa al tener un mayor número de especies (15,368). Mientras que los tratamientos 2 y 1 sean los que menor diversidad presentan (6.71) y (6.72) al ser también los tratamientos con menor riqueza de especies (9,659) y (10,788) respectivamente. Luo et al. (2017) realizaron un análisis de diversidad de la comunidad bacteriana de un sistema BFT donde reportaron índices de diversidad α entre 5.21 y 5.59, estos resultados, aunque nos dan una idea de la diversidad presente en

los sistemas BFT no son del todo comparables debido a que en este estudio se utilizaron la secuenciación del gen 16S rRNA para hacer la asignación taxonómica. Se ha reportado que la comparación entre comunidades identificadas mediante la secuenciación de genomas completos y la secuenciación del gen 16S rRNA no son directamente comparables, aunque ambas proveen una perspectiva de la composición de la comunidad. (Shan et, al.2010)

También se encontró que la comunidad del biofloc presenta una equitatividad muy elevada en la distribución de especies, ya que el índice de Pielou, en todos los tratamientos presentó un valor cercano a 1, en promedio los tratamientos tuvieron un valor de 0.72. siendo el tratamiento 2 el más equitativo (0.74), mientras que el tratamiento 3 fue el menos equitativo (0.70) y aunque las diferencias entre tratamientos no fueron significativas, el aumento en la riqueza del tratamiento 3, aumentó también la presencia de especies raras, mientras que no afectó la abundancia de las especies más comunes en la comunidad provocando así una ligera disminución en la equitatividad de la comunidad.

Se ha reportado la importancia de las especies raras en los ecosistemas, ya que, en ecosistemas con una alta diversidad, las especies raras suelen llevar a cabo funciones redundantes en el ecosistema, sirviendo de amortiguador ante la pérdida de especies, y asegurando la funcionalidad del ecosistema ante cambios en las condiciones ambientales en un futuro (Mouillot et al., 2013).

De acuerdo con los resultados obtenidos la mayoría de los Otus identificados pertenecen al dominio Bacteria (97.9 % \pm 0.9) seguido del Eukarya, Archaea y virus este resultado coincide con otras investigaciones donde se confirma la dominancia del dominio bacteria en la comunidad del biofloc, (Meenakshisundaram et al., 2021) también reporta el mismo patrón en la distribución de los dominios, aunque las proporciones son menores ya que reporta que el dominio bacteria representa el 70 %. Esta variación puede deberse a

distintos factores, desde las variaciones entre la metodología entre los estudios, la fuente de carbono empleada para mantener la comunidad o la especie cultivada en el sistema biofloc.

Se encontró que el dominio más abundante de la comunidad fue el phylum Actinobacteria este phylum de bacterias gram positivas, se caracteriza por la formación de filamentos y es uno de los linajes más abundantes dentro del dominio bacteria, la mayoría de estos organismos son organismos aeróbicos, aunque también existen anaerobios facultativos o anaerobios. La mayor parte de estos organismos pertenecen a la clase Actinomycetia, y las familias Mycobacteriaceae, Microbacteriaceae, Ilumatobacteraceae (Hazarika y Thakur, 2020), las cuales estuvieron también entre las más abundantes de la comunidad.

Las Actinobacterias suelen ser organismos saprobios, por lo que juegan un papel muy importante en la degradación de compuestos orgánicos como: polisacáridos, celulosa, almidón, quitina, ácidos orgánicos, proteínas, grasas etc. (Hazarika y Thakur, 2020). Se ha reportado que las Actinobacterias pueden producir fijimicinas A-C, Etamicina, neosidomicina, heronamicina y essramicina, las cuales tienen un efecto antimicrobiano ante staphilococcus, Bacillus, enterococcus, E.coli y micrococcus (Hassan et al., 2017; McArthur et al., 2008; Schumacher et al., 2001), se ha reportado la presencia constante del phylum actinobacteria en el tracto digestivo del camarón (*Penaeus vannamei*), siendo más abundante en organismos sanos (Xiong et al., 2015) por lo que su abundancia en el sistema podría ser un buen indicador de la comunidad.

El siguiente phylum más abundante fueron las Proteobacterias. Este phylum contiene a la gran mayoría de las bacterias gram negativas, abarcando una gran diversidad de morfologías y metabolismos (Gupta, 2000), siendo de gran importancia en los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno y azufre (Spain et al., 2009).

El phylum Proteobacteria estuvo representado por 4 de sus 6 clases: Alphaproteobacteria, Gamma Proteobacteria, Betaproteobacteria y Deltaproteobacteria las cuales estuvieron entre las 10 familias más abundantes de la comunidad. Mientras que las familias Roseobacteraceae, Phylobacteriaceae, Nitrosomonadaceae, fueron de las más abundantes en la comunidad, Estas familias se ha reportado su relevancia en los ciclos de carbono y nitrógeno (Feng y Xing, 2023; Mustaq et al., 2023).

Las Proteobacterias por su parte se ha reportado que pueden producir antimicrobianos como thiomarinol, aqabamicinasA – D, E, F y G, holomicina, miuraenamidas A y B, teniendo efecto en Bacillus, E. coli, Micrococcus, hongos y levaduras (Liao et al., 2009; Nair et al., 2017; Naoya et al., 2008). Se ha reportado en otros estudios como el phylum más abundante en los sistemas de cultivo biofloc (Meenakshisundaram et al., 2021) teniendo invertida la jerarquía entre proteobacteria y actinobacteria, pero ambos siendo los dos phylums más abundantes en el sistema de cultivo biofloc.

El phylum planctomycetes fue el tercer phylum más abundante en la comunidad de biofloc, se ha reportado la presencia de este phylum en una gran variedad de ambientes y está relacionado con la degradación de polisacáridos complejos y materia orgánica (Li et al., 2014), por lo que la presencia de este phylum aumenta en ambientes donde existe una acumulación de fuentes de carbono como la nieve marina o los sedimentos marinos en donde su actividad está relacionada con el ciclaje del carbón y el nitrógeno (Vigneron et al., 2017). En los resultados obtenidos aparecen junto a las clases más abundantes Planctomycetes, y también a nivel de familia con la familia Planctomycetaceae.

La presencia de los planctomycetes en la acuicultura se ha reportado con anterioridad, representando el 10% de la comunidad bacteriana en los sistemas de cultivo intensivo de camarón *Peneaus Vannamei* (Zeng et al., 2017). Planctomycetes se ha demostrado que tienen el potencial de producir péptidos no ribosomales, bacteriocinas y

terpenoides, aunque debido al complicado ciclo de vida y la falta de estudios, aunque se sabe que pueden producir compuestos bioactivos, no se han identificado las estructuras moleculares (Fuerst y Sagulenko, 2011; Jeske et al., 2013, 2016)

El phylum Bacteroidetes está formado en su mayoría por bacterias Gram negativas y se ha caracterizado como uno de los grupos predominantes en el bacterioplancton heterotrófico, colonizando partículas de materia orgánica (Krieg et al., 2010) por que suelen estar asociados a los florecimientos algales (O'Sullivan et al., 2004) y han sido asociados al metabolismo de amonio en sistemas Biofloc (Cardona et al., 2016). En los resultados obtenidos se encontraron dos clases de este phylum dentro de las más importantes Flavobacteria y Cytophaga.

Mientras que los organismos de la clase Flavobacteria están asociados con el metabolismo y mineralización de carbohidratos, proteínas y lípidos (Dworkin et al., 2006), la Clase Cytophaga tiene un metabolismo heterotrófico (Kirchman, 2006), recientemente se ha descubierto dentro de la clase Cytophaga organismos capaces de producir pontifactina, un lipopéptido el cual presenta actividad antimicrobiana, (Balan et al., 2016).

El phylum Chloroflexi está formado por bacterias gram negativas, siendo encontradas en una gran variedad de ambientes como los sedimentos marinos y lacustres, tapetes microbianos, drenajes, sistemas de tratamiento de agua y biofiltros. Siendo organismos principalmente fotoheterotróficos y/o quimiolitoheterotrófico (Hug et al., 2013). Se ha reportado que estos organismos son abundantes en sistemas nitrificantes (Yamada y Sekiguchi, 2009).

Los 5 phylums más abundantes en el sistema han sido reportados en otros estudios como parte importante de la comunidad del biofloc (Cardona et al., 2016;

Meenakshisundaram et al., 2021). Aunque las proporciones en la abundancia relativa obtenidas en este estudio no coinciden con las reportadas en estudios previos.

El phylum Nitrospira, es el phylum con mayor distribución y diversidad de bacterias nitrificantes, a través de la oxidación de amonio y subsecuentemente la oxidación de nitrito a nitrato (Watson et al., 1986), los resultados obtenidos indican que, aunque no es de los phylums más abundantes representando alrededor del 5% de la abundancia total, dos de las 10 especies más abundantes encontradas en el muestreo pertenecen a este phylum. Se ha reportado que estos organismos son comunes en ambientes con altas concentraciones de amonio y nitrito, por lo que están asociados a sistemas de tratamiento de agua. (Koch et al., 2015).

Los phylums Cianobacteria y Chlorophyta aparecen en el sistema en abundancias variables entre el 4 y el 0.5%, ambos phylums se caracterizan por ser fotoautótrofos, utilizando el agua como donador de electrones para producir energía y desechar oxígeno, ambos son abundantes en cuerpos de agua iluminados. (Shah et al., 2020; Zwirgmaier et al., 2007). Las cianobacterias se caracterizan por la producción de clorofila α , además de pigmentos secundarios como la phycocianina lo que les da su característico color verde azulado, tienen la capacidad de utilizar un flujo bajo en fotones para realizar la fotosíntesis, además de tener la habilidad de fijar nitrógeno atmosférico en estructuras especializadas llamadas heterocistos (Whitton y Potts, 2012)

Aunque existen riesgos en la presencia de Cianobacterias en el medio debido a la producción de toxinas, las cuales pueden ser dañinas para el consumo humano y para otros organismos en el caso de un florecimiento de cianobacterias, su presencia en bajas proporciones no conlleva ningún riesgo (Kerbrat et al., 2011). Se ha reportado que los florecimientos de este tipo de organismos suelen ocurrir en aguas oligotróficas tropicales (Capone et al., 1997) por lo que es menos probable que ocurran en un ambiente rico en

nutrientes como es un sistema biofloc. Cyanobacteria pueden producir Ambiguina K y Ko, además de isonitrilos, los cuales tienen un potente efecto antimicrobiano en contra de *Mycobacterium* (Mo et al., 2009). También se ha visto que pueden producir Lyngbya las cuales tienen un efecto inhibitor en el quorum sensing de las pseudomonas (Choudhary et al., 2017).

El Phylum Chlorophyta incluye a todas las algas verdes, las cuales se caracterizan por poseer tanto clorofila α como β y contar con una gran variedad de adaptaciones lo que les permite resistir condiciones ambientales adversas como el clima, salinidad, pH, disponibilidad de luz, y bajas concentraciones de CO₂, estas adaptaciones las hacen un grupo pueden producir una gran variedad de metabolitos secundarios siendo de gran interés para muchas industrias (Shah et al., 2020), la presencia de este phylum en plantas de tratamiento de agua se ha reportado con anterioridad, así como su capacidad de remover amonio y ortofosfatos en el agua (Ji et al., 2019).

El phylum Firmicutes está formado por bacterias gram positivas, siendo comunes en cualquier ambiente acuático, presentando un crecimiento rápido tanto en medios líquidos como en sedimentos. La clase Bacilli fue de las clases más abundantes encontradas en este estudio. Dentro de uno de los géneros más importantes de esta clase se encuentra el género *Bacillus*, debido a la gran cantidad de metabolitos secundarios que pueden producir (Ntougias et al., 2000).

Los metabolitos secundarios de *Bacillus* tienen efectos antibacterianos y antivirales, siendo eficaces tanto para bacterias gram positivas como negativas (Mondol et al., 2011). Firmicutes producen una gran variedad de marcolactinas (A, F, K, G-M, O-R, S y V) teniendo efecto antimicrobiano en contra de *Bacillus*, *Staphilococcus*, *E.coli*, (Gao et al., 2010; Nagao et al., 2001; Zheng et al., 2007).

Se ha reportado que los phylums bacterianos marinos que más compuestos antibacterianos producen son Actinobacteria, Proteobacteria, Planctomycetes, Bacteroidetes, Cyanobacteria y Firmicutes (Stincone y Brandelli, 2020). La producción de metabolitos secundarios es una adaptación de estos microorganismos ante un ambiente hostil, ya sea para resistir el estrés ambiental, como defensa ante depredadores o reducir la competencia por recursos (Jimeno et al., 2004). En un ambiente como el sistema de cultivo biofloc, en donde se genera una gran biomasa de microorganismos, la producción de antimicrobianos que limiten competencia por los recursos limitantes como son el C y el N podría ser el factor que determina la supervivencia de estos organismos en el ambiente.

Esta competencia por los recursos limitantes podría estar limitando la abundancia de grupos con un potencial patogénico encontrados en los distintos tratamientos como Flavobacteriaceae, Cytophaga, Vibrio, Aeromonas entre otros. Se ha reportado en otros estudios que, la presencia de patógenos en el tracto digestivo del camarón es común, aunque estas se encuentran en una abundancia reducida y solamente bajo condiciones de estrés sobre el hospedero, pueden generar un brote infeccioso (Ringø et al., 2010; Li et al., 2018;).

Por otro lado, se ha asociado la abundancia de los phylums proteobacteria y Actinobacteria a cultivos de camarón con una alta supervivencia (Amin et al., 2023), esto coincide con lo encontrado en este estudio, donde se encontró la presencia constante de los phylums proteobacteria y actinobacteria como los dos phylums más abundantes en todos los tratamientos. A nivel de género se ha asociado la baja supervivencia de camarones a comunidades donde el género *Vibrio*, *Kokuria* y *Tepediphilus* se encuentran entre los 5 géneros más abundantes en el ambiente (Amin et al., 2023), en el presente estudio la presencia de estos géneros fue limitada, estando fuera de los 10 géneros más abundantes,

por lo que podría considerarse evaluar el efecto que tiene el Phytobutyryn, en la abundancia de estos géneros en específico.

Cerca del 90% de los Otu's identificados están divididos en los 5 phylums descritos anteriormente, siendo principalmente heterótrofo relacionados al metabolismo de carbohidratos complejos, proteínas, grasas y en menor medida se han relacionado con el ciclaje de nitrógeno, principalmente Bacteroidetes y Chloflexi, los cuales también presentan metabolismos quimiolitoheterotrofico y fotoheterótrofos.

Aunque se pueden hacer aproximaciones en cuanto al metabolismo que tienen los distintos phylums bacterianos, debe de considerarse que estos incluyen cientos de especies diferentes, las cuales están adaptadas a distintos ambientes a pesar de tener un ancestro común que las coloca en un phylum, clase o familia diferente. Se ha reportado que en la mayoría de los organismos bacterianos existe una plasticidad fenotípica, la cual es la capacidad genotípica de modificar la expresión fenotípica en respuesta a las condiciones ambientales, como temperatura, depredación, y disponibilidad de recursos (DeWitt et al., 1998). La consideración de la plasticidad fenotípica en una comunidad es de vital importancia al momento de explicar patrones en la dinámica de la comunidad (Heemsbergen et al., 2004).

En el caso de la comunidad bacteriana del biofloc fue predominantemente heterotrófica, con la presencia de organismos que se ha reportado ser fotoautótrofos, fotoheterótrofos, quimioautótrofos, quimiolitoheterotrofico, quimiolitotrofos. La interacción de los organismos en la comunidad lleva a distintos tipos de interacciones, los cuales pueden alterar la comunidad dependiendo del resultado, ya sea exclusión la exclusión competitiva de alguna especie o coexistencia de ambas especies (Stomp et al., 2008).

Los resultados del PCoA indican que el uso de phytobutyryn a diferentes concentraciones no explica la diferencia que existe en las muestras, lo que muestra la resiliencia del biofloc ante los efectos antimicrobianos que presenta el phytobutyryn. Se ha reportado que las comunidades microbianas marinas pueden variar diariamente entre un 5 y 10% y aunque esto podría llevar a que la comunidad acumule estas diferencias con el tiempo, los cambios tienden a ser reversibles lo que lleva a la comunidad a volver a su estado promedio (Caporaso et al., 2012),

En los resultados obtenidos sobre la similitud entre las comunidades en el ANOSIM como podemos observar cómo existe una diferenciación entre el grupo control y los distintos tratamientos, sin que esto llegue a ser significativo, mientras que el valor de $R(0.015)$ indica que las diferencias encontradas entre las comunidades son ocasionadas por el azar y no por el efecto del Phytobutyryn. Estos resultados coinciden con la dinámica de las comunidades marinas reportada por Fuhrman et al., (2015), en donde se menciona que si bien, la comunidad microbiana marina se caracteriza por su dinamismo y resiliencia, en términos generales es predecible en las variaciones de la comunidad de manera diaria, mensual o interanual, debido a distintos mecanismos de realimentación como pueden ser la competencia, infección viral e interacciones depredador – presa que ayudan a mantener una comunidad “estable”.

El análisis de similitud de jaccard también se puede apreciar cómo las diferencias se acumulan entre las distintas unidades experimentales, en donde se agrupan las muestras del grupo control al centro mientras que los distintos tratamientos empiezan a diferenciarse, sin que estas diferencias lleguen a ser significativas. Este resultado concuerda con lo encontrado por (Huerta-Rábago et al., 2019) en donde no se encontraron diferencias significativas entre la diversidad de phylums presentes en biofloc cultivados con

distintos probióticos, mencionando que las bacterias autóctonas de la comunidad del biofloc son las que tienen la mayor influencia en su diversidad.

9. Conclusiones

El uso del fitogénico Phytobutyryn en distintas concentraciones no tuvo un efecto significativo en la calidad del agua del sistema de cultivo biofloc. No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato. Mientras que el tratamiento 3 provocó una reducción significativa del pH y un aumento significativo en el consumo de alcalinidad, sin que estos bajaran de los niveles recomendados.

No se encontraron diferencias significativas entre las distintas concentraciones de Phytobutyryn y la riqueza y diversidad de especies presentes en el sistema de cultivo biofloc.

Se mantuvieron los principales phylums bacterianos y de acuerdo con el análisis de similitud, las variaciones existentes entre los distintos tratamientos no fueron provocadas por el Phytobutyryn. Por otro lado, se debería de considerar realizar un análisis sobre el efecto que tuvo el Phytobutyryn sobre las abundancias de géneros asociados con patógenos en cultivos de camarón.

De acuerdo con los Phylums encontrados cerca del 90% se caracterizan por tener un metabolismo heterotrófico, y el 10% restante otro tipo de metabolismo quimiolitoheterotrofico, quimiolito y fotoheterótrofos, fotoautótrofos, aunque es necesario realizar el análisis de los genes implicados en los diferentes metabolismos para conocer los procesos metabólicos que ocurren en el biofloc.

De acuerdo con los resultados obtenidos tanto en la calidad del agua como en la estructura de la comunidad bacteriana, es posible el uso del fitogénico Phytobutyryn en sistemas de cultivo con la tecnología biofloc.

10. Bibliografía

- Aguiar-Pulido, V., Huang, W., Suarez-Ulloa, V., Cickovski, T., Mathee, K., y Narasimhan, G. (2016). Metagenomics, metatranscriptomics, and metabolomics approaches for microbiome analysis. In *Evolutionary Bioinformatics* (Vol. 12, pp. 5–16). Libertas Academica Ltd. <https://doi.org/10.4137/EBO.S36436>
- Alagawany, M., Farag, M. R., Abdelnour, S. A., y Elnesr, S. S. (2021). A review on the beneficial effect of thymol on health and production of fish. In *Reviews in Aquaculture* (Vol. 13, Issue 1, pp. 632–641). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/raq.12490>
- Arts, I. C., y Hollman, P. C. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Society for Clinical Nutrition*, 81, 317–325. <https://academic.oup.com/ajcn/article-abstract/81/1/317S/4607645>
- Avnimelech, Y. (1999). Carbonnitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 176, 227–235.
- Avnimelech, Y. (1999a). Biofloc technology. A practical guide book. The World Aquaculture Society Carbonnitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. In *Aquaculture* (Vol. 176). <https://www.researchgate.net/publication/308052605>
- Avnimelech, Y. (1999b). Carbonnitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 176, 227–235.
- Baba, E., Acar, Ü., Öntaş, C., Kesbiç, O. S., y Yılmaz, S. (2016). Evaluation of Citrus limon peels essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture*, 465, 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.023>

- Balan, S. S., Kumar, C. G., y Jayalakshmi, S. (2016). Pontifactin, a new lipopeptide biosurfactant produced by a marine *Pontibacter koralensis* strain SBK-47: Purification, characterization and its biological evaluation. *Process Biochemistry*, 51(12), 2198–2207. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.09.009>
- Barraza, C. A. H., Guzmán, G. A., y López Cantú, D. G. (2009). Aquaculture production systems with recirculation system in the North, Northeast and Northwest of Mexico. *Research in Agricultural y Applied Economics*, 25(XIII), 1–15.
- Barton, M. D. (2000). Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition Research Reviews*, 13(2), 279–299. <https://doi.org/10.1079/095442200108729106>
- Baruah, K., Sahu, N. P., Pal, A. K., Jain, K. K., Debnath, D., y Mukherjee, S. C. (2007). Dietary microbial phytase and citric acid synergistically enhances nutrient digestibility and growth performance of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles at sub-optimal protein level. *Aquaculture Research*, 38(2), 109–120. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01624.x>
- Bauer, R. (1998). Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World. Keys and Diagnoses for the Families and Genera Analysis of Life-History Traits in a Sex-Changing Marine Shrimp (Decapoda: Caridea: Rhynchocinetidae) View project. *Bulletin of Marine Science*, 62(1), 299–301. <https://www.researchgate.net/publication/263248368>
- Beema Shafreen, R. M., Selvaraj, C., Singh, S. K., y Karutha Pandian, S. (2014). In silico and in vitro studies of cinnamaldehyde and their derivatives against LuxS in *Streptococcus pyogenes*: Effects on biofilm and virulence genes. *Journal of Molecular Recognition*, 27(2), 106–116. <https://doi.org/10.1002/jmr.2339>
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M. C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., ... Schloter, M. (2020). Microbiome

definition re-visited: old concepts and new challenges. In *Microbiome* (Vol. 8, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>

Bohnes, F. A., Hauschild, M. Z., Schlundt, J., y Laurent, A. (2019). Life cycle assessments of aquaculture systems: a critical review of reported findings with recommendations for policy and system development. In *Reviews in Aquaculture* (Vol. 11, Issue 4, pp. 1061–1079). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/raq.12280>

Calabrese, S., Nilsen, T. O., Kolarevic, J., Ebbesson, L. O. E., Pedrosa, C., Fivelstad, S., Hosfeld, C., Stefansson, S. O., Terjesen, B. F., Takle, H., Martins, C. I. M., Sveier, H., Mathisen, F., Imsland, A. K., y Handeland, S. O. (2017). Stocking density limits for post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) emphasis on production performance and welfare. *Aquaculture*, 468, 363–370. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.041>

Capone, D., Zehr, J., Paerl, H., Bergman, B., y Carpenter, E. (1997). Trichodesmium, a Globally Significant Marine Cyanobacterium. *SCIENCE*, 276, 1221–1229. www.sciencemag.org

Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S. M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J. A., Smith, G., y Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME Journal*, 6(8), 1621–1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>

Cardona, E., Gueguen, Y., Magré, K., Lorgeoux, B., Piquemal, D., Pierrat, F., Noguier, F., y Saulnier, D. (2016). Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. *BMC Microbiology*, 16(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0770-z>

Costa-Pierce, B. A. (2021). The principles and practices of ecological aquaculture and the ecosystem approach to aquaculture. *World Aquaculture*, 25–31.

- Costa-Pierce, B., y Chopin, T. (2021). The hype, fantasies and realities of aquaculture development globally and in its new geographies. *World Aquaculture*, 23–35. <https://www.researchgate.net/publication/352572613>
- Chakraborty, S. B., y Hancz, C. (2011). Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. In *Reviews in Aquaculture* (Vol. 3, Issue 3, pp. 103–119). <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2011.01048.x>
- Choudhary, A., Naughton, L. M., Montánchez, I., Dobson, A. D. W., y Rai, D. K. (2017). Current status and future prospects of Marine Natural Products (MNPs) as antimicrobials. In *Marine Drugs* (Vol. 15, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md15090272>
- da Cunha, J. A., Bandeira Junior, G., da Silva, E. G., de Ávila Scheeren, C., Fausto, V. P., Salbego, J., de Almeida Vaucher, R., de Vargas, A. C., y Baldisserotto, B. (2019). The survival and hepatic and muscle glucose and lactate levels of *Rhamdia quelen* inoculated with *Aeromonas hydrophila* and treated with terpinen-4-ol, carvacrol or thymol. *Microbial Pathogenesis*, 127, 220–224. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.12.005>
- da Silva, B. C., Vieira, F. do N., Mouriño, J. L. P., Bolivar, N., y Seiffert, W. Q. (2016). Butyrate and propionate improve the growth performance of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 47(2), 612–623. <https://doi.org/10.1111/are.12520>
- Dai, W., Yu, W., Xuan, L., Tao, Z., y Xiong, J. (2018). Integrating molecular and ecological approaches to identify potential polymicrobial pathogens over a shrimp disease progression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(8), 3755–3764. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8891-y>
- DeWitt, T. J., Sih, A., y Wilson, D. S. (1998). Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology y Evolution*, 13(2), 77–81. [https://doi.org/doi:10.1016/s0169-5347\(97\)01274-3](https://doi.org/doi:10.1016/s0169-5347(97)01274-3)

- Domadia, P., Swarup, S., Bhunia, A., Sivaraman, J., y Dasgupta, D. (2007). Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochemical Pharmacology*, 74(6), 831–840. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.06.029>
- Doyle, A. A., y Stephens, J. C. (2018). A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia*, 139. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104405>
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K., y Stackebrandt, E. (2006). *The Prokaryotes* (M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, y E. Stackebrandt, Eds.; Vol. 7). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/0-387-30747-8>
- Ebeling, J. M., Timmons, M. B., y Bisogni, J. J. (2006). Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257(1–4), 346–358. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019>
- EFSA FEEDAP Panel (Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed), 2013. Guidance on the renewal of the authorisation of feed additives. *EFSA Journal* 2013;11(10):3431, 8 pp. doi:10.2903/j.efsa.2013.3431
- Eissa, E.-S. H., Elbahnawy, S., El-Baz, A. H., El-Haroun, E., Ashour, M., Mansour, A. T., Saadony, S., El-Saeed, A. F., Kabary, H., Jastaniah, S. D., Alaidaroos, B. A., Shafi, M. E., Abd El-Hack, M. E., Eissa, M. E. H., y Eldessouki, E. A. (2023). Effects of dietary commercial phytobiotic “Sanacore® GM” on Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) growth, immune response, redux status, intestinal health, and disease resistance against *Fusarium solani*. *Aquaculture International*. <https://doi.org/10.1007/s10499-023-01310-5>
- Ekstrand, C., Algers, B., Thebo, P., y Hooshmand-Rad, P. (1994). Rearing broilers without coccidiostats. In *Proceedings of the Eighth International Congress on Animal Hygiene, Minnesota, USA* (Vol. 67, p. 70).

- El-Hawarry, W. N., Mohamed, R. A., y Ibrahim, S. A. (2018). Collaborating effects of rearing density and oregano oil supplementation on growth, behavioral and stress response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 44(2), 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.06.008>
- Emerenciano, M., Gaxiola, G., y Cuzo, G. (2013). Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. In *Biomass Now - Cultivation and Utilization*. InTech. <https://doi.org/10.5772/53902>
- FAO. 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- Feng, X., y Xing, P. (2023). Genomics of *Yoonia* sp. Isolates (Family Roseobacteraceae) from Lake Zhangnai on the Tibetan Plateau. *Microorganisms*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112817>
- Fuerst, J. A., y Sagulenko, E. (2011). Beyond the bacterium: Planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 9, Issue 6, pp. 403–413). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2578>
- Fuhrman, J. A., Cram, J. A., y Needham, D. M. (2015). Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 13, Issue 3, pp. 133–146). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3417>
- Gao, C. H., Tian, X. P., Qi, S. H., Luo, X. M., Wang, P., y Zhang, S. (2010). Antibacterial and antilarval compounds from marine gorgonian-associated bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SCSIO 00856. *Journal of Antibiotics*, 63(4), 191–193. <https://doi.org/10.1038/ja.2010.7>

- Ghanbari, M., Kneifel, W., y Domig, K. J. (2015). A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing. In *Aquaculture* (Vol. 448, pp. 464–475). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.033>
- Gupta, R. S. (2000). The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 367–402. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00547.x>
- Hammer, T. J., Sanders, J. G., y Fierer, N. (2019). Not all animals need a microbiome. In *FEMS Microbiology Letters* (Vol. 366, Issue 10). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz117>
- Harikrishnan, R., Rani, M. N., y Balasundaram, C. (2003). Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture*, 221(1–4), 41–50. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00023-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00023-1)
- Hassan, S. S. ul, Anjum, K., Abbas, S. Q., Akhter, N., Shagufta, B. I., Shah, S. A. A., y Tasneem, U. (2017). Emerging biopharmaceuticals from marine actinobacteria. In *Environmental Toxicology and Pharmacology* (Vol. 49, pp. 34–47). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.11.015>
- Hazarika, S. N., y Thakur, D. (2020). Actinobacteria. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi* (pp. 443–476). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00021-6>
- Heemsbergen, D. A., Berg, M. P., Loreau, M., Van Hal, J. R., Faber, J. H., y Verhoef, H. A. (2004). Biodiversity effects on soil processes explained by interspecific functional dissimilarity. *Science*, 306(5698), 1019–1020. <https://doi.org/10.1126/science.1101865>

- Hopkins, J. S., Hamilton, R. D., Sandier, P. A., Browdy, C. L., y Stokes, A. D. (1993). Effect of Water Exchange Rate on Production, Water Quality, Effluent Characteristics and Nitrogen Budgets of Intensive Shrimp Ponds. *JOURNAL OF THE WORLD AQUACULTURE SOCIETY*, 24(3).
- Hoseinifar, S. H., Sun, Y. Z., y Caipang, C. M. (2017). Short-chain fatty acids as feed supplements for sustainable aquaculture: an updated view. In *Aquaculture Research* (Vol. 48, Issue 4, pp. 1380–1391). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/are.13239>
- Huerta-Rábago, J. A., Martínez-Porchas, M., Miranda-Baeza, A., Nieves-Soto, M., Rivas-Vega, M. E., & Martínez-Córdova, L. R. (2019). Addition of commercial probiotic in a biofloc shrimp farm of *Litopenaeus vannamei* during the nursery phase: Effect on bacterial diversity using massive sequencing 16S rRNA. *Aquaculture*, 502, 391–399. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.055>
- Hug, L. A., Castelle, C. J., Wrighton, K. C., Thomas, B. C., Sharon, I., Frischkorn, K. R., Williams, K. H., Tringe, S. G., y Banfield, J. F. (2013). Community genomic analyses constrain the distribution of metabolic traits across the Chloroflexi phylum and indicate roles in sediment carbon cycling. *Microbiome*, 1(1). <https://doi.org/10.1186/2049-2618-1-22>
- Ikeda-Ohtsubo, W., Brugman, S., Warden, C. H., Rebel, J. M. J., Folkerts, G., y Pieterse, C. M. J. (2018). How Can We Define “Optimal Microbiota?”: A Comparative Review of Structure and Functions of Microbiota of Animals, Fish, and Plants in Agriculture. In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 5). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00090>
- Imran, M., Aslam, M., Alsagaby, S. A., Saeed, F., Ahmad, I., Afzaal, M., Arshad, M. U., Abdelgawad, M. A., El-Ghorab, A. H., Khames, A., Shariati, M. A., Ahmad, A., Hussain, M., Imran, A., y Islam, S. (2022). Therapeutic application of carvacrol: A comprehensive review.

In *Food Science and Nutrition* (Vol. 10, Issue 11, pp. 3544–3561). John Wiley and Sons Inc.
<https://doi.org/10.1002/fsn3.2994>

Ip, Y. K., y Chew, S. F. (2010). Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish: A review. In *Frontiers in Physiology: Vol. 1 OCT*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2010.00134>

Jeske, O., Jogler, M., Petersen, J., Sikorski, J., y Jogler, C. (2013). From genome mining to phenotypic microarrays: Planctomycetes as source for novel bioactive molecules. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 104(4), 551–567. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0007-1>

Jeske, O., Surup, F., Ketteniß, M., Rast, P., Förster, B., Jogler, M., Wink, J., y Jogler, C. (2016). Developing techniques for the utilization of planctomycetes as producers of bioactive molecules. *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01242>

Ji, X., Li, H., Zhang, J., Saiyin, H., y Zheng, Z. (2019). The collaborative effect of *Chlorella vulgaris*-*Bacillus licheniformis* consortia on the treatment of municipal water. *Journal of Hazardous Materials*, 365, 483–493. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.11.039>

Jimeno, J., Faircloth, G., Fernández Souza-Faro, J., Scheuer, P., y Rinehart, K. (2004). new marine derived anticancer therapeutics a journey from the sea to clinical trials. *Marine Drugs*, 2(2), 14–29.

Kaleem, O., y Bio Singou Sabi, A. F. (2021). Overview of aquaculture systems in Egypt and Nigeria, prospects, potentials, and constraints. In *Aquaculture and Fisheries* (Vol. 6, Issue 6, pp. 535–547). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2020.07.017>

Kerbrat, A. S., Amzil, Z., Pawlowicz, R., Golubic, S., Sibat, M., Darius, H. T., Chinain, M., y Laurent, D. (2011). First evidence of palytoxin and 42-hydroxy-palytoxin in the marine

cyanobacterium Trichodesmium. *Marine Drugs*, 9(4), 543–560.
<https://doi.org/10.3390/md9040543>

Kestemont, P. (1995). Aquaculture Different systems of carp production and their impacts on the environment. In *Aquaculture* (Vol. 129).

Kim, S. K., Pang, Z., Seo, H. C., Cho, Y. R., Samocha, T., y Jang, I. K. (2014). Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture Research*, 45(2), 362–371. <https://doi.org/10.1111/are.12319>

Kirchman, D. L. (2006). The ecology of Cytophaga -Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 39(2), 91–100. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00910.x>

Koch, H., Lücker, S., Albertsen, M., Kitzinger, K., Herbold, C., Spieck, E., Nielsen, P. H., Wagner, M., y Daims, H. (2015). Expanded metabolic versatility of ubiquitous nitrite-oxidizing bacteria from the genus *Nitrospira*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(36), 11371–11376. <https://doi.org/10.1073/pnas.1506533112>

Krieg, N. R., Ludwig, W., Euzéby, J., y Whitman, W. B. (2010). Phylum XIV. Bacteroidetes phyl. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (pp. 1–455). Springer.
https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-0-387-68572-4_3

Lazard, J., Baruthio, A., Mathé, S., Rey-Valette, H., Chia, E., Clément, O., Aubin, J., Morissens, P., Mikolasek, O., Legendre, M., Levang, P., Blancheton, J. P., y René, F. (2010). Aquaculture system diversity and sustainable development: Fish farms and their representation. *Aquatic Living Resources*, 23(2), 187–198.
<https://doi.org/10.1051/alr/2010018>

Li, E., Xu, C., Wang, X., Wang, S., Zhao, Q., Zhang, M., Qin, J. G., y Chen, L. (2018). Gut Microbiota and its Modulation for Healthy Farming of Pacific White Shrimp *Litopenaeus*

- vannamei. In *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture* (Vol. 26, Issue 3, pp. 381–399). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/23308249.2018.1440530>
- Li, L., Liu, H., Li, W., Wang, Q., Lin, Z., Tan, B., Dong, X., y Xie, R. (2023). Clostridium butyricum improves the digestive enzyme activity, antioxidant and immunity related genes expression and intestinal microbiota of Litopenaeus vannamei fed a replacing fishmeal with cottonseed protein concentrate (CPC) diet. *Aquaculture Reports*, 29. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101517>
- Li, X. M., Zhu, Y. J., Yan, Q. Y., Ringø, E., y Yang, D. G. (2014). Do the intestinal microbiotas differ between paddlefish (*Polyodon spathala*) and bighead carp (*Aristichthys nobilis*) reared in the same pond? *Journal of Applied Microbiology*, 117(5), 1245–1252. <https://doi.org/10.1111/jam.12626>
- Liao, L., Xu, X. W., Wang, C. S., Zhang, D. S., y Wu, M. (2009). Bacterial and archaeal communities in the surface sediment from the northern slope of the South China Sea. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 10(12), 890–901. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0920181>
- Liu, B., Liu, Y., y Sun, G. (2017). Effects of stocking density on growth performance and welfare-related physiological parameters of Atlantic salmon *Salmo salar* L. in recirculating aquaculture system. *Aquaculture Research*, 48(5), 2133–2144. <https://doi.org/10.1111/are.13050>
- Liu, Z. Y., Yang, H. L., Yan, Y. Y., Seerengaraj, V., Zhang, C. X., Ye, J. dan, Lu, K. le, y Sun, Y. Z. (2021). Supplementation of tributyrin, alone and in combination with fructooligosaccharide in high soybean meal diets for shrimp (*Litopenaeus vannamei*): Effects on growth, innate immunity and intestinal morphology. *Aquaculture Nutrition*, 27(2), 592–603. <https://doi.org/10.1111/anu.13209>

- Love, D. C., Fry, J. P., Cabello, F., Good, C. M., y Lunestad, B. T. (2020). Veterinary drug use in United States net pen Salmon aquaculture: Implications for drug use policy. *Aquaculture*, 518. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734820>
- Luo, G., Gao, Q., Wang, C., Liu, W., Sun, D., Li, L., y Tan, H. (2014). Growth, digestive activity, welfare, and partial cost-effectiveness of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in a recirculating aquaculture system and an indoor biofloc system. *Aquaculture*, 422–423, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.11.023>
- Luo, G., Zhang, N., Cai, S., Tan, H., y Liu, Z. (2017). Nitrogen dynamics, bacterial community composition and biofloc quality in biofloc-based systems cultured *Oreochromis niloticus* with poly- β -hydroxybutyric and polycaprolactone as external carbohydrates. *Aquaculture*, 479, 732–741. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.017>
- Maslowski, K. M., y MacKay, C. R. (2011). Diet, gut microbiota and immune responses. In *Nature Immunology* (Vol. 12, Issue 1, pp. 5–9). <https://doi.org/10.1038/ni0111-5>
- McArthur, K. A., Mitchell, S. S., Tsueng, G., Rheingold, A., White, D. J., Grodberg, J., Lam, K. S., y Potts, B. C. M. (2008). Lynamycins A-E, chlorinated bisindole pyrrole antibiotics from a novel marine actinomycete. *Journal of Natural Products*, 71(10), 1732–1737. <https://doi.org/10.1021/np800286d>
- Mcintosh, D., Samocha, T. M., Jones, E. R., Lawrence, A. L., Mckee, D. A., Horowitz, S., y Horowitz, A. (2000). The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. In *Aquacultural Engineering* (Vol. 21). www.elsevier.nl/locate/aqua-online
- Meenakshisundaram, M., Sugantham, F., Muthukumar, C., y Chandrasekar, M. S. (2021). Metagenomic characterization of biofloc in the grow-out culture of Genetically Improved

Farmed Tilapia (GIFT). *Aquaculture Research*, 52(9), 4249–4262.
<https://doi.org/10.1111/are.15263>

Mir, M., Permana, A. D., Ahmed, N., Khan, G. M., Rehman, A. ur, y Donnelly, R. F. (2020). Enhancement in site-specific delivery of carvacrol for potential treatment of infected wounds using infection responsive nanoparticles loaded into dissolving microneedles: A proof of concept study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 147, 57–68.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.12.008>

Mo, S., Kronic, A., Chlipala, G., y Orjala, J. (2009). Antimicrobial ambiguine isonitriles from the cyanobacterium *Fischerella ambigua*. *Journal of Natural Products*, 72(5), 894–899.
<https://doi.org/10.1021/np800751j>

Mojid Mondol, M. A., Kim, J. H., Lee, H. S., Lee, Y. J., y Shin, H. J. (2011). Macrolactin W, a new antibacterial macrolide from a marine *Bacillus* sp. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 21(12), 3832–3835. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.12.050>

Moss, S. M., Moss, D. R., Arce, S. M., Lightner, D. v., y Lotz, J. M. (2012). The role of selective breeding and biosecurity in the prevention of disease in penaeid shrimp aquaculture. In *Journal of Invertebrate Pathology* (Vol. 110, Issue 2, pp. 247–250).
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.01.013>

Murray, F., Bostock, J., y Fletcher, D. (2014). *RAS Technologies and their commercial application*.

Mustaq, S., Moin, A., Pandit, B., Tiwary, B. K., y Alam, M. (2023). Phyllobacteriaceae: a family of ecologically and metabolically diverse bacteria with the potential for different applications. In *Folia Microbiologica*. Springer Science and Business Media B.V.
<https://doi.org/10.1007/s12223-023-01107-2>

- Nagao, T., Adachi, K., Sakai, M., Nishijima, M., y Sanoll, H. (2001). Novel Macrolactins as Antibiotic Lactones from a Marine Bacterium. *The Journal of Antibiotics*, 54(4), 333–339.
- Nair, H. P., Puthusseri, R. M., Vincent, H., y Bhat, S. G. (2017). 16S rADN-based bacterial diversity analysis of Arabian Sea sediments: A metagenomic approach. *Ecological Genetics and Genomics*, 3–5, 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.egg.2017.09.001>
- Naoya, O., Kawabata, K., Adachi, K., Katsuta, A., y Shizuri, Y. (2008). Unnarmicins A and C, New Antibacterial Depsipeptides Produced by Marine Bacterium Photobacterium sp. MBIC06485. *The Journal of Antibiotics*, 61(1), 11–17.
- Nguyen, T. D., Prykhodko, O., Hållenius, F. F., y Nyman, M. (2017). Effects of monobutyryl and tributyrin on liver lipid profile, caecal microbiota composition and SCFA in high-fat diet-fed rats. *Journal of Nutritional Science*, 6. <https://doi.org/10.1017/jns.2017.54>
- Nilav, A., Nama, S., Biswal, A., y Paul, T. (2020). A REVIEW ON RECIRCULATING AQUACULTURE SYSTEMS: CHALLENGES AND OPPORTUNITIES FOR SUSTAINABLE AQUACULTURE. *Inno. Farm*, 5(1), 17–24. www.innovativefarming.in
- Ntougias, S., Russell, N. J., Ntougias, S., y Russell, N. J. (2000). Bacillus sp. WW3-SN6, a novel facultatively alkaliphilic bacterium isolated from the washwaters of edible olives. In *Extremophiles* (Vol. 4). <http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de/>
- O'Neill, J. (2016). *Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations, the review on antimicrobial resistance*. https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf
- O'Sullivan, L. A., Fuller, K. E., Thomas, E. M., Turley, C. M., Fry, J. C., y Weightman, A. J. (2004). Distribution and culturability of the uncultivated “AGG58 cluster” of the Bacteroidetes phylum

in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 47(3), 359–370.
[https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00300-3](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00300-3)

Outama, P., Le Xuan, C., Wannavijit, S., Lumsangkul, C., Linh, N. V., Montha, N., Tongsir, S., Chitmanat, C., y Van Doan, H. (2022). Modulation of growth, immune response, and immune-antioxidant related gene expression of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared under biofloc system using mango peel powder. *Fish and Shellfish Immunology*, 131, 1136–1143. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.09.031>

Prangnell, D. I., Lupatsch, I., Treece, G. D., y Samocha, T. M. (2019). Shrimp biology. In *Sustainable Biofloc Systems for Marine Shrimp* (pp. 19–27). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818040-2.00002-2>

Prasad, K. N. (1980). MINIREVIEW BUTYRIC ACID: A SMALL FATTY ACID WITH DIVERSE BIOLOGICAL FUNCTIONS. In *Life Sciences* (Vol. 27).

Preena, P. G., Swaminathan, T. R., Kumar, V. J. R., y Singh, I. S. B. (2020). Antimicrobial resistance in aquaculture: a crisis for concern. *Biologia*, 75(9), 1497–1517.
<https://doi.org/10.2478/s11756-020-00456-4>

Raei, P., Poulak, T., Memar, M. Y., Alizadeh, N., Aghamali, M., Zeinalzadeh, E., Asgharzadeh, M., y Kafil, H. S. (2017). Thymol and carvacrol strongly inhibit biofilm formation and growth of carbapenemase-producing Gram negative bacilli. *Cellular and Molecular Biology*, 63(5), 108–112. <https://doi.org/10.14715/cmb/2017.63.5.20>

Randrianarivelo, R., Danthu, P., Benoit, C., Ruez, P., Raherimandimby, M., y Sarter, S. (2010). Novel alternative to antibiotics in shrimp hatchery: Effects of the essential oil of *Cinnamomum fragrans* on survival and bacterial concentration of *Penaeus monodon* larvae. *Journal of Applied Microbiology*, 109(2), 642–650. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04694.x>

- SAGARPA, (2015) Situación actual de la acuicultura en Tabasco, problemática y perspectivas de desarrollo a través de la innovación tecnológica. 128 p
- Samocha, T. M., Prangnell, D. I., y Castro, L. F. (2019). Biofloc. In *Sustainable Biofloc Systems for Marine Shrimp* (pp. 29–36). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818040-2.00003-4>
- Scholz, M. B., Lo, C. C., y Chain, P. S. G. (2012). Next generation sequencing and bioinformatic bottlenecks: The current state of metagenomic data analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(1), 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.11.013>
- Schumacher, R., Harrigan, B., y Davidson, B. (2001). kahakamides A and B, metabolites from a marine-derived actinomycete. *Tetrahedron Letters*, 42, 5133–5135.
- Shah, S. A. A., Ul Hassan, S. S., Bungau, S., Si, Y., Xu, H., Rahman, M. H., Behl, T., Gitea, D., Pavel, F. M., Aron, R. A. C., Pasca, B., y Nemeth, S. (2020). Chemically diverse and biologically active secondary metabolites from marine phylum chlorophyta. In *Marine Drugs* (Vol. 18, Issue 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md18100493>
- Shah, S. Z. H., Afzal, M., Khan, S. Y., Hussain, S. M., y Habib, R. Z. (2015). Prospects of using citric acid as fish feed supplement. *INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE y BIOLOGY*, 17, 1–8. <http://www.fspublishers.org>
- Shen, S., Zhang, T., Yuan, Y., Lin, S., Xu, J., y Ye, H. (2015). Effects of cinnamaldehyde on Escherichia coli and Staphylococcus aureus membrane. *Food Control*, 47, 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.003>
- Shourbela, R. M., El-Hawarry, W. N., Elfadadny, M. R., y Dawood, M. A. O. (2021). Oregano essential oil enhanced the growth performance, immunity, and antioxidative status of Nile

tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared under intensive systems. *Aquaculture*, 542.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736868>

Silva, A. F., dos Santos, A. R., Coelho Trevisan, D. A., Ribeiro, A. B., Zanetti Campanerut-Sá, P. A., Kukolj, C., de Souza, E. M., Cardoso, R. F., Estivalet Svidzinski, T. I., de Abreu Filho, B. A., Junior, M. M., y Graton Mikcha, J. M. (2018). Cinnamaldehyde induces changes in the protein profile of *Salmonella Typhimurium* biofilm. *Research in Microbiology*, 169(1), 33–43.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.09.007>

Spain, A. M., Krumholz, L. R., y Elshahed, M. S. (2009). Abundance, composition, diversity and novelty of soil Proteobacteria. *ISME Journal*, 3(8), 992–1000.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2009.43>

Stincone, P., y Brandelli, A. (2020). Marine bacteria as source of antimicrobial compounds. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 40, Issue 3, pp. 306–319). Taylor and Francis Ltd.
<https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1710457>

Stomp, M., Van Dijk, M. A., Van Overzee, H. M. J., Wortel, M. T., Sigon, C. A. M., Egas, M., Hoogveld, H., Gons, H. J., y Huisman, J. (2008). The timescale of phenotypic plasticity and its impact on competition in fluctuating environments. *American Naturalist*, 172(5).
<https://doi.org/10.1086/591680>

Sugiura, S. H., Dong, F. M., y Hardy, R. W. (1998). Effects of dietary supplements on the availability of minerals in fish meal; preliminary observations. In *Aquaculture* (Vol. 160).

Sutili, F. J., de Lima Silva, L., Gressler, L. T., Gressler, L. T., Battisti, E. K., Heinzmann, B. M., de Vargas, A. C., y Baldisserotto, B. (2015). Plant essential oils against *Aeromonas hydrophila*: In vitro activity and their use in experimentally infected fish. *Journal of Applied Microbiology*, 119(1), 47–54. <https://doi.org/10.1111/jam.12812>

- Tepaamorndech, S., Nookaew, I., Higdon, S. M., Santiyanont, P., Phromson, M., Chantarasakha, K., Mhuantong, W., Plengvidhya, V., y Visessanguan, W. (2020). Metagenomics in bioflocs and their effects on gut microbiome and immune responses in Pacific white shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 106, 733–741. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.08.042>
- Van Doan, H., Hoseinifar, S. H., Hung, T. Q., Lumsangkul, C., Jaturasitha, S., Ehab El-Haroun, y Paolucci, M. (2020). Dietary inclusion of chestnut (*Castanea sativa*) polyphenols to Nile tilapia reared in biofloc technology: Impacts on growth, immunity, and disease resistance against *Streptococcus agalactiae*. *Fish and Shellfish Immunology*, 105, 319–326. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.07.010>
- Vigneron, A., Alsop, E. B., Cruaud, P., Philibert, G., King, B., Baksmaty, L., Lavallée, D., Lomans, B. P., Kyrpides, N. C., Head, I. M., y Tsesmetzis, N. (2017). Comparative metagenomics of hydrocarbon and methane seeps of the Gulf of Mexico. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16375-5>
- Vinatea, L., Gálvez, A. O., Browdy, C. L., Stokes, A., Venero, J., Haveman, J., Lewis, B. L., Lawson, A., Shuler, A., y Leffler, J. W. (2010). Photosynthesis, water respiration and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in a super-intensive raceway culture with zero water exchange: Interaction of water quality variables. *Aquacultural Engineering*, 42(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2009.09.001>
- Wang, Y., Wang, Q., Xing, K., Jiang, P., y Wang, J. (2021). Dietary cinnamaldehyde and *Bacillus subtilis* improve growth performance, digestive enzyme activity, and antioxidant capability and shape intestinal microbiota in tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*. *Aquaculture*, 531. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735798>

- Watson, S. W., Book, E., Valois, F. W., Waterbury, J. B., y Schlosser, U. (1986). Archives of Microbiology Original papers Nitrospira marina gen. nov. sp. nov.: a chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium. In *Arch Microbiol* (Vol. 144).
- Whitton, B. A., y Potts, M. (2012). Introduction to the cyanobacteria. In *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time* (Vol. 9789400738553, pp. 1–13). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3_1
- Wilkie, M. P. (2002). Ammonia excretion and urea handling by fish gills: Present understanding and future research challenges. *Journal of Experimental Zoology*, 293(3), 284–301. <https://doi.org/10.1002/jez.10123>
- Wu, C. C., Liu, C. H., Chang, Y. P., y Hsieh, S. L. (2010). Effects of hot-water extract of *Toona sinensis* on immune response and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Oreochromis mossambicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 29(2), 258–263. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.04.021>
- Wu, S., Ren, Y., Peng, C., Hao, Y., Xiong, F., Wang, G., Li, W., Zou, H., y Angert, E. R. (2015). Metatranscriptomic discovery of plant biomass-degrading capacity from grass carp intestinal microbiomes. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(10). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv107>
- Wu, Y. rui, Gong, Q. fang, Fang, H., Liang, W. wen, Chen, M., y He, R. jie. (2013). Effect of *Sophora flavescens* on non-specific immune response of tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*) and disease resistance against *Streptococcus agalactiae*. *Fish and Shellfish Immunology*, 34(1), 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.10.020>
- Xiong, J. B., Nie, L., y Chen, J. (2019). Current understanding on the roles of gut microbiota in fish disease and immunity. In *Zoological research* (Vol. 40, Issue 2, pp. 70–76). NLM (Medline). <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2018.069>

- Xiong, J., Zhu, J., Dai, W., Dong, C., Qiu, Q., y Li, C. (2017). Integrating gut microbiota immaturity and disease-discriminatory taxa to diagnose the initiation and severity of shrimp disease. *Environmental Microbiology*, 19(4), 1490–1501. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13701>
- Yamada, T., y Sekiguchi, Y. (2009). Cultivation of uncultured Chloroflexi subphyla: Significance and ecophysiology of formerly uncultured Chloroflexi “subphylum i” with natural and biotechnological relevance. In *Microbes and Environments* (Vol. 24, Issue 3, pp. 205–216). <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME09151S>
- Yang, C., Chowdhury, M. A. K., Hou, Y., y Gong, J. (2015). Phytogetic compounds as alternatives to in-feed antibiotics: Potentials and challenges in application. In *Pathogens* (Vol. 4, Issue 1, pp. 137–156). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens4010137>
- Zaminhan-Hassemer, M., Zagolin, G. B., Perazza, C. A., Aciole Barbosa, D., Menegidio, F. B., Coutinho, L. L., Tizioto, P., y Hilsdorf, A. W. S. (2022). Adding an essential oil blend to the diet of juvenile Nile tilapia improves growth and alters the gut microbiota. In *Aquaculture* (Vol. 560). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738581>
- Zeng, S., Huang, Z., Hou, D., Liu, J., Weng, S., y He, J. (2017). Composition, diversity and function of intestinal microbiota in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at different culture stages. *PeerJ*, 2017(11). <https://doi.org/10.7717/peerj.3986>
- Zhang, M., Pan, L., Huang, F., Gao, S., Su, C., Zhang, M., y He, Z. (2019). Metagenomic analysis of composition, function and cycling processes of microbial community in water, sediment and effluent of *Litopenaeus vannamei* farming environments under different culture modes. *Aquaculture*, 506, 280–293. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.038>
- Zheng, C. J., Lee, S., Lee, C. H., y Kim, W. G. (2007). Macrolactins O-R, glycosylated 24-membered lactones from *Bacillus* sp. AH159-1. *Journal of Natural Products*, 70(10), 1632–1635. <https://doi.org/10.1021/np0701327>

- Zhou, F., Ji, B., Zhang, H., Jiang, H., Yang, Z., Li, J., Li, J., Ren, Y., y Yan, W. (2007). Synergistic Effect of Thymol and Carvacrol Combined with Chelators and Organic Acids against Salmonella Typhimurium. In *Journal of Food Protection* (Vol. 70, Issue 7).
- Zinn, S., Betz, T., Medcraft, C., y Schnell, M. (2015). Structure determination of trans-cinnamaldehyde by broadband microwave spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(24), 16080–16085. <https://doi.org/10.1039/c5cp02582f>
- Zwirgmaier, K., Heywood, J. L., Chamberlain, K., Woodward, E. M. S., Zubkov, M. V., y Scanlan, D. J. (2007). Basin-scale distribution patterns of picocyanobacterial lineages in the Atlantic Ocean. *Environmental Microbiology*, 9(5), 1278–1290. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01246.x>

11. Anexos

11.1 Metodología de extracción de ADN metagenómico mediante CTAB (Bromuro de Hexadecil-trimetil-amonio) a partir de tejido.

Lisis celular

- Centrifugar 45 ml de muestra de biofloc a 13000 rpm durante 2 minutos a 4°C.
- Descartar el sobrenadante y congelar la biomasa colectada a -80°C por 20 min
- Resuspender el pellet en 300 µl de buffer Ctab
- Agregar 50mg de perlas de circonio (0.75mm)
- Homogeneizar en el homogeneizador Mpbio Fastprep-24 G5, a 6.0 m*s⁻¹ durante 30 segundos, dos ciclos.
- Agregar 10µl de proteinasa K (20 ng*ml⁻¹)
- Incubar 2 horas a 55°C, agitando cada 10 min en el vortex)
- Agregar 10 µl de lisozima (10ng*ml⁻¹)
- Incubar 10 minutos a 37°C
- Incubar 1 hora a 65°C

Extracción de ADN

- Agregar 300 µl de cloruro de litio 5M (LiCl), agitar a temperatura ambiente durante 1 min
- Agregar 5 µl de RNAsa e incubar a 37°C durante 15min
- Agregar 600 µl de cloroformo:isoamílico
- Incubar a temperatura ambiente durante 30 min, mezclando cada 10 min
- Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos, a 4°C
- Extraer la fase Acuosa y transferir a un tubo nuevo

Precipitación

- Agregar 50 µl de Acetato de sodio 3M (pH 5.2)
- Agregar 1ml de etanol al 100% a 4°C
- Incubar a -20°C durante 8 horas
- Centrifugar a 13000 rpm durante 20 minutos, a 4°C
- Descartar el sobrenadante mediante decantación, cuidando de no perder el pellet de ADN

Lavado

- Agregar 750 µl de etanol al 75%
- Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos
- Centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos, a 4°C
- Repetir el lavado una vez más
- Dejar secar el pellet dentro de la campana de flujo laminar durante 30 minutos
- Resuspender en 200µl agua miliq
- Conservar en congelación a -20°C

11.2 Protocolo ADNeasy power soil pro

*Mantener el reactivo CD2 frío en todo momento

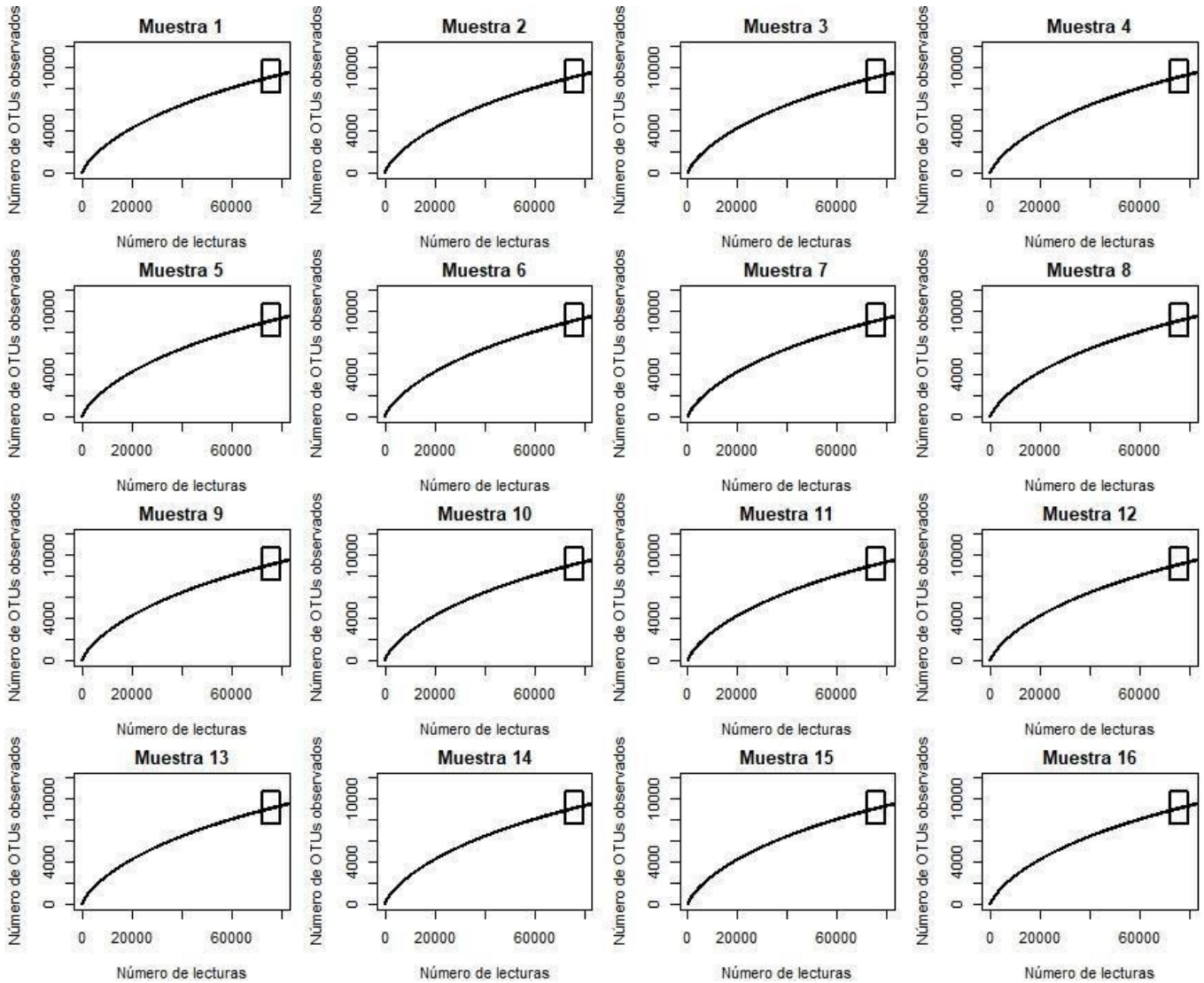
*Calentar los reactivos CD3 y CD6 a 60°C

* Realizar un spin a los power beads para asentarlos

- Agregar 0.25g de sedimento al tubo con los power beads, adicionar 800 µl de solución CD1 y hacer un vortex durante 10 min, manteniendo los tubos de manera horizontal
- Centrifugar a 15,000g durante 1 minuto, pasar el sobrenadante a un tubo nuevo tomando la fase sólida y la fase líquida
- Agregar 200 µl de solución CD2 y hacer un vortex durante 5 segundos
- Centrifugar a 15,000g durante 1 minuto y transferir 700µl de sobrenadante a un tubo nuevo
- Agregar 600µl de solución CD3 y hacer un vortex durante 5 segundos
- Cargar 650µl de lisado en un columna MB, centrifugar a 15,000g durante 1 minuto y desechar el sobrenadante
- Cargar los 650µl restante en la misma columna MB, centrifugar a 15,000g durante 1 minuto, y desechar el sobrenadante
- Colocar la columna sobre un tubo de recolección y agregar 500µl de la solución EA, centrifugar a 15,000g durante 1 minuto, desechar el sobrenadante y colocar la columna de nuevo en el tubo de recolección
- Agregar 500µl de la solución 5 a la columna y centrifugar a 15,000g durante 1 minuto, desechar el sobrenadante y colocar la columna en un tubo de recolección nuevo.
- centrifugar a 16,000g durante 2 minutos

- Colocar la columna en un tubo de elución
- Agregar 50µl de C6 al centro de la membrana, Centrifugar a 15,000g durante 1 minuto
- Desechar la columna, y conservar el tubo de elución en donde se encuentra el ADN

11.3 Curvas de rarefacción por muestra.



Curvas de rarefacción de las distintas unidades de muestreo bajo los 4 tratamientos de phytobutirin el punto de inflexión de la curva está marcado con un rectángulo. Las muestras 1, 5, 9, 13 pertenecen al Tratamiento Control (0 mg*Kg⁻¹), las muestras 2,6,10,14 pertenecen al Tratamiento 1(0.5 mg*Kg⁻¹), las muestras 3, 7, 11, 15 al Tratamiento 2(1 mg*Kg⁻¹), las muestras 4,8,12 y 16 al Tratamiento 3 (2 mg*Kg⁻¹).

Pensamientos Finales.

Gracias por llegar al final de la tesis, una disculpa por las faltas de ortografía y los errores que podrían haberse llegado a escapar, esta tesis se realizó a finales de la pandemia, por un estudiante que hizo su mejor esfuerzo por soportar las presiones de la vida y los distintos retos que conllevan realizar un posgrado. Que por algún infortunio en la vida tuvo a bien tener que operarse la rodilla al término de la beca, un estudiante que quizá no sea el más brillante, pero que supo como enfrentar los retos que se presentan en un posgrado. Perseverar a pesar de las dificultades, seguir adelante en los momentos difíciles, abrazar el dolor, y continuar. Un estudiante que entendió que las decisiones que tomamos siempre tienen consecuencias, y las decisiones que no tomamos también. Espero que al leer esto recuerdes de lo que eres capaz, cuando te lo propones.

Gracias. Manu.