



**UTMACH**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE ACUICULTURA**

**Eficacia de la aplicación de un consorcio bacteriano elaborado a base de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* para la reducción de materia orgánica en sedimentos de piscinas camaroneras.**

**PINDO GAVILANES BRYAN ALVARO  
INGENIERO ACUICOLA**

**MACHALA  
2022**



**UTMACH**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE ACUICULTURA**

**Eficacia de la aplicación de un consorcio bacteriano elaborado a base de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* para la reducción de materia orgánica en sedimentos de piscinas camaroneras.**

**PINDO GAVILANES BRYAN ALVARO  
INGENIERO ACUICOLA**

**MACHALA  
2022**



**UTMACH**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE ACUICULTURA**

**PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN**

**Eficacia de la aplicación de un consorcio bacteriano elaborado a base de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* para la reducción de materia orgánica en sedimentos de piscinas camaroneras.**

**PINDO GAVILANES BRYAN ALVARO  
INGENIERO ACUICOLA**

**SORROZA OCHOA LITA SCARLETT**

**MACHALA  
2022**

# Tesis

---

## INFORME DE ORIGINALIDAD

---

3%

INDICE DE SIMILITUD

3%

FUENTES DE INTERNET

0%

PUBLICACIONES

0%

TRABAJOS DEL  
ESTUDIANTE

---

ENCONTRAR COINCIDENCIAS CON TODAS LAS FUENTES (SOLO SE IMPRIMIRÁ LA FUENTE SELECCIONADA)

---

1%

★ [www.researchgate.net](http://www.researchgate.net)

Fuente de Internet

---

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

Apagado

Excluir bibliografía

Activo

## **CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL**

El que suscribe, PINDO GAVILANES BRYAN ALVARO, en calidad de autor del siguiente trabajo escrito titulado Eficacia de la aplicación de un consorcio bacteriano elaborado a base de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* para la reducción de materia orgánica en sedimentos de piscinas camaroneras., otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

El autor declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

El autor como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.



PINDO GAVILANES BRYAN ALVARO  
0706992534

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a mis padres, Galo Pindo y Alba Gavilanes, quienes me apoyaron a lo largo de mi vida, han estado presentes para guiarme, aconsejarme, enseñarme que el esfuerzo y la constancia dan frutos. A mis hermanos que siempre estuvieron presentes para darme su apoyo incondicional, dándome la fuerza suficiente para poder seguir a delante no solo con la carrera, sino en otros aspectos de mi vida mostrándome que una de las cosas más importantes es la familia y que uno puede llegar hacer tan grande como te lo propongas y llegar tan lejos como te dé la gana.

A los grandes amigos que me dio la carrera y que de alguna u otra manera contribuyeron en la elaboración de este trabajo como lo son Christopher Armijos, Alberto Figueroa y Heidy Juliana, quiero agradecer su ayuda, confianza y su valiosa amistad en todos estos años. En el libro de mi vida tengo una página destinada para ustedes en la que espero seguir escribiendo sus historias.

Asimismo, quiero agradecer a mi tutora la Dra. Lita Sorroza que gracias a su apoyo, consejo y guía en el presente trabajo se pudo desarrollar de la mejor manera posible, al Ing. Irán Rodríguez y a cada uno de los especialistas que tuvieron una participación fundamental en mi trabajo. Además, agradezco a la Facultad de Ciencias Agropecuarias por la oportunidad de estudiar y desempeñarme como profesional, también quiero expresar mi gratitud a la Ing. Ivanna Tuz, Ing. Karen Miranda, Ing. Wilmer Moreira y Luis Vacacela que gracias a su indispensable ayuda se logró realizar el proceso experimental sin ningún inconveniente.

Finalmente, agradezco a la empresa ECOALTERNATIVAS S.A. y a su representante el Ing. Yinson Carbay por proporcionarme muestras del producto y permitirme utilizarlo como objeto de estudio de la investigación.

## DEDICATORIA

*Este trabajo va dedicado a mis padres y hermanos.  
Lo que fui, lo que soy y lo que seré ha sido gracias a ustedes,  
pero sobre todo a ti Galo, sé que nos veremos algún día en algún lugar  
por lo que espero que estas pocas palabras contengan el espíritu de su intención.*

*Bryan Alvaro Pindo Gavilanes*

## RESUMEN

El cultivo de *Penaeus vannamei* que se lleva a cabo en estanques presenta un aumento en la intensificación que van de la mano con la tecnificación de la producción, pero que a su vez este procedimiento genera un aumento en la acumulación de los materiales como alimento no consumido, organismos muertos, heces, etc., y como consecuencia aumento de la materia orgánica, todo esto ocasiona una serie de problemas en la unidad de cultivo tanto en el agua como el sedimento y por ende perjudica la salud de los organismos y el entorno del mismo. La eliminación de estos sedimentos ricos en materia orgánica ya sea a través del desplazamiento de los sedimentos o reformar el fondo mediante la remoción mecánica implica un costo en la producción. Por lo cual, la investigación tuvo como objetivo evaluar la biorremediación efectuada por un consorcio bacteriano elaborado a base de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* (BIO.BS.BL) para reducir el contenido de materia orgánica en sedimentos procedentes de piscinas camarонерas, como una estrategia biológica para incrementar la descomposición de compuestos orgánicos de origen acuícola y abaratar costos.

Con esta finalidad se realizó un experimento completamente al azar, con doce unidades experimentales con capacidad de 15 litros para evaluar la aplicación del BIO.BS.BL mediante tres tratamientos (1,5 L ha<sup>-1</sup>, 3 L ha<sup>-1</sup>, 4,5 L ha<sup>-1</sup>) y un testigo (0 L ha<sup>-1</sup>) al que solo se le aplicaba el medio de activación de la bacteria. El estudio tuvo una duración de 20 días y para determinar el cambio generado en la materia orgánica se realizó mediante el método Walkley & Black, además se determinó la carga de *Vibrio sp.* por disoluciones seriadas para evaluar el cambio en la comunidad bacteriana patógena.

Los resultados obtenidos en el presente estudio permitieron observar que si hay diferencias entre tratamientos con respecto a la media de la materia orgánica (MO), obteniendo la mayor disminución de MO en el tratamiento de 3 L ha<sup>-1</sup> en comparación al testigo (p <0.05). Con respecto a los resultados en cuanto a la carga bacteriana de *Vibrio sp.* en relación a los tratamientos mostró que no hubo diferencias significativas (p >0.05). Sin embargo, se

determinó una diferencia práctica de 23% de UFC/g de suelo en el tratamiento de 4.5 L ha<sup>-1</sup> respecto al testigo. Concluyendo que la aplicación de las bacterias *B. subtilis* y *B. licheniformis* en suelo de piscinas camaroneras son capaces de incrementar la descomposición de la materia orgánica y proporcionar un equilibrio entre las comunidades bacterianas pertenecientes al microbioma del suelo al evitar una proliferación más acelerada de bacterias patógenas.

**Palabras claves:** Biorremediación, sedimento, materia orgánica, *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*.

## ABSTRACT

The culture of *Penaeus vannamei* carried out in ponds presents an increase in intensification that goes hand in hand with the technification of production, but in turn, this generates an increase in the accumulation of unconsumed feed, dead organisms, feces, etc., and as a consequence, an increase in organic matter. All of this causes a series of problems in the cultivation unit, both in the water and sediment, and therefore harms the health of the organisms and their environment. The elimination of these sediments rich in organic matter, either through displacement or mechanical removal of the sediment, implies a cost in production. Therefore, this research aimed to evaluate the bioremediation potential by a bacterial consortium made up of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* (BIO.BS.BL) to reduce the content of organic matter in sediments from shrimp ponds as a biological strategy to increase the decomposition of organic compounds from aquaculture origin and thus reducing production costs.

For this purpose, a completely randomized open experiment was conducted with twelve experimental units with a capacity of 15 liters to evaluate the application of BIO.BS.BL through three treatments (1.5 L ha<sup>-1</sup>, 3 L ha<sup>-1</sup>, 4.5 L ha<sup>-1</sup>) and a control (0 L ha<sup>-1</sup>), to which only the bacterial activation medium was applied. The study was carried out for 20 days, and the change generated in organic matter in the sediment was determined using the Walkley & Black method. Additionally, the *Vibrio* load was determined by serial dilutions to evaluate the change in the pathogenic bacterial community.

The results obtained in the present study showed that there are differences among treatments with respect to the average organic matter (OM), obtaining the greatest decrease in OM in the treatment of 3 L ha<sup>-1</sup> compared to the control ( $p < 0.05$ ), finding a maximum reduction of 6.51%. However, the results regarding the bacterial load of *Vibrio sp.* in relation to the treatments showed that there were no significant differences ( $p > 0.05$ ). Nevertheless, a practical difference of 23% of CFU/g of soil was determined in the treatment of 4.5 L ha<sup>-1</sup> compared to the control. In conclusion, the application of *B. subtilis* and *B. licheniformis*

bacteria in shrimp ponds soil is able of increasing the decomposition of organic matter and providing a balance between bacterial communities belonging to the soil microbiome by avoiding a more accelerated proliferation of pathogenic bacteria.

**Keywords:** Bioremediation, sediment, organic matter, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*

## ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	I
DEDICATORIA .....	II
RESUMEN .....	III
ABSTRACT.....	V
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
3 JUSTIFICACIÓN.....	4
4 OBJETIVOS.....	5
4.1 Objetivo general.....	5
4.2 Objetivos específicos .....	5
4.3 Hipótesis.....	5
5 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
5.1 Sedimento y materia orgánica en cultivos acuícolas.....	6
5.1.1 Materia orgánica.....	6
5.2 Papel de la ecología microbiana.....	7
5.3 Biorremediación.....	10
5.4 Participación de las bacterias en la biorremediación .....	11
5.4.1 Factores que afectan a la biorremediación microbiana .....	13
5.5 Aplicación de la biorremediación en la acuicultura .....	16
5.5.1 Biorremediación de detritus orgánico .....	16
5.5.2 Biorremediación de compuestos nitrogenados.....	17
5.6 Bacillus.....	18

5.6.1	Mecanismo de acción para la biotransformación de compuestos tóxicos...	20
6	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
6.1	Ubicación del experimento .....	22
6.2	Materiales y reactivos .....	22
6.2.1	Materiales.....	22
6.2.2	Equipos.....	23
6.2.3	Insumos de laboratorio.....	23
6.2.4	Reactivos .....	23
6.3	Diseño experimental.....	24
6.3.1	Modelo matemático (diseño completamente al azar).....	24
6.3.2	Caracterización de los tratamientos .....	25
6.4	Variables a medir .....	25
6.5	Manejo del ensayo.....	26
6.5.1	Toma de muestras de suelo en campo.....	26
6.5.2	Preparación de las unidades experimentales .....	27
6.5.3	Aplicación de los tratamientos y monitoreo del experimento.....	27
6.6	Metodología para medición de las variables y la recolección de datos .....	28
6.6.1	Métodos de análisis de suelo en laboratorio .....	28
6.6.2	Método para el análisis microbiológico .....	29
6.7	Procedimiento estadístico.....	30
7	RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	31
7.1	Análisis de los parámetros físico-químicos tomados en el ensayo .....	31
7.2	Efecto del conglomerado bacteriano a base de <i>Bacillus</i> en materia orgánica (MO), carbono orgánico (CO) y carbono orgánico oxidable (COO).....	31

7.3	Análisis microbiológico .....	36
8	CONCLUSIONES.....	40
9	RECOMENDACIONES .....	41
10	BIBLIOGRAFÍA.....	42
11	ANEXOS.....	52
11.1	Método de Walkley & Black.....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Patrón de crecimiento bacteriano .....	8
<b>Figura 2</b> Aplicaciones y modo de acción del <i>Bacillus</i> en la acuicultura .....	19
<b>Figura 3</b> Acción del <i>Bacillus</i> en la mejora de la calidad del agua .....	20
<b>Figura 4</b> Ubicación del laboratorio de Citogenética en la Facultad de Ciencias Agropecuarias .....	22
<b>Figura 5</b> Homogenización de las muestras de suelo .....	27
<b>Figura 6</b> Preparación de las unidades experimentales para inicio del experimento .....	28
<b>Figura 7</b> Contenido de MO (a), CO (b) y COO (c) sujetos a diferentes dosis del conglomerado bacteriano <i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i> en muestras de suelo de estanque en un modelo in vitro.....	33
<b>Figura 8</b> Concentración final de <i>Vibrio sp.</i> en el sedimento en función de las diferentes dosis del conglomerado bacteriano a base de <i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i> .....	37

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Fases que componen el patrón de crecimiento bacteriano.....	8
<b>Tabla 2</b> Ejemplo de algunas bacterias benéficas y sus funciones.....	10
<b>Tabla 3</b> Características generales y requerimientos de diferentes tipos de bacterias benéficas .....	12
<b>Tabla 4</b> Croquis del experimento establecido.....	24
<b>Tabla 5</b> Tratamiento objeto de estudio.....	25
<b>Tabla 6</b> Estadísticos descriptivos del contenido de MO en el sedimento tratado con diferentes dosis del conglomerado bacteriano.....	31
<b>Tabla 7</b> ANOVA de un factor inter-grupos para la comparación de MO, CO y COO, entre las diferentes dosis del conglomerado a bases de <i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i> .....	32
<b>Tabla 8</b> Estadísticos descriptivos de la carga de <i>Vibrio sp.</i> en el sedimento tratado con las diferentes dosis del conglomerado bacteriano.....	36
<b>Tabla 9</b> ANOVA de un factor inter-grupos para la comparación de la carga de Vibrios (UFC/g de suelo) entre las diferentes dosis del conglomerado a base de <i>B. subtilis</i> y <i>B.</i> <i>licheniformis</i> .....	37
<b>Tabla 10</b> Estadísticos descriptivos del contenido de MO, CO y COO en el sedimento tratado con diferentes dosis del conglomerado bacteriano .....	55

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo A</b> Homogenización de las muestras de suelo.....	52
<b>Anexo B</b> Secado de las muestras de suelo a 60 °C por 48 horas.....	52
<b>Anexo C</b> Tamizado de muestras de suelo luego ser secada .....	52
<b>Anexo D</b> Pesaje de muestra de suelo.....	53
<b>Anexo E</b> Fase de digestión del suelo mediante ácido sulfúrico y dicromato de potasio .....	53
<b>Anexo F</b> Fase de titulación mediante solución de sulfato ferroso amoniacal .....	53
<b>Anexo G</b> Plaqueo de medio de cultivo.....	54
<b>Anexo H</b> Siembra microbiológica de muestras de suelo.....	54
<b>Anexo I</b> Siembra microbiológica del conglomerado bacteriano (BIO.BS.BL) .....	54
<b>Anexo J</b> Placas con colonias de Vibrios de las muestras de suelo.....	55
<b>Anexo K</b> Placas con colonias de Bacillus del BIO.BS.BL .....	55

## 1 INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el sector con más rápido crecimiento ha sido la acuicultura, presentado un promedio anual en la tasa de crecimiento de más del 8%. El resultado de tan rápido crecimiento que ha tenido la acuicultura se debe a la intensificación de la práctica de cultivo para generar un alto rendimiento en la producción con la finalidad de cumplir la demanda mundial de productos del mar (Jasmin *et al.*, 2020).

El incremento paulatino en la demanda de los productos del mar, ha generado un aumento anual en la producción de camarón en el Ecuador, con lo cual las prácticas de cultivo extensivas han tenido que tecnificarse a un sistema de cultivo semi-intensivo o en algunos casos a intensivos (Gabino, 2017). Sin embargo, este tipo preferido de práctica de cultivo ha generado un crecimiento en la acumulación de materia orgánica contribuyendo en gran medida a los desechos orgánicos y compuestos tóxicos que se depositan en el fondo de los estanques (Lopes *et al.*, 2020).

El sedimento o lodo que se produce de la práctica de la camaronicultura está formada por compuesto nitrogenados, fosforo y carbono orgánico disuelto (Jasmin *et al.*, 2020), dicha carga orgánica tiene su origen de resto de microorganismos (bentos, zooplancton y fitoplancton), fertilizantes orgánicos, alimento no consumido, sedimentos minerales, desechos animales, muda, insumos terapéuticos y profilácticos (Boyd, 2016). Todos los materiales de degradación orgánica anteriormente mencionados, afectan de forma negativa al ecosistema del estanque, sobre todo cuando la carga orgánica supera la capacidad natural de reciclaje de nutrientes (Jasmin *et al.*, 2020).

Entre las consecuencias que traería consigo la acumulación de materia orgánica a la producción de camarón están: disminución del hábitat de los organismos en cultivo ocasionado por las zonas anoxicas, menor supervivencia, acumulación de compuestos nitrogenados tóxicos y disminuyen los niveles de oxígeno disuelto (Lopes *et al.*, 2021).

Por lo tanto, una de las soluciones a este problema es a través de la biorremediación que, según Ron *et al.* (2020) es la introducción de algún elemento biológico (bacterias, enzimas,

etc.) a la unidad de cultivo con el proposito de acelerar la degradación de la materia orgánica y a su vez proporcionar un equilibrio entre las cantidades de desechos organicos que se recuperan y se producen en el sistema de forma inocua.

La biorremediacion cuenta con varios candidatos micriobianos, en los cuales destaca las bacterias probioticas perteneciente al genero *Bacillus*, ya que pueden ser utilizadas en la alimentacion, no son toxicas ni patogenas y aceleran la descomposicion de materia orgánica proporcionando una mejor calidad en los fondos de los estanques. Los *Bacillus* han sido puesto a prueba como biorremediadores, lo que ha permitido conocer su relevancia en el sostenimiento de los niveles de oxigeno, el ciclo del nitrogeno (desnitrificación y nitrificación) y la degradacion de residuos organicos (Lopes *et al.*, 2021).

Sin embargo, a pesar de conocer los beneficios de las bacterias biorremediadoras es preciso obtener más información sobre estas, para poder desarrollar mejores métodos de control de los sedimentos, por tal razón, la presente investigación se centra en verificar la eficacia de la biorremediación llevada a cabo por bacterias *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* como una estrategia biológica para incrementar la descomposición de compuestos orgánicos en estanques de cultivo de camarón (*Penaeus vannamei*).

## 2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La producción acuícola en el Ecuador se divide en dos grandes grupos, en él se encuentra la Tilapia y Camarón (*P. vannamei*), siendo este último aquella especie que tiene un mayor índice de producción. Por consiguiente, el aumento en la producción junto con la intensificación en los distintos sistemas de cultivo (semi-intensivo, intensivo y super intensivo) a resultado en una mayor carga orgánica producida por fuentes alóctonas y autóctonas de los estanques de cultivo, estos traen consigo una serie de problemas en la producción como es un aumento en la demanda biológica y química del oxígeno, generación de compuestos tóxicos (amonio, nitrito, sulfuro de hidrógeno) e incluso enfermedades.

No obstante, la materia orgánica puede llegar a ser utilizada como sustrato para microorganismos que llegan conformar parte de la cadena trófica de un estanque, incluso según Huerta (2018) juegan un rol importante en los ecosistemas acuicolas que incluye la capacidad de reciclaje de nutrientes, junto con la regulación, mantenimiento y restauración de la calidad del agua y suelo. Sin embargo, Ron *et al.* (2020) mencionan que en los estanques de cultivo la capacidad bacteriana natural para degradar sedimentos tiende ser superada por la velocidad en que se aglomeran, por lo que se requiere medidas de manejo de residuos orgánicos, con el objetivo de evitar que la acumulación no sobrepase los límites y comience a generar problemas a nivel bacteriano y en los parámetros fisicoquímicos.

Por lo tanto, para contrarrestar la situación anteriormente mencionada se ha planteado estrategias biológicas, por ejemplo, la biorremediación. La biorremediación es en sí, es una herramienta biotecnológica que puede ser utilizada para el reciclaje de los nutrientes de los residuos orgánicos del suelo y la mineralización de compuesto nitrogenados, esto a través de bacterias que presenta enzimas que posibilitan la capacidad de descomponer estos compuestos.

### 3 JUSTIFICACIÓN

Una estrategia a la carga excesiva de la materia orgánica en los cultivos es la biorremediación, la cual es llevada a cabo por bacterias que, de acuerdo con Martínez *et al.* (2014) cumple un papel importante en el reciclamiento de nutrientes mediante diferentes ciclos biogeoquímicos, como fuente de alimento para organismos superiores y sirven de descomponedores de materia orgánica. Siendo este último, según Lopes *et al.* (2021) llevado a cabo mediante vías enzimáticas extracelulares, ya sea en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Debido a que casi todos los compuestos orgánicos pueden degradarse biológicamente si se proporciona el tiempo suficiente y las condiciones físicas y químicas adecuadas (Hanh *et al.*, 2005).

La biorremediación proporciona múltiples beneficios como es optimizar las tasas de nitrificación para conservar bajas las concentraciones de amoníaco; mejorar las tasas de desnitrificación para la mitigación de la acumulación excesiva de nitrógeno de los estanques (ejemplo: gas nitrógeno), aumentar la oxidación de sulfuro para disminuir la concentración de sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S), mejorar la mineralización de fuentes de carbono a dióxido (CO<sub>2</sub>) de carbono para disminuir el hacinamiento de lodos, maximizar la productividad primaria que estimule el cultivo de camarones como también otros cultivos secundarios para mantener una biota en los estanques estable y diversa donde las bacterias patógenas no se vuelvan dominantes (Rosamma & Swapna, 2006).

Por lo cual, la finalidad de esta investigación es evaluar las facultades de biorremediación del *B. subtilis* y *B. licheniformis* en la degradación de materia orgánica que se encuentra comúnmente en el fondo de los estanques de cultivo de *P. vannamei*.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la aplicación de diferentes dosis de un consorcio bacteriano elaborado a base de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* en el contenido de materia orgánica, carbono orgánico, carbono orgánico oxidable y *Vibrio sp.* en sedimentos procedentes de piscinas camaroneras.

### 4.2 Objetivos específicos

- Evaluar de manera *in vitro* el efecto producido por los *Bacillus* en el sedimento mediante la medición de materia orgánica, carbono orgánico y carbono orgánico oxidable.
- Determinar la dosis apropiada del conglomerado bacteriano a base de *Bacillus* a partir de la degradación de la materia orgánica presente en el sedimento.
- Evaluar los cambios provocados en la carga de *Vibrio sp.* presente en el suelo de un estanque acuícola con la aplicación de diferentes dosis de *B. subtilis* y *B. licheniformis*.

### 4.3 Hipótesis

El uso del conglomerado bacteriano a base de *B. subtilis* y *B. licheniformis* permitirá lograr una mayor degradación de los residuos orgánicos procedentes de estanques de cultivo de *P. vannamei*.

## 5 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 5.1 Sedimento y materia orgánica en cultivos acuícolas

Los desechos producidos por la acuicultura se clasifican en cuatro formas: sólidos, semisólidos, gases y líquidos. Los residuos orgánicos que se sedimentan en los fondos de los estanques se consideran semisólidos y sólidos. Investigaciones anteriores se refieren a estos materiales que se depositan en el fondo de las piscinas con distintos nombres, por ejemplo: “sedimento”, “lodo”, “exudado” y “suelo del fondo del estanque” (Jasmin *et al.*, 2020).

Los desechos sólidos o sedimentos se dividen en dos formas que son los sólidos sedimentados y los sólidos en suspensión. Siendo este último, compuesto por partículas finas que está suspendida en el agua, a menos que se utilice el método de sedimentación. Por otra parte, los lodos son un desecho de categoría sólido y está constituida por fosforo, compuestos nitrogenados y carbono orgánico disuelto, que puede ocasionar efectos negativos al ecosistema de un estanque cuando la concentración habitual es superada (Jasmin *et al.*, 2020).

#### 5.1.1 Materia orgánica

La materia orgánica que se encuentra en los distintos sistemas de cultivo acuícolas tiene su origen de la combinación de alimento no consumido, heces, organismos muertos, fertilizantes orgánicos (Boyd, 2020), materia vegetal en descomposición, protozoos, hongos, bacterias, desechos transportados por el aire y residuos de insumos profilácticos y terapéuticos (Jasmin *et al.*, 2020). Cuando los materiales de descomposición orgánica exceden a la capacidad de asimilación de los estanques acuícolas, llegan a producir un desgaste de la calidad de agua por la acumulación de nitratos, nitritos, amonio y otros compuestos, los cuales son tóxicos para la biota de los estanques, deteriorando al mismo tiempo la concentración de oxígeno disuelto, pH (Navarrete *et al.*, 2022) e inclusive aumenta la cantidad de los patógenos oportunistas, ya que pueden llegar a controlar los nichos ecológicos e inducir la muerte de los organismos en cultivo cuando las condiciones del ecosistema (estanque) llegan a deteriorarse (Alfiansah *et al.*, 2018; Olmos *et al.*, 2020).

### **5.1.1.1 *Materia orgánica lábil y refractaria***

Gran parte de los residuos orgánicos no llegan a degradarse completamente en un corto periodo de tiempo, y las tasas de surgimiento de las diferentes formas de la materia orgánica llegan a variar correspondientemente a sus distintos componentes. Por ejemplo, la materia orgánica lábil tiene una degradación rápida y está compuesta por proteínas, glucosa, almidón y celulosa. Por otra parte, componentes como los taninos, ceras y ligninas., tienen un ritmo de descomposición más lenta y son conocidos como materia orgánica recalcitrante (Boyd, 2020).

El en cultivo en jaulas como en estanques, los residuos orgánicos se alojan en el fondo y forman una capa floculante de unos pocos milímetros a un centímetro o más de espesor, la cual contiene una elevada concentración de sólidos suspendidos en el fondo, por tal razón la concentración de materia orgánica es elevada, alrededor de 2 a 5 cm por encima del suelo del fondo. Además, dentro de la capa la descomposición de los residuos orgánicos es acelerada y el oxígeno disuelto se disminuye en el agua de los poros del suelo. Por lo cual, dentro de la zona aeróbica del suelo y la capa floculante ocurre una descomposición aeróbica de la materia orgánica lábil, en cambio la parte recalcitrante se combina con el suelo subyacente y se descompone, aunque a un ritmo más lento (Boyd, 2020).

## **5.2 *Papel de la ecología microbiana***

Los microorganismos tienen un rol importante en la ecología del ecosistema como también en la economía. Desde un enfoque ecológico, representan al grupo más versátil y numeroso en cualquier hábitat acuático y terrestre (Martínez *et al.*, 2014). En caso de las bacterias, encontrándose en forma de células en reposo, esporas o células en activo crecimiento, reproduciéndose por fisión binaria (Boyd, 2017), teniendo la ventaja de utilizar cualquier compuesto orgánico como un sustrato para desarrollarse (Martínez *et al.*, 2014), pudiendo residir en los sedimentos, como también en el agua, así como dentro y fuera de las especies de cultivo acuícola (Ron *et al.*, 2020).

Sin embargo, el sustrato en donde se alojan también la utiliza en una tasa exponencialmente creciente, lo que ocasiona que la fracción de fácil oxidación del sustrato disminuya en respuesta a la degradación microbiana, hipotéticamente que no se suministre más. El crecimiento bacteriano disminuirá, y cuando el sustrato con materia fácilmente oxidable se agote, la población bacteriana por consecuente disminuirá a un nivel bajo. Por lo cual, la bacteria cae a la fase descendente de su patrón de crecimiento (Boyd, 2017).

**Figura 1** Patrón de crecimiento bacteriano



**Fuente:** Morse & Meitzner (2016)

**Tabla 1** Fases que componen el patrón de crecimiento bacteriano

Fases	Nombre	Fenomeno fisiológico
1	Latencia	Fase de adaptación al nuevo ambiente, no hay división celular y la célula está sintetizando nuevos componentes. La fase latencia puede llegar a alargarse dependiendo de la bacteria y la diferencia química del medio original al nuevo.
2	Adaptación exponencial	La multiplicación bacteriana se realiza activamente de forma exponencial, es decir que crecen y se dividen a la máxima velocidad que le permite su potencial genético. Este proceso continúa hasta que uno o más nutrientes del medio se agoten, o

---

		se genere una acumulación de elevada de metabólicos tóxicos que disminuya el crecimiento.
3	Transición estacionaria	Disminuye la división bacterina y se equilibra con la cantidad de bacterias que perecen con las que se dividen. La cantidad de bacterias totales permanece constante y varía en función de la acumulación de productos tóxicos o disponibilidad de los nutrientes.
4	Declinación	El número de bacterias muertas por acumulación de metabolitos tóxicos es mayor aquellos que pueden dividirse. Disminuye la cantidad de bacterias viables. Sin embargo, una vez que la mayoría de las bacterias hayan perecido, disminuye la tasa de mortalidad de manera drástica, de tal forma que un numero pequeño de supervivientes puede perseverar durante meses.

---

**Fuente:** adaptado de Morse & Meitzner (2016) y Pucci (2019)

Además, las bacterias, al igual que cualquier otro organismo, como son los animales y las plantas, tienen estrategias que les permite perdurar con éxito y perseverar en las comunidades. Desde el esquema de la ecología microbiana se los clasifica en estrategia r-K, en donde la evolución favorece a la adaptación relacionada a las altas tasas de reproducción (estrategas r) o al uso óptimo (conservación) de recursos ambientales (estrategas K) (Atlas *et al.*, 2002), por lo que en acuicultura es preferible un ambiente con una baja carga organica, ya que lo contrario se relaciona a microorganismos de rapido crecimiento, que son llamados como estrategias-r. Los microorganismos pertenecientes a los estrategias r suelen patogenos oportunista (como el *Vibrio*) que puede llegar a ocasionar enfermedades en organismos que se encuentran estresados o inmunodeprimidos (De Schryver & Vadstein., 2014; Vadstein *et al.*, 2018)

Por otra parte, desde el punto de vista económico, la investigación y análisis de bacterias benéficas (generalmente estrategias r) en la acuicultura es reciente, pretendiendo disminuir el impacto ecológico que ocasiona la acuicultura (Pérez *et al.*, 2020), y han sido utilizados bajo el término de probiótico que se define como bacterias vivas introducidas con el alimentos o

agua, que promueve una buena salud del huésped (El-Saadony *et al.*, 2021). Los probióticos traen consigo una serie de ventajas que benefician a los organismos en cultivo por sus efectos antagónicos ante bacterias patógenas en el tracto digestivo (Tuan *et al.*, 2013; Pérez *et al.*, 2020) y el incremento en la tasa de crecimiento en los organismos de cultivo (Dat *et al.*, 2019).

Además, cuentan con la capacidad de alterar las formas del material orgánico (Sangwan & Dukare, 2018), metales pesados y carga de contaminantes. Entre las bacterias que son candidatos para los procesos de biorremediación están *Nitrosomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Saccharomyces*, *Nitrosobacter* (Dat *et al.*, 2019), *Lactobacillus*, *Bacillus* y *Thiobacillus* (Widiyanto *et al.*, 2019). Algunas de sus funciones se indican en la Tabla 2.

**Tabla 2** Ejemplo de algunas bacterias benéficas y sus funciones

<b>Tipo de bacterias</b>	<b>Rol o función</b>
<i>Bacillus sp.</i>	Mineralización y desnaturalización de proteínas (MO) y amonio
<i>Lactobacillus sp.</i>	Inhibición de bacterias patógenas
<i>Nitrosomonas sp.</i>	Oxidación de amonio
<i>Nitrobacter sp.</i>	Oxidación de nitritos
<i>Aerobacter sp.</i>	Reducción de materia orgánica
<i>Cellulomonas sp.</i>	Desnaturalización de material vegetal
<i>Thiobacillus sp.</i>	Reduce sulfitos conjuntamente con la desnitrificación
<i>Paracoccus sp.</i>	Degradación de ácido sulfhídrico (H <sub>2</sub> S) y remueve eficientemente amonio
<i>Rhodobacter sp.</i>	Degradación de materia orgánica, nitrito y ácido sulfhídrico (H <sub>2</sub> S)

**Fuente:** Ron *et al.* (2020)

### 5.3 Biorremediación

La biorremediación puede definirse como una tecnología que utiliza organismos vivos, principalmente microorganismos (hongos, algas, bacterias, etc.), para descontaminar áreas mediante la transformación de contaminantes complejos en compuestos más simples cuyo

efecto toxico es eliminado o disminuido (Torres *et al.*, 2018; Shyam *et al.*, 2021). No obstante, no todos los microorganismos tienen el potencial para la degradación de los contaminantes en productos consumibles, simples e inofensivos (Shivalkar *et al.*, 2021).

Por otra parte, los efectos producidos por la biorremediación puede ser verificado o monitoreado mediante distintos métodos como: la medición del potencial redox del suelo o el agua en conjunto con la temperatura y el pH; un análisis microbiológico; una evaluación de la respiración del agua y del suelo; por ultimo una determinación de los compuestos derivados de la descomposición de la materia orgánica (Ron *et al.*, 2020) por ejemplo: los compuestos nitrogenados, carbono orgánico total y el carbono oxidable (De Oliveira, 2021).

Además, los microorganismos mantienen un rol importante, participando directa y/o indirectamente en gran parte de los ciclos que comprende los nutrientes del ecosistema de un estanque acuícola, tal como son los ciclos del fosforo, nitrógeno, carbono y de compuestos sulfurados, entre otros (Ron *et al.*, 2020).

#### **5.4 Participación de las bacterias en la biorremediación**

Los microbios cuentan con la capacidad de modificar casi todas las formas del material orgánico, capacidades en los mecanismos catalíticos y su facultad para funcionar en condiciones anaeróbicas y extremas, los convierte en uno de los candidatos con más potencial para los procesos de biorremediación (Sangwan & Dukare , 2018). En estos procesos no es necesario que las bacterias sean autóctonas del sitio a descontaminar, ya que es posible utilizar especies exógenas o genéticamente modificados con la misma finalidad (Jasmin *et al.*, 2020).

En la biorremediación los microorganismos se dividen según la función que cumple y la fuente de carbono que necesitan. Entre estos encontramos los heterótrofos y autótrofos, estos últimos presentan la capacidad de transformar y adsorber el nitrógeno y fosforo soluble. Las bacterias oxidantes de amoniac y bacterias oxidantes de nitrito, pertenecen al grupo de bacterias autótrofas (Jasmin *et al.*, 2020). En cambio, las bacterias heterótrofas, funcionan como una alternativa muy poderosa para la conversión de compuesto nitrogenados, como es

el nitrógeno inorgánico que es potencialmente tóxico, a nitrógeno orgánico que es relativamente estable (Vinothkumar *et al.*, 2021).

Asimismo, las bacterias heterotróficas tienen la capacidad de inmovilizar o destruir los residuos orgánicos no vivos para la formación de nuevo material celular y como suministro de energía para el crecimiento de los mismos. Estas bacterias, a cambio, llegan a actuar como donantes de electrones en los procesos de canalización de oxidación de contaminantes (Jasmin *et al.*, 2020).

Por otro lado, Jasmin *et al.* (2020) mencionan que la diferencia que existe con las bacterias autótrofas, se centra en la participación de los procesos de desnitrificación y nitrificación, ya que las bacterias heterotróficas no contribuyen de manera importante en los procesos anteriormente mencionados. Entre otras características de las bacterias se encuentra en la Tabla 3.

**Tabla 3** Características generales y requerimientos de diferentes tipos de bacterias benéficas

Características	Bacteria Heterotrófica	Bacteria Nitrificante	Bacteria Fotosintética	Bacteria oxidante del H <sub>2</sub> S
Capacidad de crecimiento	++++	+	++ (Cerca de la superficie de la piscina)	+++
Requieren carbono	Orgánico	Inorgánico (CO <sub>2</sub> )	Inorgánico (CO <sub>2</sub> )	Orgánico
Requieren nitrógeno	Orgánico o inorgánico	Inorgánico NH <sub>2</sub>	Inorgánico NH <sub>4</sub> ; N <sub>2</sub>	Orgánico o inorgánico
Habilidad fotosintética	No	No	Si	No
Degradación enzimas	+++	+/-	+	+
Remoción de amonio	Moderado	Muy fuerte	Pobre	No
Remoción de nitrito	Pobre	Muy fuerte	Muy pobre	No
Habilidad de desnitrificación	+	No	+	+++
Oxidación de H <sub>2</sub> S	Pobre	No	Moderado	Fuerte
Estabilidad del cultivo	Muy estable	Inestable	Muy inestable	Estable

**Fuente:** Ron *et al.* (2020)

Algunas de las bacterias heterotróficas con potencial biorremediador pertenecen al género Gram positivo *Paenibacillus* (por ejemplo: *Paenibacillus polymyxa*) y del género *Bacillus* (por ejemplo: *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* y *B. coagulans*), debido a que degradan eficientemente la materia orgánica en CO<sub>2</sub> a través de enzimas que colaboran en la descomposición de almidones y proteínas en moléculas más simples (Pal *et al.*, 2020).

Por lo tanto es fundamental llegar a una biorremediación exitosa sin importar el tipo de bacteria a utilizar. Según Jasmin *et al.* (2020), implica mejorar las tasas de desnitrificación, para eliminación de las concentraciones excesivas de nitrógeno de los estanques, conservar unas tasas óptimas de nitrificación para mantener baja la concentración de amoníaco, aumentar la oxidación de sulfuro para disminuir la acumulación de H<sub>2</sub>S y aumentar la mineralización de materia orgánica a CO<sub>2</sub> para una producción mínima de sedimentos.

#### **5.4.1 Factores que afectan a la biorremediación microbiana**

Las propiedades metabólicas de las bacterias y las propiedades físico-químicas de los contaminantes a biorremediar determinan la posible interacción durante el proceso de biorremediación. Sin embargo, la interacción exitosa entre los dos (bacterias y contaminante) depende de las condiciones ambientales del sitio de la interacción (Abatenh *et al.*, 2017).

La proliferación y la actividad bacteriana se ve involucrada por pH, la temperatura, el estado de los nutrientes, la concentración de oxígeno disuelto, la presencia de donantes y aceptores de electrones, la carga de contaminantes, etc., afectan la eficiencia del proceso de biorremediación. Las tasas de degradación de los contaminantes individuales también se ven afectadas por las interacciones del sustrato. El metabolismo bacteriano se ve muy afectado por las interacciones de los sustratos a diferentes concentraciones (Mishra *et al.*, 2021). La mayoría de los factores se enumeran a continuación.

##### **5.4.1.1 Disponibilidad de nutrientes**

El suministro de nutrientes evita que exista un factor limitante para la proliferación bacteriana de manera que permite un equilibrio en el medio, lo cual viene hacer esencial para la

reproducción y crecimiento microbiano, así también tiene un impacto en la eficacia y la tasa de biodegradación. El equilibrio de nutrientes esenciales como el fósforo y nitrógeno, tiene la capacidad de mejorar la eficiencia de la degradación biológica al optimizar la relación microbiana de C: N: P, ya que estos son importantes para realizar sus actividades bacterianas. Por lo tanto, la agregación de una dosis adecuada de nutrientes es un método favorable para aumentar la actividad metabólica de las bacterias y por consiguiente la tasa de biodegradación (Abatenh *et al.*, 2017).

#### **5.4.1.2 Temperatura y pH**

Uno de los factores físicos más importantes es la temperatura, debido a que determina la supervivencia de los microbios. Las rutas enzimáticas tomadas para la degradación de compuestos tienen una temperatura óptima, algo que no ocurrirá en cualquier temperatura ya que no tendrá la misma eficiencia metabólica. Incluso, el proceso de degradación de un compuesto específico necesita una temperatura específica, por lo cual la temperatura tiene la capacidad de ralentizar o acelerar los procesos de biorremediación debido a su influencia en las propiedades fisiológicas microbianas. Por lo tanto, la tasa de actividad bacteriana incrementa con la temperatura y consigue su nivel máximo a la temperatura óptima (Abatenh *et al.*, 2017).

Por otra parte, el pH también tiene un impacto en la actividad metabólica microbiana, y al igual que la temperatura puede disminuir y aumentar el proceso de descomposición de compuestos. Debido a su naturaleza ácida, básica o alcalina, los valores de pH muy bajo o muy altos dan resultados inferiores en los procesos metabólicos de las bacterias, incluso a cambios leves del mismo (Abatenh *et al.*, 2017).

Según Boyd (2016) la degradación de los residuos orgánicos llevada a cabo por bacterias, es más rápida en intervalos de temperatura de 30 a 35 °C, estos también funcionan mejor en un pH a intervalos de 7 a 8,5. Sin embargo, para especies del género *Bacillus*, según Rosabal *et al.* (2022) un pH mayor a 5,5 es óptimo para el crecimiento de estas bacterias, esto concuerda con el caso de Jiménez *et al.* (2018) que se enfocaron en el *B. subtilis*, determinando dos condiciones óptimas de crecimiento, siendo estas: 28 °C/pH 8 y 28 °C/pH 5.

No obstante, los autores anteriormente mencionados indican que estas condiciones óptimas cambian de una cepa a otra, y esto lo demuestra Hlordzi *et al.* (2020), quienes indica que la temperatura óptima para la desnitrificación es de 25 a 35 °C, siendo la tasa de degradación de nitrógeno-nitrito del *Bacillus sp.* YX-6 de hasta 90 % a una temperatura entre 25 y 40 °C, y para la remoción del nitrógeno amoniacal llevada a cabo por *Bacillus amyloliquefaciens* entre 30 °C y 35 °C, obteniendo una mayor actividad de degradación a 35 °C y a un pH de 7,0. Asimismo el estudio reveló que a temperaturas más altas (> 35 °C) y pH (> 7), la actividad de degradación se reduce gradualmente.

#### **5.4.1.3 Concentración de oxígeno**

La biodegradación microbiana se puede realizar en circunstancias anaeróbicas y aeróbicas. La presencia de oxígeno en la mayoría de las situaciones puede aumentar el metabolismo de los nutrientes (Abatenh *et al.*, 2017) y la ausencia de oxígeno produce que los compuestos orgánicos no estén completamente oxidados y resulten en productos tales como alcoholes o algunos ácidos orgánicos que pueden no ser beneficiosos para los organismos en cultivo (Ron *et al.*, 2020).

Para el caso del *B. licheniformis* y *B. subtilis*, al ser aeróbicos facultativos pueden realizar los procesos de degradación con la presencia o ausencia del oxígeno, aunque tienen una mayor eficiencia energética en la vía aeróbica. Las bacterias *B. licheniformis* tienen capacidades desnitrificantes en las dos vías, y para el caso del *B. subtilis* cuando se encuentra en condiciones anaeróbica utiliza los nitratos y nitritos como receptores de electrones finales, con la producción de gases como el óxido nítrico (Lopes *et al.*, 2021).

Por otra parte, Hlordzi *et al.* (2020) describe que el oxígeno disuelto proporciona una mayor eficiencia en el *Bacillus sp.* YX-6 para los procesos relacionados con la nitrificación, ocurriendo lo mismo con la desnitrificación. Otro ejemplo está el *Bacillus sp.* W2 que llega a eliminar hasta un 97 % de nitrógeno con 2 mg/l de oxígeno disuelto, pero cuando la concentración sube entre 4 a 5 mg/l, la eliminación del nitrógeno se reduce hasta un 85 %. Esta disminución está relacionada con el aumento del oxígeno disuelto y concuerda con Barman *et al.* (2018) quienes registraron un aumento en la tasa de desnitrificación del *B.*

*ceruus* PB88 a medida que aumentaba el oxígeno disuelto, pero luego disminuyó con un aumento mayor de la concentración de oxígeno.

#### **5.4.1.4 Contenido de humedad**

Las bacterias requieren agua adecuada para lograr su crecimiento. El contenido de humedad del suelo tiene un efecto adverso en los agentes de biodegradación (Abatenh *et al.*, 2017).

#### **5.4.1.5 Iones de metal**

Los metales son fundamentales en cantidades pequeñas para hongos y bacterias, pero en grandes concentraciones impiden en las células su actividad metabólica. Los compuestos metálicos tienen un impacto directo e indirecto en la tasa de degradación (Abatenh *et al.*, 2017). Por lo general, los metales pesados (ejemplo: plomo, cadmio, plata, cromo, mercurio, cobalto, zinc, hierro y cobre) estimulan el proceso de esporulación de las especies de *Bacillus*, lo que implica que estas bacterias utilizan los metales pesados para producir esporas, por lo cual disminuye la concentración de metales pesados (Hlordzi *et al.*, 2020). Como ejemplo tenemos al *Bacillus megaterium* que presenta efectos positivos para la producción de esporas cuando el medio de cultivo presenta As, Fe, Zn, Mn y Cu, por lo que estimula la multiplicación celular e implícitamente en la acumulación de biomasa, aumentando a su vez la biorremediación del sitio contaminado (Stefanescu, 2015).

### **5.5 Aplicación de la biorremediación en la acuicultura**

#### **5.5.1 Biorremediación de detritus orgánico**

En los ecosistemas acuáticos, el carbono detrítico de la cadena trófica llega a representar un total del 50% de flujo del carbono. De tal manera, la relación entre materia orgánica muerta y materia orgánica viva se encuentra en un rango de 100-10:1 respectivamente. Demostrando una alta concentración de material detrítico, en especial de la materia orgánica no viva (Álvarez, 2005) y al cual se puede referir también como detritus orgánico, este término incluye tanto a las partículas como a la materia disuelta (Shyam *et al.*, 2021).

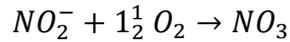
Por lo que respecta a los estanques acuícolas, los detritos son una fuente de alimento (Shyam *et al.*, 2021) y se encuentran compuestos principalmente por cadenas de carbono que están altamente disponible para los microbios. Los biorremediadores que se enfocan en la mitigación de estos materiales deben de ser capaces de eliminar eficazmente los desechos carbonáceos, tener una rápida multiplicación y una buena capacidad enzimática. Un ejemplo de bacterias que cuentan con las características mencionadas, son los miembros pertenecientes al género *Bacillus* (Barman D. , 2020).

No obstante, las bacterias del género *Bacillus* no se encuentran presente en cantidades suficientes en el agua, ya que su ambiente natural se ubica en el sedimento\_(Pal *et al.*, 2020). Por lo tanto, cuando estas bacterias se suministran al agua en cantidades idóneas, puede generar un impacto. Compitiendo con la flora microbiana autóctona presente por los residuos orgánicos disponibles, como el alimento no consumido o lixiviado, las heces de los camarones, etc. (Rosamma & Swapna, 2006).

### **5.5.2 Biorremediación de compuestos nitrogenados**

Las concentraciones de nitrógeno que superan la facultad de absorción de un estanque produce un desgaste en la calidad de agua mediante la aglomeración de compuestos nitrogenados (nitrito, amoníaco) con toxicidad para camarones (Barman D. , 2020), del mismo modo ocasiona una disminución de la tasa de excreción de los animales acuáticos, lo que conduce a un incremento del nivel de amoníaco en la sangre y los tejidos, disminuye el absorción de oxígeno en los tejidos y afecta la actividad de las enzimas metabólicas. Todos estos cambios causan estrés en los animales haciéndolos más susceptibles a infecciones por enfermedades (Jasmin *et al.*, 2020).

Una de las fuentes del amoníaco en los estanques acuícolas se debe a las heces de los organismos en cultivo, el flujo de lodos procedentes de la mineralización de los materiales de biodegradación y la difusión molecular a partir del exudado reducido, pero la deposición atmosférica y la fijación de nitrógeno por cianobacterias son ocasionalmente importantes (Rosamma & Swapna, 2006). La nitrificación procede de la siguiente manera:



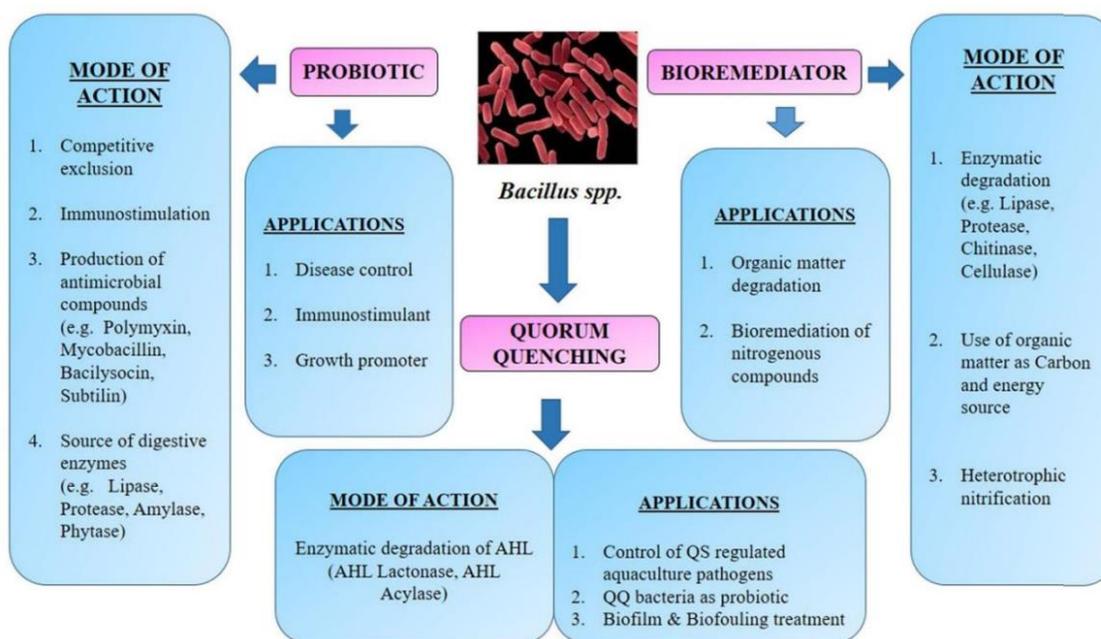
El método más práctico para la mitigación del amoníaco perteneciente a los sistemas de cultivo cerrado se logra a través de la nitrificación bacteriológica que es normalmente llevada a cabo por biofiltros de grava y arena. Se conocen cinco géneros que se utilizan para la oxidación de amoníaco que son Nitrospira, Nitrosomonas, Nitrolobus, Nitrosococcus y Nitrosovibrio, y los oxidantes de nitrito en tres géneros Nitrospira, Nitrobacter y Nitrococcus. Por otro lado, existen algunos nitrificadores heterótrofos que reducen a niveles bajos las concentraciones de nitrato y nitrito, normalmente, estos utilizan fuentes orgánicas de nitrógeno en lugar de nitrito o amoníaco (Barman., 2020).

La desnitrificación es la fase final del ciclo del nitrógeno. Una vez finalizado el proceso de desnitrificación, se liberará al medio ambiente la forma más segura de nitrógeno que es el gas nitrógeno. Al menos 14 géneros de bacterias desnitrificantes se han logrado identificar: Alcaligenes, Bacillus, Gemmobacter, Pseudomonas, Arthrobacter, Rheinheimera, Pseudochrobactrum, Pannonibacter, Rhodococcus, Rhizobium, Paracoccus, Gordonia, Brevundimonas y Stenotrophomonas (Jasmin *et al.*, 2020).

## 5.6 Bacillus

Las bacterias probióticas asociadas al huésped que han sido mejor estudiadas pertenecen al género Bacillus (James *et al.*, 2021). Este género es Gram positivo y comprende aproximadamente 200 especies bacterianas, que son casi ubicuas en la naturaleza: se localizan en el suelo. Presentan propiedades fisiológicas bastante diversas, como la capacidad de esporulación, producción de sustancias antimicrobianas y enzimas (celulasa, fitasa, tanasa, quitinasa, xilanas, proteasa y lipasa), estas características proporcionan que las especies del género Bacillus puedan colonizar diferentes hábitats (Soltani *et al.*, 2019)

**Figura 2** Aplicaciones y modo de acción del Bacillus en la acuicultura



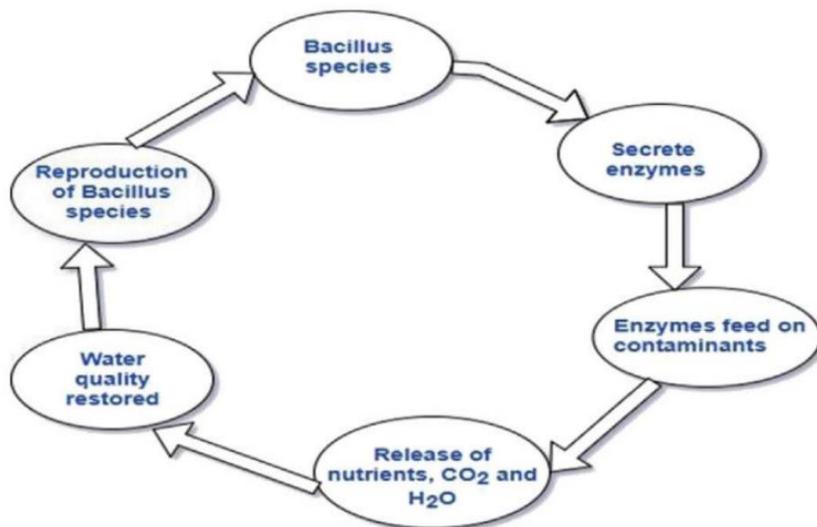
**Fuente:** James *et al.* (2021)

Asimismo, disminuye la concentración de partículas y carbono orgánico disuelto (Hlodzi *et al.*, 2020). Además, son heterogéneas, tanto fenotípica como genotípicamente. En consecuencia, tienen la capacidad de degradar diferentes sustratos derivados de fuentes vegetales o animales que incluyen celulosa, almidón, proteínas, hidrocarburos, y diversos factores antinutricionales. Por demás, las especies de *Bacillus* pueden ser reductores y oxidantes de manganeso, oxidantes de selenio, precipitadores de hierro, quimiolitotrofos facultativos, termófilos, acidófilos, psicrófilos y alcalófilos. Igualmente son nitrificantes, desnitrificantes y fijadores de nitrógeno (Soltani *et al.*, 2019).

Por último, las enzimas extracelulares y los péptidos antimicrobianos producidos por este género, controlan las bacterias patógenas, mejoran la calidad del agua y eliminan el nitrógeno en los sistemas de cultivo acuícola (Figura 3) (Kuebutornye *et al.*, 2019). Estas dos últimas características se deben a que tiene la facultad de descomponer la materia orgánica utilizándolo como material de crecimiento celular ya sea el carbono orgánico e inorgánico, a su vez que convierte los residuos orgánicos de forma efectiva en CO<sub>2</sub>, (este producto de desecho puede llegar a ser utilizado por las proteobacterias  $\gamma$  y  $\beta$  como fuente de carbono) a

diferencia con otras bacterias que transforman gran parte de la materia orgánica en biomasa bacteriana o limo. Por lo tanto, estas bacterias son favorables para controlar la carga orgánica de los estanques de acuicultura (Hlordzi *et al.*, 2020).

**Figura 3** Acción del *Bacillus* en la mejora de la calidad del agua



**Fuente:** Kuebutornye *et al.* (2019)

### 5.6.1 Mecanismo de acción para la biotransformación de compuestos tóxicos

Las especies de *Bacillus* se usan ampliamente para eliminar desechos orgánicos, metales pesados y otros compuestos contaminantes. Algunas de las enzimas producidas por los *Bacillus*, son la lipasa, proteasa, amilasa, fitasa, quitinasas, celulasas y  $\gamma$ -1,3-glucanasas (James *et al.*, 2021). Estas enzimas pertenecen al grupo de enzimas hidrolíticas que tiene un potencial en la biorremediación de material orgánico (Bhandar *et al.*, 2021), como son los desechos orgánicos en los estanques acuícolas.

Las enzimas hidrolíticas que posee el *Bacillus* le permiten la descomposición de los enlaces ácido fítico impidiendo que se genere la quelación de los diferentes minerales que se localizan en la biomasa, así evitando que el fósforo y los diversos elementos traza se tornen insolubles y se precipiten. En esto radica la relevancia de la acción bacteriana ante el ciclo del fósforo y otros nutrientes (Rosabal *et al.*, 2022).

Por otro lado, la materia orgánica que se encuentra disuelta en los ecosistemas acuáticos, esta se encuentra constituida en gran parte por compuestos de alto peso molecular, en cual están los biopolímeros, como geopolímeros, polinucleótidos, polisacáridos, lípidos y proteínas., en estos existe también componentes lignocelulósicos provenientes de plantas superiores, y que representan entre un 80 a 90% de la materia orgánica disuelta. Estos últimos tienen en su mayoría compuestos húmicos y son altamente recalcitrantes (Álvarez, 2005).

Las sustancias anteriormente descritas generalmente se metaboliza de 0,5 a 1,0 % por día en los ecosistemas acuáticos, esto a través de procesos llevados a cabo por enzimas hidrolíticas extracelulares de bacterias como el *Bacillus*, ya que estas logran romper los compuestos orgánicos complejos en monómeros que facilitan su absorción, por lo tanto, la actividad y la producción enzimática por parte de las bacterias constituye un limitante en la descomposición de los residuos orgánicos en los sistemas acuáticos (Álvarez, 2005).

## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Ubicación del experimento

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Citogenética. Se encuentran ubicado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias cuya dirección es P35P+CCW, E583, El Cambio y tienen las siguientes coordenadas: -3.291656, -79.914164

**Figura 4** Ubicación del laboratorio de Citogenética en la Facultad de Ciencias Agropecuarias



**Fuente:** Google Earth (2023)

### 6.2 Materiales y reactivos

#### 6.2.1 Materiales

- Micropipeta (100 y 1000  $\mu$ l)
- Asa de Digrafsky
- Cajas Petri
- Espátula
- Varilla de vidrio
- Mechero de alcohol

- Pera de succión
- Balón aforado de 100 ml
- Bureta de 25 ml
- Tubos de ensayo de 15 ml
- Vaso de precipitación (250 y 50 ml)
- Pipeta (10 y 5 ml)
- Erlenmeyer de 250 ml

### **6.2.2 Equipos**

- Cámara de extracción
- Balanza
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Incubadora
- Cocineta eléctrica

### **6.2.3 Insumos de laboratorio**

- CHROMagar™ Vibrio
- Agar Triptona-Soja (TSA)
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Agua destilada
- Alcohol industrial

### **6.2.4 Reactivos**

- Dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) 1N
- Ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) concentrado
- Ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) al 85%
- Indicador difenilamina ( $(C_6H_5)_2NH$ )

### 6.3 Diseño experimental

Para esta investigación se utilizó un diseño completamente al azar con el objetivo de presentar homogeneidad en el material y entorno experimental, donde se manipula un factor de estudio (conglomerado bacteriano a base de *Bacillus*) y se segmentó en cuatro tratamientos (Tabla 5), replicando tres veces, conformándose doce unidades experimentales (peceras plásticas) con capacidad de 15 litros de  $32,5 \times 24 \times 20$  cm (largo x ancho x alto), cubiertas de sedimento hasta una altura aproximada de 10 cm y 5 cm de columna de agua con la misma salinidad (27 ups) de donde fue extraída la muestra de suelo, por último, agregando aireación constante para proporcionar condiciones aeróbicas.

**Tabla 4** Croquis del experimento establecido

Tratamientos			
T0	T1	T3	T2
T1	T2	T0	T3
T1	T0	T2	T3

#### 6.3.1 Modelo matemático (diseño completamente al azar)

Modelo estadístico lineal para un diseño completamente al azar:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$ = Variable respuesta de la ij-esima unidad experimental

$\mu$ =Efecto de la media general

$\tau_i$  =Efecto del i-esimo tratamiento

$\varepsilon_{ij}$ = Efecto del error experimental asociado a la i-esima unidad experimental

### 6.3.2 Caracterización de los tratamientos

El producto seleccionado para utilizarlo como tratamiento es el BIO.BS.BL fabricado por la empresa Ecoalternativas S.A. con sede en Quito, que cuenta con una concentración de  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  UFC/ml de *B. subtilis* y *B. licheniformis*, respectivamente.

Los tratamientos en la Tabla 5 muestran los valores utilizados para  $780 \text{ cm}^2$  y están relacionadas a la dosis recomendada por el producto que es 1,5 l/ha. Las dosis fueron activadas durante 20 horas para llegar a la fase exponencial según Gallardo (2015) citado por Collaguazo & Tenorio (2018) y para la activación se utilizó a Rosabal *et al.* (2022) modificado, donde se aplicó 24 ml de melaza, 2 g de urea y 1000 ml de agua de mar filtrada a 27 ups.

**Tabla 5** Tratamiento objeto de estudio

Tratamientos	Dosis del producto ( $\mu\text{l}$ )	Equivalente ( $\text{L ha}^{-1}$ )
T0	0	0
T1	11,7	1,5
T2	23,4	3
T3	35,1	4,5

## 6.4 Variables a medir

La medición de las variables dependientes descritas a continuación, fueron realizadas en el sedimento de cada una de las peceras plásticas. Asimismo, la medición de las variables intervinientes, fueron realizadas en el mismo a excepción del OD.

### 6.4.1 Variables dependientes

- **Concentración de Carbono Orgánico Total ( $\text{g kg}^{-1}$ ):** Variable cuantitativa medida a través del método de Walkley & Black.

- **Concentración de Materia Orgánica y Carbono Orgánico Oxidable (g kg<sup>-1</sup>):** Variables cuantitativas obtenidas mediante la utilización de las expresiones desarrolladas por Navarro *et al.* (1993) y utilizadas por Lopes (2021) y Oliveira (2021). Cabe resaltar que la expresión de TOC fue modificada para determinar MO.

$$MO = \frac{OC - 0,48}{0,51} + 1$$

$$COO = 0,51(MO - 1) - 3.59$$

- MO: Materia orgánica
- TOC: Carbono orgánico total
- COO: Carbono orgánico oxidable
- **Poblaciones bacterianas de vibrios (UFC/gramos de suelo):** Variable cuantitativa mediante el método de diluciones sucesivas para las muestras de suelo.

#### 6.4.2 Variables intervinientes aleatorias

- **Lectura de pH y temperatura:** Variable cuantitativa medida con un multiparámetro de la marca RCYAGO, modelo EZ-9909 y un medidor de temperatura de la marca sensitech.
- **Lectura de oxígeno disuelto (OD):** Variable cuantitativa medida con un oxigenometro de la marca RCYAGO, modelo DO9100.

### 6.5 Manejo del ensayo

#### 6.5.1 Toma de muestras de suelo en campo

Las muestras de suelos fueron tomadas en campo tres días después de haber finalizado el ciclo de productivo en una piscina (4 ha) en la camaronera Pesquera Rojas (83 ha), ubicada en P24H+C88 Machala que tiene las siguientes coordenadas 3°17'38.3"S 79°58'18.0"W. La metodología llevada a cabo para la extracción de las muestras de sedimento se realizó según de Oliveira (2021) y Lopes (2021), mediante la utilización de palas se recolecto 100 kg de

sedimento a una profundidad de 10 cm, en un solo punto cerca de la compuerta de salida y fueron almacenadas en fundas de plásticas para finalmente ser transportadas al lugar en donde se realizo el ensayo.

### **6.5.2 Preparación de las unidades experimentales**

Las muestras de suelo fueron llevadas al Laboratorio de Citogenética, la cantidad de 100 kg de sedimento fue mezclado de manera homogénea en un tanque de 250 L, antes de ser distribuida en las peceras plásticas a razón de una cantidad de 7,8 kg por unidad experimental hasta alcanzar los 10 cm de altura. Posteriormente se recolectó sedimento de las peceras plásticas para su posterior análisis de suelo (materia orgánica, carbono orgánico, carbono orgánico oxidable y pH) (descrito en el punto 6.6.1). Asimismo, se realizó un análisis microbiológico para conocer la carga de *Vibrio sp.* de cada una de las unidades experimentales descrito en el punto 6.6.2.

**Figura 5** Homogenización de las muestras de suelo



### **6.5.3 Aplicación de los tratamientos y monitoreo del experimento**

La aplicación de los tratamientos consistió en una colonización de tres días, en el cual se inoculó la dosis de los tratamientos en las respectivas unidades experimentales, una vez finalizada esa etapa, se inició el experimento que tuvo una duración de veinte días con la posterior aplicación de dosis de mantenimiento del conglomerado bacteriano cada 5 días, cabe mencionar que el medio de activación se ajustó a un volumen final de 100 ml por tratamiento, con respecto al tratamiento testigo se suministró únicamente el medio de

activación sin bacterias. Asimismo, se tomó el parámetro y el OD de la columna de agua de las peceras, y se registró la temperatura y pH en el sedimento. Durante el tiempo de duración del ensayo se mantuvo una columna de agua de 5 cm con agua de mar filtrada (previamente tratada con peróxido de hidrogeno) a una salinidad de 27 ups, con aireadores de la marca POWER 500.

Una vez finalizado el ensayo se procedió a realizar el análisis del suelo (punto 6.6.1). Además, de realizar el análisis microbiológico de *Vibrio sp.* mediante la metodología descrita en el punto 6.6.2.

**Figura 6** Preparación de las unidades experimentales para inicio del experimento



## **6.6 Metodología para medición de las variables y la recolección de datos**

### **6.6.1 Métodos de análisis de suelo en laboratorio**

#### ***6.6.1.1 Secado y tamizado de suelo***

Se recolectó una cantidad de 500 g de sedimento de cada una de las peceras plásticas y se distribuyeron homogéneamente en moldes de aluminio para ser secadas en estufa a 60 °C por un lapso de tiempo de 48 horas como lo describe Oliveira (2021) y Lopes (2021), debido que a temperaturas más elevadas se produce un proceso de ignición de la materia organica y por cual el método de Walkley & Black no podrá medir la cantidad calcinada.

Posteriormente es triturada en un mortero y tamizada en un tamiz No. 50. Cabe señalar que todo el proceso anteriormente descrito se realizó en el Laboratorio de Suelos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

#### **6.6.1.2 Método para determinar el potencial de hidrógeno pH**

La metodología para determinar el pH del suelo se realizó según las indicaciones de Sandoval *et al.* (2012):

- En una relación de 1:2,5 se coloca en un vaso de plástico la cantidad de 10 g y 25 ml de muestras de suelo seco (previamente tamizado) y agua destilada, respectivamente.
- Posteriormente se agita la mezcla por 3 minutos para luego dejar en reposo por 30 minutos antes de realizar la lectura con el pHmetro.

#### **6.6.1.3 Método de Walkley & Black**

El método Walkley & Black fue llevado a cabo en el Laboratorio de Suelos, utilizando como metodología el protocolo llevado a cabo por Barrezuela *et al.* (2020) que se encuentra descrito en los anexos.

### **6.6.2 Método para el análisis microbiológico**

#### **6.6.2.1 Extracción de las muestras de suelo en unidades experimentales**

Al realizar la extracción de las muestras para el análisis microbiológico del suelo, se siguió el protocolo llevado a cabo por González *et al.* (2003) quienes describen una extracción del sedimento de 2 cm o más de profundidad. Para posteriormente realizar muestras compuestas “pool” entre los tratamientos para disminuir los efectos de variabilidad de muestras individuales. Estas muestras compuestas de suelo fueron llevadas al Laboratorio de Sanidad Vegetal para su respectivo análisis.

### **6.6.2.2 Método de recuento de siembra en placa**

#### **Determinación de carga bacteriana en muestras de suelo y del conglomerado bacteriano (BIO.BS.BL)**

Las muestras compuestas fueron realizadas a razón de 20 g por cada unidad experimental, con previa combinación con sus respectivos tratamientos para posteriormente recolectar dos muestras de 1 g de sedimento para su análisis por duplicado. La siembra de la muestra de suelo fue llevada a cabo en una cámara de flujo laminar, se realizaron diluciones seriadas (1/10) en los tubos de ensayo y con el uso de un asa de Dygraski se sembraron 100 µl, esto se realizó en cada una de las diluciones para conseguir la mayor cantidad de colonias bacterianas posibles empleando el medio de cultivo CHROMagar™ Vibrio.

Posteriormente, una vez sembrado en las cajas Petri se dejaron en incubación durante 24 horas a 30 °C para finalmente realizar el conteo de colonias y determinar las unidades formadoras de colonias (UFC).

Para determinar la UFC del conglomerado bacteriano de *Bacillus* las diluciones seriadas fueron de 1/10 a 1/10<sup>10</sup> utilizando el Agar Triptona de Soya (TSA) como medio de cultivo y con la misma metodología anteriormente descrita.

### **6.7 Procedimiento estadístico**

Los datos recolectados se evaluaron mediante ANOVA de un factor inter-grupos como prueba paramétrica para comparar las varianzas entre los tratamientos con distintas concentraciones del conglomerado a base de *Bacillus* utilizando un nivel alfa = 0.05, a través del test de normalidad de Shapiro-Wilk. Además, se tomó en cuenta el cumplimiento del supuesto de homogeneidad de varianzas mediante el Test Levene. Para llevar a cabo los análisis se utilizó el software estadístico SPSS Statistics versión 25.0 Base para Windows, con una confiabilidad del 95%. Asimismo, para encontrar las similitudes o diferencias entre los tratamientos se aplicó la prueba “post-hoc” de Duncan.

## 7 RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 7.1 Análisis de los parámetros físico-químicos tomados en el ensayo

Durante el ensayo se registró los parámetros de temperatura y pH en el sedimento, que intervienen en el proceso de biorremediación bacteriana, siendo el promedio a nivel de todo el experimento de 25,72 °C y un pH de 7,92. Además, se dio lectura del oxígeno disuelto existente en la columna de agua de las unidades experimentales teniendo un promedio de 5.2 mg/l.

### 7.2 Efecto del conglomerado bacteriano a base de *Bacillus* en materia orgánica (MO), carbono orgánico (CO) y carbono orgánico oxidable (COO)

La Tabla 6 caracteriza el contenido de MO en el sedimento luego de ser tratado con diferentes dosis de *B. subtilis* y *B. licheniformis*, en donde se obtuvo para los tratamientos en que se aplicaron las diferentes dosis estudiadas de 1,5 L ha<sup>-1</sup> ( $\bar{X} = 47,25 \pm 0,94$  g kg<sup>-1</sup>), 3 L ha<sup>-1</sup> ( $\bar{X} = 46,13 \pm 1,21$  g kg<sup>-1</sup>) y 4 L ha<sup>-1</sup> ( $\bar{X} = 46,27 \pm 1,55$  g kg<sup>-1</sup>) siendo los valores con mayor concentración de MO encontrados en el tratamiento testigo ( $\bar{X} = 49,34 \pm 1,41$  g kg<sup>-1</sup>).

**Tabla 6** Estadísticos descriptivos del contenido de MO en el sedimento tratado con diferentes dosis del conglomerado bacteriano

Materia orgánica	n	$\bar{X}$	S	$ES_{\bar{X}}$	95% del IC para la media		Mín	Máx
					Límite inferior	Límite superior		
Testigo	12	49,3400	1,41008	,40706	48,4441	50,2359	47,12	51,82
1,5 L ha <sup>-1</sup>	12	47,2492	,93709	,27051	46,6538	47,8446	45,55	48,69
3 L ha <sup>-1</sup>	12	46,1350	1,21200	,34987	45,3649	46,9051	43,98	47,90
4,5 L ha <sup>-1</sup>	12	46,2675	1,55092	,44771	45,2821	47,2529	43,98	48,69
Total	48	47,2479	1,80465	,26048	46,7239	47,7719	43,98	51,82

**Nota:** n=número de observaciones realizadas.  $\bar{X}$ =Media aritmética. S=Desviación típica o estándar.  $ES_{\bar{X}}$ =Error típico o estándar de la media. IC=Intervalo de confianza. Máx=Máximo. Mín=Mínimo.

Cabe mencionar que la tabla completa del estadístico descriptivo con la información de CO y COO se encuentra en anexos (Tabla 10). Por otra parte, la prueba estadística ANOVA de un factor inter-grupos, muestra un p-valor de 0,000 con lo cual es menor al alfa establecido (0,05), por lo tanto, la media de las concentraciones de MO, CO y COO presentaron diferencias significativas en función a las diferentes dosis del conglomerado de *B. subtilis* y *B. licheniformis* (Tabla 7).

**Tabla 7** ANOVA de un factor inter-grupos para la comparación de MO, CO y COO, entre las diferentes dosis del conglomerado a bases de *B. subtilis* y *B. licheniformis*

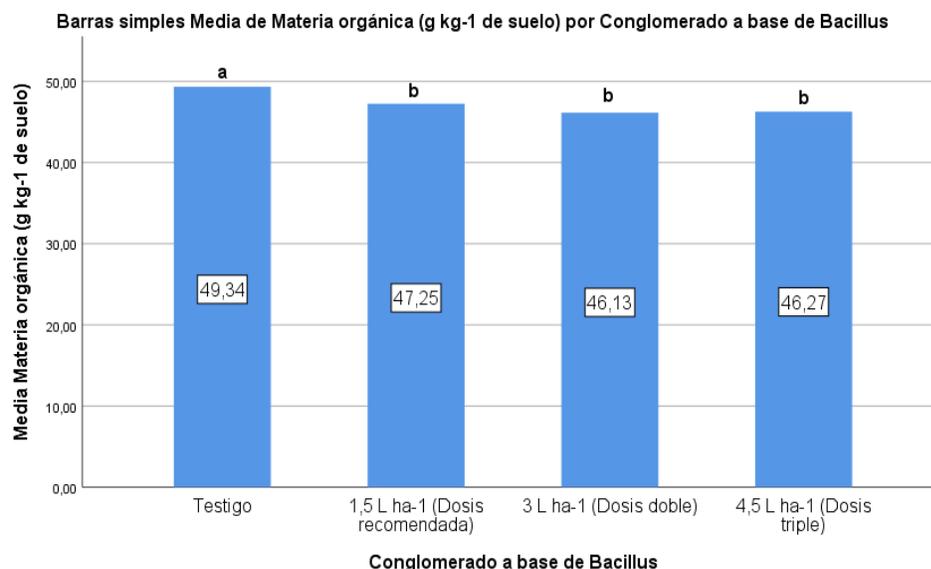
		ANOVA				
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p-valor
Materia orgánica (g kg <sup>-1</sup> de suelo)	Entre grupos	78,919	3	26,306	15,610	,000
	Dentro de grupos	74,148	44	1,685		
	Total	153,068	47			
Carbono orgánico (g kg <sup>-1</sup> de suelo)	Entre grupos	20,507	3	6,836	15,600	,000
	Dentro de grupos	19,280	44	,438		
	Total	39,787	47			
Carbono orgánico oxidable (g kg <sup>-1</sup> de suelo)	Entre grupos	20,507	3	6,836	15,600	,000
	Dentro de grupos	19,280	44	,438		
	Total	39,787	47			

**Nota:** gl=grados de libertad. F=Estadístico.

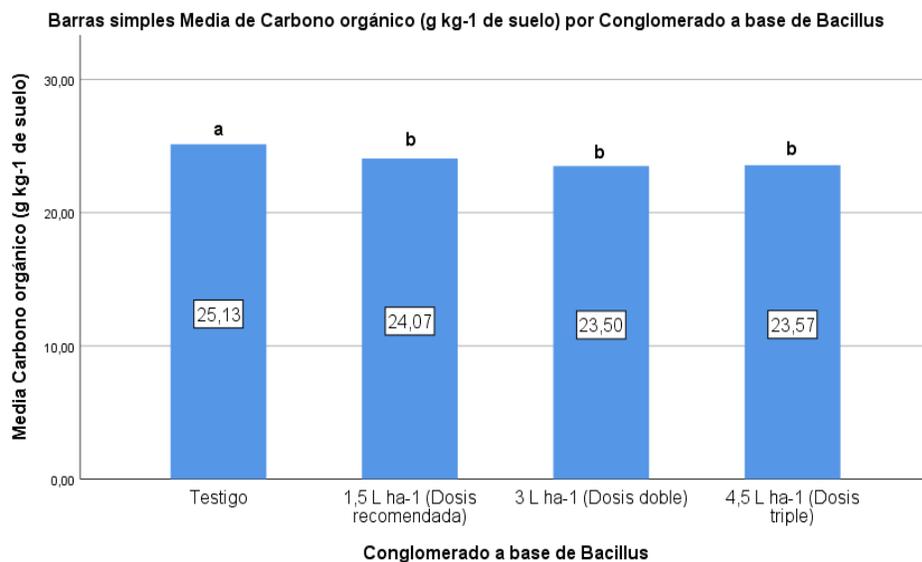
Por otro lado, la prueba post hoc de Duncan muestra dos subconjuntos homogéneos, permitiendo observar que, con la aplicación de diferentes concentraciones de *B. subtilis* y *B. licheniformis* se alcanza una reducción de la materia orgánica en todos los tratamientos (1,5; 3 y 4,5 L ha<sup>-1</sup>) cuando se comparan con el testigo (Figura 7), por lo tanto concuerda con lo mencionado por Lopes (2021) quien concluye que la aplicación de bacterias del género *Bacillus* permite aumentar la tasa de degradación de la materia orgánica en sedimento de estanques acuícolas. La reducción de MO, CO y COO puede relacionarse a la aplicación de *Bacillus* en el sedimento, debido a que bacterias Gram positivas como los *Bacillus* son eficientes y optimizan la descomposición de la materia orgánica convirtiéndola en CO<sub>2</sub> (Soltani *et al.*, 2019; Hlordzi *et al.*, 2020). Esto concuerda con lo indicado por James *et al.*

(2021) quienes mencionan que la capacidad de esporulación, la alta adaptabilidad y producción de enzimas hidrolíticas lo convierten en un agente biológico ideal para la biorremediación.

**Figura 7** Contenido de MO (a), CO (b) y COO (c) sujetos a diferentes dosis del conglomerado bacteriano *B. subtilis* y *B. licheniformis* en muestras de suelo de estanque en un modelo in vitro.

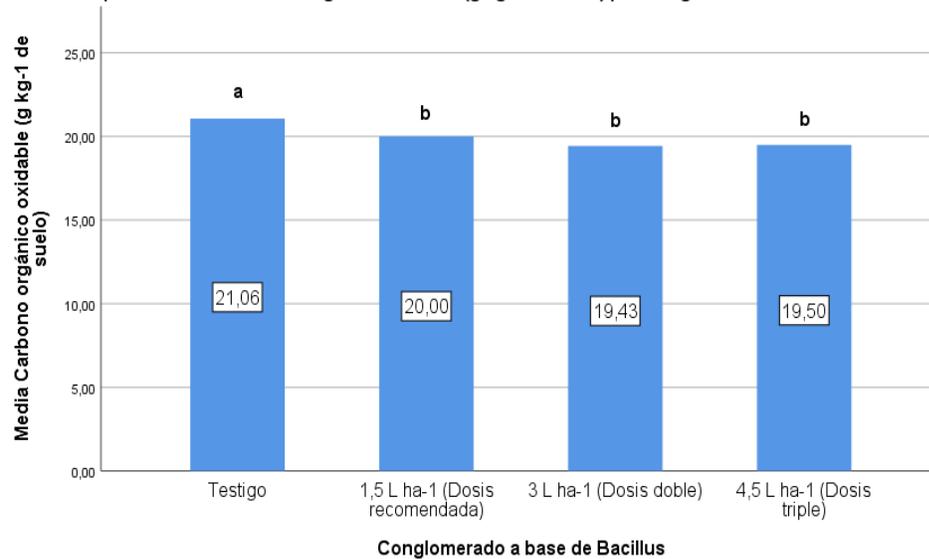


(a)



(b)

Barras simples Media de Carbono orgánico oxidable (g kg<sup>-1</sup> de suelo) por Conglomerado a base de Bacillus



(c)

**Nota:** Las letras minúsculas indican diferencia estadística entre tratamientos ( $p < 0,05$ ) (prueba de Duncan).

Los niveles de MO observados van desde 49,34 g kg<sup>-1</sup> (4,93 %) hasta 46,13 g kg<sup>-1</sup> (4,61 %) (Figura 7), los cuales no se encuentran dentro del rango considerado apropiado para el cultivo de camarón según Ron *et al.* (2020), quienes indican que los rangos óptimos de MO son  $>1\%$  y  $<4\%$ . Por demás, se determinó que al no ver diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (1,5; 3 y 4,5 L ha<sup>-1</sup>) se puede inferir que independientemente de la dosis aplicada en el ensayo puede llegar a causar el mismo efecto en los niveles de materia orgánica, por lo tanto, todos los tratamientos son similares a excepción del testigo, estos resultados son idénticos a los obtenidos por de Oliveira (2021) quien no determinó diferencias estadísticamente significativas en los niveles de MO al aplicar diferentes dosis de un biorremediador a base de *Bacillus*, no obstante, encontró una modulación en el microbioma del suelo.

Por otra parte, el nivel máximo de reducción en comparación al testigo de MO es de 6,51 %, los valores de CO del 6,49 % y de COO del 7,74% siendo menores a los obtenidos por Lopes (2021) cuyos resultados en la reducción de MO fueron de un 18,38 %, los valores de CO en 18,41 % y de COO hasta un 22,34 %. La baja reducción de MO, CO y COO se deduce que

es debido a que la bacteria no cuenta con el potencial genético para la producción de suficientes enzimas hidrolíticas que sirven para la descomposición de los desechos derivados de las piscinas camaroneras, puesto que el producto es destinado para el área agrícola y si bien el *B. subtilis* y *B. licheniformis* son utilizadas también en el campo acuícola son cepas diferentes y por tanto tienen una distinta producción de enzimas, como indica Bibi *et al.* (2017) al aislar y detectar bacterias, siendo cepas tales como el EA151 *B. licheniformis* y EA157 *B. licheniformis* totalmente diferentes en la producción enzimática, en donde el primero presentó una producción alta de celulasa y el segundo una elevada producción de proteasa, lipasa, amilasa, pero no de celulasa lo mismo ocurrió con el EA159 *B. cereus* y el EA165 *B. cereus*. Un ejemplo de bacterias especializadas para el área acuícola se ve reflejado en la investigación realizada por Artha *et al.* (2019), donde la actividad de la proteasa, amilasa y celulasa (enzimas hidrolíticas) del *B. thuringiensis*, *B. lentus* y *B. sphaericus* aislada de los sedimentos de un estanque dieron como resultado la biorremediación de desechos orgánicos derivados de la acuicultura.

Sin embargo, a pesar que el producto es de uso agrícola y está orientado para condiciones distintas, los resultados obtenidos en la reducción de MO con la aplicación de *B. subtilis* y *B. licheniformis* se debe a las propiedades del género *Bacillus*, como lo menciona Soltaní *et al.* (2021), al manifestar que la capacidad de esporulación y la producción de sustancias antimicrobianas dotan a las diferentes especies del género *Bacillus* una doble ventaja para la colonización de diferentes hábitats, lo cual está en concordancia por lo descrito en la literatura por James *et al.* (2021) quienes afirman que la producción de una variedad de antimicrobianos, junto con su capacidad de esporulación le permiten salir adelante en un entorno hostil. Por lo tanto, dado que el uso de agentes biológicos depende de su supervivencia en el medio ambiente, las especies de *Bacillus*, como bacterias formadoras de esporas, tienen claras ventajas como agentes de biorremediación (Muras *et al.*, 2021). Algunos ejemplos de especies de *Bacillus* que esporulan según Nayak (2020) son *B. cereus*, *B. polyfermenticus*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. subtilis* y *B. licheniformis*.

### 7.3 Análisis microbiológico

La carga bacteriana del producto (BIO.BS.BL) usado como biorremediador tuvo una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml de *Bacillus sp.* (Anexo K). Con respecto al análisis microbiológico de *Vibrio* la Tabla 8 caracteriza los resultados obtenidos del sedimento luego de ser tratado con diferentes dosis de *B. subtilis* y *B. licheniformis*, en donde se obtuvo para los tratamientos en que se aplicaron las diferentes dosis estudiadas de  $1,5 \text{ L ha}^{-1}$  ( $\bar{X} = 1,4000 \text{ E}+005 \pm 1,45\text{E}+005 \text{ UFC/g}$ ),  $3 \text{ L ha}^{-1}$  ( $\bar{X} = 1,3963\text{E}+005 \pm 1,32\text{E}+005 \text{ UFC/g}$ ) y  $4 \text{ L ha}^{-1}$  ( $\bar{X} = 1,3913\text{E}+005 \pm 1,42\text{E}+005 \text{ g kg}^{-1}$ ) siendo los valores con mayor concentración de *Vibrio sp.* encontrados en el tratamiento testigo ( $\bar{X} = 1,8613\text{E}+005 \pm 2,22\text{E}+005 \text{ g kg}^{-1}$ ).

**Tabla 8** Estadísticos descriptivos de la carga de *Vibrio sp.* en el sedimento tratado con las diferentes dosis del conglomerado bacteriano

	n	$\bar{X}$	S	$ES_{\bar{X}}$	95% del IC para la media		Mín	Máx
					Límite inferior	Límite superior		
Testigo	4	1,8613E+005	2,22E+005	1,11E+005	-1,67E+005	5,39E+005	1,65E+004	4,95E+005
1,5 L ha <sup>-1</sup>	4	1,4000E+005	1,45E+005	7,23E+004	-9,02E+004	3,70E+005	1,95E+004	3,25E+005
3 L ha <sup>-1</sup>	4	1,3963E+005	1,32E+005	6,60E+004	-7,03E+004	3,49E+005	2,30E+004	3,00E+005
4,5 L ha <sup>-1</sup>	4	1,3913E+005	1,42E+005	7,11E+004	-8,72E+004	3,65E+005	1,75E+004	3,20E+005
Total	16	1,5122E+005	1,48E+005	3,71E+004	7,22E+004	2,30E+005	1,65E+004	4,95E+005

**Nota:** n=número de observaciones realizadas.  $\bar{X}$ =Media aritmética. S=Desviación típica o estándar.  $ES_{\bar{X}}$ =Error típico o estándar de la media. IC=Intervalo de confianza. Máx=Máximo. Mín=Mínimo.

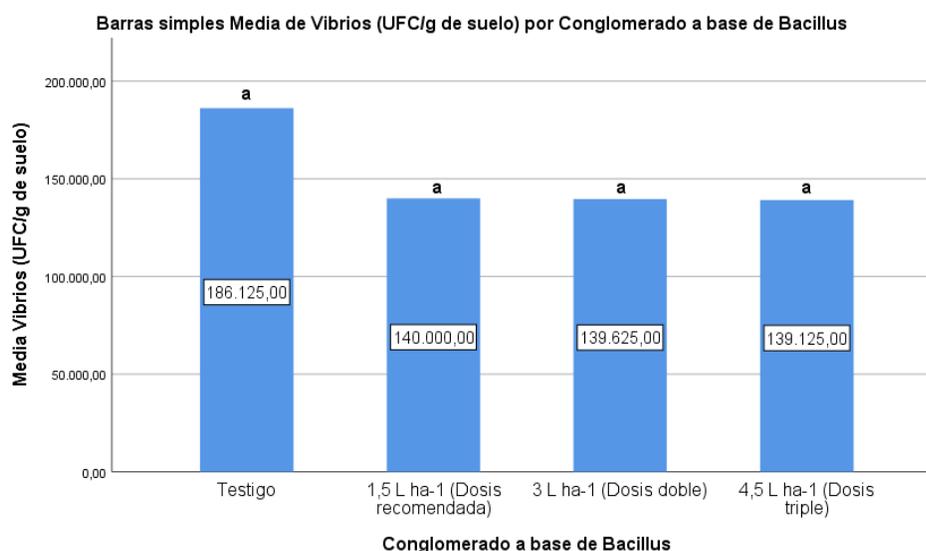
El resultado del análisis microbiológico del ensayo con respecto a la comunidad bacteriana de Vibrios (UFC/g) se analizó mediante el ANOVA de un factor inter-grupos presentado un p-valor de 0,969 el cual es mayor al alfa establecido de 0,05 por lo tanto no existen diferencias significativas en la media de las UFC de Vibrios en función a las diferentes dosis del conglomerado bacteriano a base de *B. subtilis* y *B. licheniformis* (Tabla 9).

**Tabla 9** ANOVA de un factor inter-grupos para la comparación de la carga de Vibrios (UFC/g de suelo) entre las diferentes dosis del conglomerado a base de *B. subtilis* y *B. licheniformis*

ANOVA					
Vibrios (UFC/g de suelo)					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p-valor
Entre grupos	6499921875,000	3	2166640625,000	,080	,969
Dentro de grupos	323454562500,000	12	26954546875,000		
Total	329954484375,000	15			

Nota: gl=grados de libertad. F=Estadístico F.

**Figura 8** Concentración final de *Vibrio sp.* en el sedimento en función de las diferentes dosis del conglomerado bacteriano a base de *B. subtilis* y *B. licheniformis*



Nota: Las letras minúsculas indican diferencia estadística entre tratamientos ( $p < 0,05$ ) (prueba de Duncan).

La prueba post hoc de Duncan muestra un subconjunto homogéneo, por lo cual se evidencia que la inoculación de diferentes concentraciones de *B. subtilis* y *B. licheniformis* no presenta diferencias significativas estadísticamente en la carga de Vibrios (UFC/g de suelo), no

obstante, existe una diferencia práctica al comparar los tratamientos (1,5; 3 y 4,5 L ha<sup>-1</sup>) con el testigo (Figura 8), siendo el tratamiento de 4,5 L ha<sup>-1</sup> el que presenta la menor concentración de Vibrios con una cantidad de 1,39 x 10<sup>5</sup> UFC/g. Todos los tratamientos manifiestan una carga elevada de Vibrios en el suelo como lo menciona Ron *et al.* (2020) donde indica que el rango óptimo de estas bacterias para suelos acuícolas debe estar en < 1 x 10<sup>3</sup> UFC/g.

Al comparar los resultados con otros estudios en donde analizaron el efecto de las bacterias biorremediadoras, estos encontraron una carga reducida de Vibrios. en el suelo, como lo manifiesta el estudio realizado por Wang *et al.* (2006) donde obtuvieron una cantidad de 3,65 x 10<sup>3</sup> UFC/g y que evidencia una disminución de este grupo bacteriano, lo mismo ocurre con los resultados observados por Crockett *et al.* (2022) donde encontraron una concentración de 0 UFC/g al finalizar el experimento de 28 días de duración.

Los resultados obtenidos en esta investigación demostraron una ligera reducción del 23% de las bacterias con respecto al control. Esta condición se explica por los mecanismos de exclusión competitiva en las comunidades bacterianas presentes en el género *Bacillus* (Nayak, 2020; James *et al.*, 2021), según Knipe *et al.* (2021) son dos tipos de mecanismos, siendo la primera la estrategia competitiva por explotación que se caracteriza por un acelerado consumo de nutrientes con el objetivo de restringir el suministro de recursos a los competidores e invirtiendo en su crecimiento. La segunda estrategia competitiva es por interferencia que ocurre cuando la bacteria daña directamente a otro, a través de la producción de compuestos antimicrobianos que podrían ser bacteriostáticos, es decir, inhiben el crecimiento bacteriano, sin embargo cuando el tratamiento es suspendido el grupo bacteriano afectado puede volver a recuperarse (Fernando, 2004), algunas de estas sustancias producidas por los *Bacillus* son: bacitracina, laterosporina, gramicidina (James *et al.*, 2021) coagulina, subtilisina (Soltani *et al.*, 2019) y lipopéptidos (bacilomicina, iturin y fengycin) (Nayak, 2020).

Por lo tanto, se plantea que las cepas de *B. subtilis* y *B. licheniformis* del producto de uso agrícola puede llegar a contar con alguno de estos dos mecanismos para la mitigación de

bacterias patógenas, como es el mecanismo de estrategia competitiva de explotación, ya que según de Oliveira (2021) la reducción de materia orgánica y carbono orgánico oxidable, puede contribuir a inhibir el crecimiento de potenciales microorganismos patógenos como lo muestran los resultados arrojados por su estudio al aplicar diferentes dosis de un biorremediador a base de *Bacillus*, logrando modular el microbioma del suelo aumentando la abundancia relativa en el grupo perteneciente al género *Bacillus* y una disminución en la concentración de la abundancia relativa del género *Vibrio*.

## 8 CONCLUSIONES

Por último, podemos concluir que la aplicación de un conglomerado bacteriano a base de *B. subtilis* y *B. licheniformis* de uso agrícola manifestó una reducción mínima en la materia orgánica que era objeto de estudio de esta investigación, puesto que otras investigaciones presentan unos porcentajes mayores de biodegradación de materia orgánica de hasta el 18,38% mientras que nuestras bacterias solo tienen la capacidad de reducir un máximo de 6,51%.

En cuanto a las concentraciones podemos evidenciar que no hay mayor efecto de degradación orgánica cuando se aumenta la cantidad del producto, no obstante, sigue siendo una estrategia biológica para ayudar a degradar la materia orgánica en el sedimento de piscinas camaroneras.

Considerando los resultados obtenidos con respecto a la reducción de la carga bacteriana de *Vibrios* tampoco se puede observar una disminución significativa, sin embargo, se pudo determinar una disminución práctica de las UFC/g de *Vibrio sp.* dentro del microbioma del suelo, lo que sugiere que las especies del género *Bacillus* proporcionarían un equilibrio en la comunidad microbiana.

De cara a futuros estudios, el presente trabajo proporciona más evidencia sobre los beneficios del uso de bacterias con potencial biorremediador como son los *Bacillus* para acelerar la degradación de la materia orgánica y por ende mejorar el medio ambiente.

## 9 RECOMENDACIONES

- Se recomienda para futuras investigaciones realizar cultivos de *Bacillus* en un medio de cultivo específico para llegar a determinar si las bacterias colonizaron el suelo que se quiere biorremediar.
- Disminuir la cantidad de suelo para las unidades experimentales para homogenizar y distribuir mejor el sedimento en las unidades experimentales.
- Para el medio de activación es recomendable utilizar ECV-18 en vez de melaza para evitar cualquier tipo de contaminante durante la fase de activación.
- Para biorremediar suelos en condiciones de campo se sugiere combinar bacterias especializadas para la degradación de materia orgánica en conjunto con enzimas para obtener los resultados esperados en el menor tiempo posible.
- A pesar de ser un experimento a escala de laboratorio y al utilizar una cepa de *Bacillus* destinada al área agrícola, sería conveniente realizar otros estudios con cepas bacterianas específicas para entornos acuícolas y posteriormente evaluar los efectos producidos en condiciones de campo.

## 10 BIBLIOGRAFÍA

- Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z., & Wassie, M. (2017). The Role of Microorganisms in Bioremediation- A Review. *Opem Journal of Environmental Biology*, 2(1), 38-46. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.17352/ojeb>
- Alfiansah, Y. R., Hassenrück, C., Kunzmann, A., Taslihan, A., Harder, J., & Gärdes, A. (2018). Bacterial Abundance and Community Composition in Pond Water From Shrimp Aquaculture Systems With Different Stocking Densities. *Front. Microbiol*, 9(2457), 1-15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02457>
- Álvarez, S. (2005). La descomposición de materia orgánica en humedales: la importancia del componente microbiano. *Ecosistemas*, 14(2), 17-29. <https://www.redalyc.org/pdf/540/54014204.pdf>
- Artha , O. A., Sudarno, Pramono, H., & Sari, L. A. (2019). Identificación de bacterias productoras de enzimas extracelulares (proteolíticas, celulolíticas y amilolíticas) en el sedimento de estanques extensivos en Tanggullejo, Gresik. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 236, 1-7. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/236/1/012003>
- Atlas, R. M., Bartha, R., & Guerrero, R. (2002). *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. Pearson Educacion, S.A. <https://es.b-ok.lat/book/16882671/3d5c70>
- Barman, D. (2020). Bioremediation of Waste Waters and Application in Aquaculture - A Mini Review. *Research Biotica*, 2(1), 20-25. <https://doi.org/10.54083/ResBio.2.1.2020.20-25>
- Barman, P., Bandyopadhyay, P., Kati, A., Paul, T., Mandal, A. K., Mondal, K. C., & Das Mohapatra, P. K. (2018). Characterization and Strain Improvement of Aerobic Denitrifying EPS Producing Bacterium *Bacillus cereus* PB88 for Shrimp Water Quality Management. *Waste and Biomass Valorization*, 9(8), 1319–1330. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9912-2>

- Barrezueta-Unda, S., Cervantes-Alava, A., Ullauri-Espinoza, M., Barrera, J., & Condoy-Gorotiza, A. (2020). Evaluación del método de ignición para determinar materia orgánica en suelos de la provincia el Oro-Ecuador. *Fave. Sección ciencias agrarias*, *19*(2), 25-36. <https://doi.org/https://doi.org/10.14409/fa.v19i2.9747>
- Bhandar, S., Poudel, D. K., Marahatha, R., Dawadi, S., Khadayat, K., Phuyal, S., Shrestha, S., Gaire, S., Basnet, K., Khadka, U., & Parajuli, N. (2021). Microbial Enzymes Used in Bioremediation. *Journal of Chemistry*, *1*(1), 1-17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2021/8849512>
- Bibi, F., Ullah, I., Alvi, S. A., Bakhsh, S. A., Yasir, M., Al-Ghamdi, A. A., & Azhar, E. I. (2017). Isolation, diversity, and biotechnological potential of rhizo- and endophytic bacteria associated with mangrove plants from Saudi Arabia. *Genetics and Molecular Research*, *16*(2), 1-12. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4238/gmr16029657>
- Boyd, C. (2016). *Descomposición y acumulación de materia orgánica en estanques*. Global Seafood Alliance: <https://www.globalseafood.org/advocate/descomposicion-y-acumulacion-de-materia-organica-en-estanques/>
- Boyd, C. (2017). *Cómo la descomposición de la materia orgánica impacta los estanques acuícolas*. Global Seafood Alliance: <https://www.globalseafood.org/advocate/como-la-descomposicion-de-la-materia-organica-impacta-los-estanques-acuicolas/#:~:text=La%20descomposici%C3%B3n%20de%20la%20materia%20org%C3%A1nica%20causa%20la%20mayor%20da%20de,potencialmente%20t%C3%B3xico%20e>
- Boyd, C. E. (2020). *Descomposición de materia orgánica en sistemas acuícolas*. Global Seafood Alliance: <https://www.globalseafood.org/advocate/descomposicion-de-materia-organica-en-sistemas-acuicolas/>
- Collaguazo, L., & Tenorio, E. M. (2018). *Elaboración de biopreparados a base de Bacillus sp. para controlar Alternaria spp. en el cultivo de Brassica oleracea var. italica*

(Tesis de grado). Quito, Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana.  
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15116/1/UPS-QT05244.pdf>

Crockett, J., Verardo, J., & Ison, J. (2022). Ensayo para Evaluar los efectos de la Bio-  
alimentación con AquaFarmen los suelos de las piscinas camaroneras. *Industria  
Acuícola*, 18(1), 12-14.  
[https://doi.org/https://issuu.com/industriaacuicola/docs/web\\_revista\\_industria\\_18.1\\_](https://doi.org/https://issuu.com/industriaacuicola/docs/web_revista_industria_18.1_)

Dat, H. H., Tam, V. T., Dung, T. T., Bui, L. M., Anh, H. L., & Oanh, P. T. (2019). Isolation  
and screening of cellulose and organic matter degrading bacteria from aquaculture  
ponds for improving water quality in aquaculture. *IOP Conference Series: Earth and  
Environmental Science*, 266(12002), 1-10. [https://doi.org/10.1088/1755-  
1315/266/1/012002](https://doi.org/10.1088/1755-1315/266/1/012002)

De Oliveira, H. M. (2021). *Redução de matéria orgânica com aplicação de Bacillus subtilis  
e B. licheniformis em sedimentos provenientes de viveiro de policultivo de  
Litopenaeus vannamei com Oreochromis niloticus (Tesis de posgrado)*.  
Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias.  
<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/230891>

De Schryver, P., & Vadstein, O. (2014). Ecological theory as a foundation to control  
pathogenic invasion in aquaculture. *The ISME Journal*, 8(1), 2360–2368.  
<https://doi.org/10.1038/ismej.2014.84>

El-Saadony, M. T., Alagawany, M., Patra, A. K., Kar, I., Tiwari, R., Dawood, M. O., Dhama,  
K., & Abdel-Latif, H. M. (2021). The functionality of probiotics in aquaculture: An  
overview. *Fish & Shellfish Immunology*, 117, 36-52.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.07.007>

Fernando, J. J. (2004). Acción de los antibióticos. Perspectiva de la medicación  
antimicrobiana. *OFFARM*, 23(3), 116-124.

<https://doi.org/https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-accion-antibioticos-perspectiva-medicacion-antimicrobiana-13059414>

Gabino, E. (2017). *Revisión acerca de la utilización de microorganismos en el mejoramiento en granjas camaroneras (Examen complejo)*. Machala, Ecuador: UTMACH, Facultad De ciencias Agropecuarias. [http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/10512/1/DE00002\\_EXAMENC OMPLEXIVO.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/10512/1/DE00002_EXAMENC OMPLEXIVO.pdf)

Gallardo, E. R. (2015). *Estandarización de la producción de biopesticidas a base de Bacillus subtilis para el control de monoliasis (Tesis de grado)*. Quito, Ecuador: UDLA, Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias. <https://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/4650/1/UDLA-EC-TIAG-2015-18.pdf>

González, J., Prado, P., & Quiñonez Aragón, D. (2003). Bacteriología en Sedimentos, Agua y Organismos. In C. E. (CESASIN), *Técnicas de Bacteriología, Análisis en Fresco, Calidad Análisis en Fresco, Calidad de Agua y Buenas Prácticas de Manejo y Bioseguridad de Manejo en Granjas Camaroneras en Granjas Camaroneras* (pp. 03-33). CESASIN.

Hanh, D. N., Rajbhandari, B. K., & Annachhatre, A. P. (2005). Bioremediation of Sediments from Intensive Aquaculture Shrimp Farms by Using Calcium Peroxide As Slow Oxygen Release Agent. *Environmental Technology*, 26(5), 581-590. <https://doi.org/10.1080/09593332608618543>

Hlordzi, V., Kuebutornye, F. K., Afriyie, G., Abarike, E. D., Lu, Y., Chi, S., & Anokyewaa, M. A. (2020). The use of *Bacillus* species in maintenance of water quality in aquaculture: A review. *Aquaculture Reports*, 18(100503), 1-12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100503>

- Huerta, F. (2018). *Enmiendas bacterianas en estanques de engorde de camarón*. Global Seafood Alliance: <https://www.globalseafood.org/advocate/enmiendas-bacterianas-en-estanques-de-engorde-de-camaron/>
- James, G., Das, B. C., José, S., & Rejish Kumar, V. J. (2021). *Bacillus* as an aquaculture friendly microbe. *Aquaculture International*, 29(1), 323–353. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10499-020-00630-0>
- Jasmin, M. Y., Syukri, F., Kamarudin, M. S., & Karim, M. (2020). Potential of bioremediation in treating aquaculture sludge: Review article. *Aquaculture*, 519(1), 1-5. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734905>
- Jiménez-Delgadillo, R., Valdés-Rodríguez, S. E., Olalde-Portugal, V., Abraham-Juárez, R., & García-Hernández, J. L. (2018). Effect of pH and temperature on the growth and antagonistic activity of *Bacillus subtilis* on *Rhizoctonia solani*. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(2), 256-275. <https://doi.org/https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1711-3>
- Knipe, H., Temperton, B., Lange, A., Bass, D., & Tyler, C. R. (2021). Probiotics and competitive exclusion of pathogens in shrimp aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 324-352. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/raq.12477>
- Kuebutornye, F. K., Abarike, E. D., & Lu, Y. (2019). A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, 87, 820-828. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.010>
- Lopes, G. R. (2021). *Estratégias de biorremediação de sedimentos em viveiros de piscicultura com bactérias do gênero Bacillus: estudo em escala laboratorial (Tesis de posgrado)*. Florianópolis, Brazil: Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/226810/PAQI0611-T.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>

- Lopes, G. R., Mendes de Oliveira, H., Alves de Jesus, G. F., Laterça Martins, M., Araújo de Miranda Gomes, C. H., Soligo, T., & Pedreira Mourinho, J. L. (2020). Estrategia biológica para mejorar la descomposición de materia orgánica en estanque de tilapia. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 32(27), 1-5. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S2179-975X8419>
- Lopes, G. R., Soligo, T., Yamashita, E., Laterça Martins, M., Loss, A., & Pedreira Mourinho, J. L. (2021). *La biorremediación y sus beneficios a la producción acuícola y a los ambientes de cultivo*. Panorama Acuícola Magazine: <https://panoramaacuicola.com/2021/09/12/la-biorremediacion-y-sus-beneficios-a-la-produccion-acuicola-y-a-los-ambientes-de-cultivo/>
- Martínez, L. R., Martínez, M., López, J. A., & Enríquez, L. F. (2014). Uso de Microorganismos en el Cultivo de Crustáceos. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 16(3), 50-55. <https://doi.org/https://doi.org/10.18633/bt.v16i3.141>
- Mishra, M., Singh, S. K., & Kumar, A. (2021). Environmental factors affecting the bioremediation potential of microbes. In A. Kumar, V. Kumar Singh, P. Singh, & V. Kumar Mishra, *Microbe Mediated Remediation of Environmental Contaminants* (pp. 47-58). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821199-1.00005-5>
- Morse, S. A., & Meitzner, T. A. (2016). Fundamentos de microbiología. En K. C. Carroll, J. A. Hobden, S. Miller, S. A. Morse, T. A. Mietzne, B. Detrick, T. G. Mitchell, J. H. McKerrow, & J. A. Sakanari, *Microbiología médica* (págs. 1-125). McGraw-Hill Education.
- Muras, A., Romero, M., Mayer, C., & Otero, A. (2021). Biotechnological applications of *Bacillus licheniformis*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(4), 609-627. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1873239>

- Navarrete, J., Noles, P., Delgado, C., Hernández de Guerrero, N., & Guerrero, R. (2022). Biorremediación de efluentes del cultivo de camarón por medio de consorcios microbianos autóctonos y microalgas nativas en Manabí, Ecuador. *AquaTechnica*, 4(1), 53-65. <https://doi.org/https://doi.org/10.33936/at.v4i1.4635>
- Navarro, A. F., Cegarra, J., Roig, A., & Garcia, D. (1993). Relationships between organic matter and carbon contents of organic wastes. *Bioresource Technology*, 44(3), 203-207. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0960-8524\(93\)90153-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0960-8524(93)90153-3)
- Nayak, S. K. (2020). Multifaceted applications of probiotic *Bacillus* species in aquaculture with special reference to *Bacillus subtilis*. *Review in Aquaculture*, 13(2), 862-906. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/raq.12503>
- Olmos, J., Acosta, M., Mendoza, G., & Pitones, V. (2020). *Bacillus subtilis*, an ideal probiotic bacterium to shrimp and fish aquaculture that increase feed digestibility, prevent microbial diseases, and avoid water pollution. *Archives of Microbiology*, 202(1), 427–435. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00203-019-01757-2>
- Pal, A. K., Singh, J., Soni, R., Tripathi, P., Kamle, M., Tripathi, V., & Kumar, P. (2020). The role of microorganism in bioremediation for sustainable environment management. *Bioremediation of Pollutants*, 227-249. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819025-8.00010-7>
- Pérez-Chabela, M. L., Alvarez-Cisneros, Y. M., Soriano-Santos, J., & Pérez-Hernández, M. A. (2020). Los probióticos y sus metabolitos en la acuicultura. Una Revisión. *Hidrobiológica*, 30(1), 93-105. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2020v30n1/>
- Pucci, O. H. (2019). Cultivo de Bacterias. En O. H. Pucci, *Microbiología General* (págs. 1-18). Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. <http://www.fcن.unp.edu.ar/sitio/microgeneral/wp-content/uploads/2017/02/04-CULTIVO-DE-BACTERIAS.pdf>

- Ron, E., Tamayo, M. J., Plua del Valle, F., & Vera, K. (2020). Técnicas eficientes para el monitoreo y evaluación de biorremediación. *Panorama Acuicola Magazine*, 25(3), 88-91. [https://issuu.com/designpublications/docs/panorama\\_acuicola\\_25-3\\_marzo\\_abril\\_2020\\_digital](https://issuu.com/designpublications/docs/panorama_acuicola_25-3_marzo_abril_2020_digital)
- Rosabal, D., Sola, M., & Pons, S. V. (2022). Efecto del pH en el crecimiento de *Bacillus sp.* en un medio con melaza de caña (Original). *Redel. Revista Granmense De Desarrollo Local*, 6(1), 252-261. <https://revistas.udg.co.cu/index.php/redel/article/view/2852>
- Rosamma, P., & Swapna, A. (2006). Bioremediation in Shrimp Culture Systems. *NAGA, WorldFish Center Quarterly*, 29(3 & 4), 62-66. [https://www.researchgate.net/publication/48410828\\_Bioremediation\\_in\\_Shrimp\\_Culture\\_Systems](https://www.researchgate.net/publication/48410828_Bioremediation_in_Shrimp_Culture_Systems)
- Sandoval, M., Dorner, J., Seguel, O., Cuevas, J., & Rivera S, D. (2012). *Métodos de análisis físicos del suelo*. Chillán, Chile: Departamento de Suelos y Recursos Naturales. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/59208>
- Sangwan, S., & Dukare, A. (2018). Microbe-Mediated Bioremediation: An Eco-friendly Sustainable Approach for Environmental Clean-Up. In T. Adhya, B. Lal, B. Mohapatra, D. Paul, & S. Das, *Advances in Soil Microbiology: Recent Trends and Future Prospects. Microorganisms for Sustainability*, (pp. 145–163). Singapore: Springer.
- Shivalkar, S., Singh, V., Sahoo, A. K., Samanta, S. K., & Gautam, P. K. (2021). Bioremediation: a potential ecological tool for waste management. In V. Kumar, G. Saxena, & M. P. Shah, *Bioremediation for Environmental Sustainability* (pp. 1-21). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820318-7.00001-0>
- Shyam, M., Balakrishna, C., Yeshdas, B., Ravinder, B., Bhanu, P. C., Suresh, K., & Rajender, B. (2021). A review on resilience of microbes in aquatic environment. *Journal of*

*Entomology and Zoology Studies*, 9(2), 1403-1410.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.22271/j.ento.2021.v9.i2q.8659>

Soltani, M., Ghosh, K., Hoseinifar, S. H., Kumar, V., Lymbery, A. J., Roy, S., & Ringø, E. (2019). Genus *Bacillus*, promising probiotics in aquaculture: Aquatic animal origin, bio-active components, bioremediation and efficacy in fish and shellfish. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 27(3), 331-379.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1597010>

Stefanescu, I. A. (2015). Bioaccumulation of heavy metals by *Bacillus megaterium* from phosphogypsum waste. *Scientific Study & Research*, 16(1), 93 – 97.  
<https://www.proquest.com/openview/6e264d51ca49abb5025f8b8ad117bc00/1?pq-origsite=gscholar&cbl=716381>

Torres, W., Tinoco, O., Huamantínco, A., Mialhe, E., & Conde, L. (2018). Biorremediación del agua recirculante en cultivo de camarón blanco utilizando microbiota autóctona del mangle rojo. *Revista Del Instituto De investigación De La Facultad De Minas, Metalurgia Y Ciencias geográficas*, 21(42), 55–62.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.15381/iigeo.v21i42.15787>

Tuan, T. N., Pham, D., & Hatai, K. (2013). Overview of the use of probiotics in aquaculture. *International Journal of Research in Fisheries and Aquaculture*, 3(3), 89-97.

Vadstein, O., Attramadal, K. J., Bakke, I., & Olsen, Y. (2018). K-Selection as Microbial Community Management Strategy: A Method for Improved Viability of Larvae in Aquaculture. *Front. Microbiol*, 9(2730), 1-17.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02730>

Vinothkumar, R., Jaffer, Y. D., Bharti, V. S., Singh, A., Vennila, A., Bhat, I. A., & Pandey, P. K. (2021). Heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacteria: Characterization and comparison of shrimp pond and effluent discharge channel in

aspects of composition and function. *Aquaculture*, 539, 1-14.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736659>

Wang, Y., Zha, L., & Xu, Z. (2006). Effects of probiotics on *Penaeus vannamei* pond sediments. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 17(9), 1765-1767.  
<https://doi.org/http://www.cjae.net/EN/Y2006/V17/I09/1765>

Widiyanto, T., Rusmana, I., Febrianti, D., Shohihah, H., Triana, A., & Mardiati, Y. (2019). Profiles of *Vibrio* and heterotrophic bacteria in the intensive Vanamae shrimp culture using bioremediation technique in Karawang. *International Conference on Tropical Limnology*, 535(012019), 1-11. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/535/1/012019>

## 11 ANEXOS

**Anexo A** Homogenización de las muestras de suelo



**Anexo B** Secado de las muestras de suelo a 60 °C por 48 horas



**Anexo C** Tamizado de muestras de suelo luego ser secada



**Anexo D** Pesaje de muestra de suelo



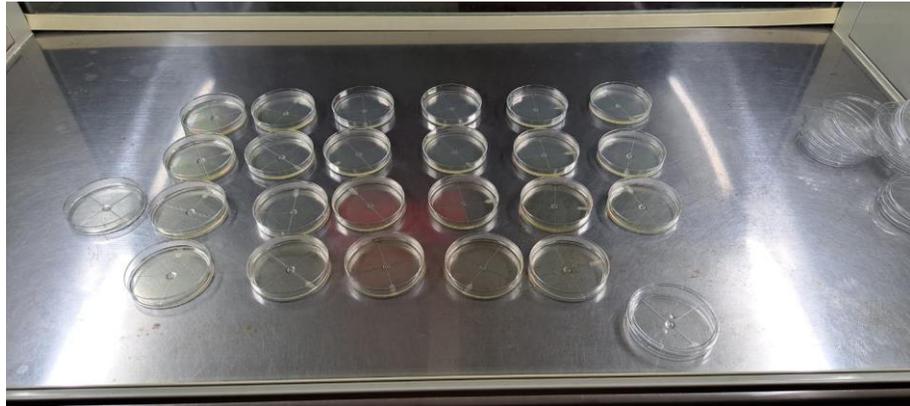
**Anexo E** Fase de digestión del suelo mediante ácido sulfúrico y dicromato de potasio



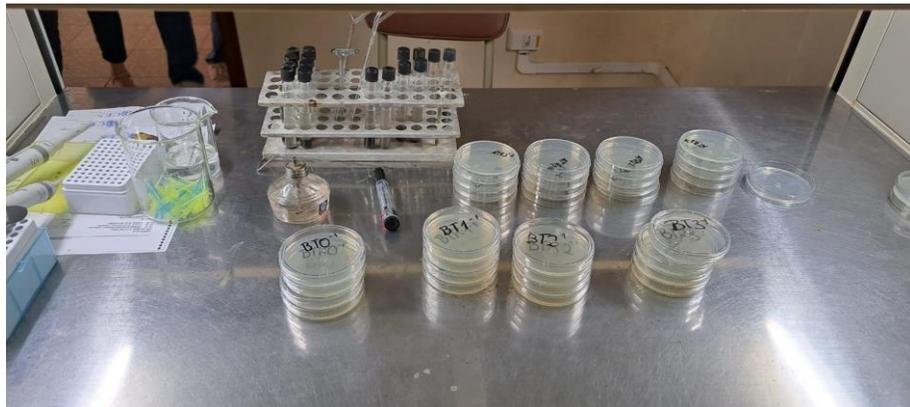
**Anexo F** Fase de titulación mediante solución de sulfato ferroso amoniacal



**Anexo G** Plaqueo de medio de cultivo



**Anexo H** Siembra microbiológica de muestras de suelo



**Anexo I** Siembra microbiológica del conglomerado bacteriano (BIO.BS.BL)



**Anexo J** Placas con colonias de *Vibrios* de las muestras de suelo



**Anexo K** Placas con colonias de *Bacillus* del BIO.BS.BL



**Tabla 10** Estadísticos descriptivos del contenido de MO, CO y COO en el sedimento tratado con diferentes dosis del conglomerado bacteriano

		n	$\bar{X}$	S	$ES_x$	95% del IC para la media		Mín	Máx
						Límite inferior	Límite superior		
Materia orgánica	Testigo	12	49,3400	1,41008	,40706	48,4441	50,2359	47,12	51,82
	1,5 L ha <sup>-1</sup>	12	47,2492	,93709	,27051	46,6538	47,8446	45,55	48,69
	3 L ha <sup>-1</sup>	12	46,1350	1,21200	,34987	45,3649	46,9051	43,98	47,90
	4,5 L ha <sup>-1</sup>	12	46,2675	1,55092	,44771	45,2821	47,2529	43,98	48,69
	Total	48	47,2479	1,80465	,26048	46,7239	47,7719	43,98	51,82
Carbono orgánico	Testigo	12	25,1333	,72027	,20792	24,6757	25,5910	24,00	26,40
	1,5 L ha <sup>-1</sup>	12	24,0667	,47737	,13780	23,7634	24,3700	23,20	24,80
	3 L ha <sup>-1</sup>	12	23,5000	,61791	,17838	23,1074	23,8926	22,40	24,40
	4,5 L ha <sup>-1</sup>	12	23,5667	,79009	,22808	23,0647	24,0687	22,40	24,80
	Total	48	24,0667	,92007	,13280	23,7995	24,3338	22,40	26,40
Carbono orgánico oxidable	Testigo	12	21,0633	,72027	,20792	20,6057	21,5210	19,93	22,33
	1,5 L ha <sup>-1</sup>	12	19,9967	,47737	,13780	19,6934	20,3000	19,13	20,73
	3 L ha <sup>-1</sup>	12	19,4300	,61791	,17838	19,0374	19,8226	18,33	20,33
	4,5 L ha <sup>-1</sup>	12	19,4967	,79009	,22808	18,9947	19,9987	18,33	20,73
	Total	48	19,9967	,92007	,13280	19,7295	20,2638	18,33	22,33

**Nota:** n=número de observaciones realizadas.  $\bar{X}$ =Media aritmética. S=Desviación típica o estándar.

$ES_x$ =Error típico o estándar de la media. IC=Intervalo de confianza. Máx=Máximo. Mín=Mínimo.

### 11.1 Método de Walkley & Black

El método Walkley & Black mediante la metodología el protocolo llevado a cabo por Barrezueta *et al.* (2020):

1. Pesar 1 g de muestra de suelo seco tamizado a 300  $\mu\text{m}$ .
2. Ubicar la muestra pesada en un balón aforado de 100 ml.
3. Medir exactamente con una pipeta 10 ml de dicromato de potasio 1 N y agregarlo sobre la muestra.
4. Medir en un vaso graduado 10 ml de ácido sulfúrico concentrado y agregarlo cuidadosamente sobre la muestra, a través de las paredes del balón.
5. Agitar el balón y dejar en digestión durante 15 minutos o hasta el día siguiente.
6. Aforar el balón con agua destilada y dejar enfriar. Reestablecer exactamente el nivel del aforo cuando se haya enfriado la solución.
7. Extraer 20 ml de solución y colocarlo en un Erlenmeyer de 250 ml
8. Agregar en el Erlenmeyer 3 ml de ácido fosfórico al 85% y seis gotas de difenilamina ((C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>NH)
9. Titular con sulfato ferroso amoniacal 0,2 N hasta viraje a color verde claro.
10. Calcular el porcentaje (%) de CO mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ CO} = (\text{ml dicromato} - \text{ml sulfato}) \times 0.4$$