



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA ACUÍCOLA

EVALUACIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS DE ORIGEN COMERCIAL  
EN DOS AMBIENTES, MARINOS Y DULCEACUÍCOLAS, PARA SU USO  
EN ACUICULTURA

ARIAS FERNANDEZ NESTOR XAVIER  
INGENIERO ACUÍCULTOR

MACHALA  
2023



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA ACUÍCOLA

**Evaluación de bacterias probióticas de origen comercial en dos ambientes, marinos y dulceacuícolas, para su uso en acuicultura**

**ARIAS FERNANDEZ NESTOR XAVIER  
INGENIERO ACUÍCULTOR**

**MACHALA  
2023**



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA ACUÍCOLA

TRABAJO TITULACIÓN  
TRABAJO EXPERIMENTAL

Evaluación de bacterias probióticas de origen comercial en dos ambientes, marinos y dulceacuícolas, para su uso en acuicultura

ARIAS FERNANDEZ NESTOR XAVIER  
INGENIERO ACUÍCULTOR

SORROZA OCHOA LITA SCARLETT

MACHALA, 18 DE OCTUBRE DE 2023

MACHALA  
2023

# Evaluación de bacterias probióticas de origen comercial en ambientes marinos y dulce acuícolas

## INFORME DE ORIGINALIDAD

9%

INDICE DE SIMILITUD

9%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

3%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Técnica de Machala Trabajo del estudiante	2%
2	<a href="http://www.researchgate.net">www.researchgate.net</a> Fuente de Internet	1%
3	<a href="http://www.globalseafood.org">www.globalseafood.org</a> Fuente de Internet	1%
4	<a href="http://www.scielo.org.mx">www.scielo.org.mx</a> Fuente de Internet	<1%
5	<a href="http://www.coursehero.com">www.coursehero.com</a> Fuente de Internet	<1%
6	<a href="http://www.scielo.org.co">www.scielo.org.co</a> Fuente de Internet	<1%
7	<a href="http://es.scribd.com">es.scribd.com</a> Fuente de Internet	<1%
8	Submitted to Universidad Loyola Andalucia Trabajo del estudiante	<1%
9	<a href="http://repositorio.utp.edu.co">repositorio.utp.edu.co</a> Fuente de Internet	

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

El que suscribe, ARIAS FERNANDEZ NESTOR XAVIER, en calidad de autor del siguiente trabajo escrito titulado Evaluación de bacterias probióticas de origen comercial en dos ambientes, marinos y dulceacuícolas, para su uso en acuicultura, 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.

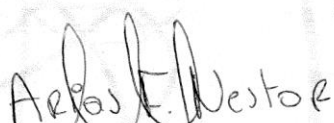
El autor declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

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.

Machala, 18 de octubre de 2023

  
ARIAS FERNANDEZ NESTOR XAVIER  
0704851120

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a mis padres, Nestor Ivan Arias Patiño y Sandra Karolina Fernández Pazmiño, 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 Ivanna y Mathias, así como a mi esposa María Fernanda Ruiz y mi hija Ivanna Fernanda que siempre han estado presentes para darme su apoyo incondicional, dándome la fuerza suficiente para poder seguir adelante 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 a hacer tan grande como te lo propongas y llegar tan lejos como uno lo decida.

A los grandes amigos que me dio la carrera y que de alguna u otra manera contribuyeron en la elaboración de este trabajo y mi superación como estudiante como lo son Miguel Ronquillo, Fabian Barzallo y Karoly Albarracín, 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, a la Dra. Leonor Rivera 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 y al Ing. Carlos Pezo, que gracias a su indispensable ayuda se logró realizar el proceso experimental sin ningún inconveniente.

# DEDICATORIA

*Este trabajo va dedicado a  
mis padres, hermanos, esposa e hija.*

*Lo que fui, lo que soy y lo  
que seré ha sido gracias a ustedes,  
pero sobre todo a mi hija Ivanna, sé que te  
serviré de ejemplo para que seas una persona de bien y  
lo que espero que estas pocas palabras  
contengan el espíritu de su intención.*

*Nestor Xavier Arias Fernández*

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS .....	1
DEDICATORIA .....	2
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	3
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES .....	5
ÍNDICE DE TABLAS .....	6
RESUMEN .....	8
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUCCIÓN .....	12
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
3. JUSTIFICACIÓN .....	15
4. OBJETIVOS.....	16
Objetivo general.....	16
Objetivos específicos.....	16
Hipótesis.....	16
5. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	17
Acuicultura .....	17
Sistemas de cultivo marinos y de agua dulce .....	17
Materia orgánica .....	18
Materia orgánica lábil y refractaria .....	18
Sedimento .....	18
Rol de los microorganismos. ....	19
Rol de las bacterias.....	19
Biorremediación.....	21
Bacillus como microbio favorable a la acuicultura .....	22
Biorremediación microbiana y sus factores que la afectan .....	23
Aplicación de biorremediación en acuicultura .....	24
Biorremediación de detritus orgánicos .....	24
Biorremediación de compuestos nitrogenados.....	24
Disponibilidad de nutrientes .....	25
Temperatura y pH .....	III
Concentración de oxígeno.....	26
Mecanismos de biotransformación de compuestos tóxicos .....	26



6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
Ubicación del experimento .....	28
Materiales y reactivos .....	28
Materiales .....	28
Equipos.....	28
Diseño experimental. - .....	29
Modelo matemático (diseño completamente al azar).....	29
Modelo estadístico lineal para un diseño completamente al azar: .....	29
Caracterización de los tratamientos .....	30
Variables a medir.....	30
Concentración de Materia Orgánica y Carbono Orgánico Oxidable (g kg <sup>-1</sup> ): .....	30
Manejo del ensayo .....	30
Toma de muestras de suelo en campo.....	30
Preparación de las unidades experimentales .....	30
Aplicación de los tratamientos y monitoreo del experimento .....	31
Metodología para medición de las variables y la recolección de datos.....	31
Métodos de análisis de suelo en laboratorio.....	31
Secado y tamizado de suelo .....	31
Método de Ignición .....	31
7. RESULTADOS .....	32
8. DISCUSIÓN.....	36
9. CONCLUSIONES .....	39
10. RECOMENDACIONES .....	40
11. Bibliografía .....	41
12. ANEXOS .....	44

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1: Ubicación del laboratorio de Maricultura en la Facultad de Ciencias Agropecuarias .....	28
Ilustración 2: Comparación de porcentaje de materia orgánica entre tratamientos .....	34

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Tratamientos .....	29
Tabla 2 Porcentajes de materia orgánica en ambiente marino y de agua dulce con la aplicación de bacterias probióticas. ....	32
Tabla 3: Prueba de Shapiro Wilk .....	33
Tabla 4: Prueba de Kruskal Wallis .....	34
Tabla 5: Comparación entre tratamientos .....	35

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Secado de muestras .....	44
Anexo 2: Aplicación del probiótico .....	44
Anexo3: Instalación del proyecto .....	44
Anexo 4: Materiales para el tamizado de muestras .....	44
Anexo 5: Control del volumen del agua .....	44
Anexo 6: Muestras secas y tamizadas .....	45

## RESUMEN

En Ecuador el cultivo de camarón vive a diario sinnúmero de retos entre ellos tratar de cumplir con el requerimiento de este producto a nivel internacional, por ende la industria se ve obligada a intensificar las granjas de cultivo, lo que conlleva a una gran acumulación de materia orgánica en los fondos de dichas unidades de cultivo, como ya se conoce la intensificación lleva de la mano otros problemas como la inmunodepresión de los organismos de cultivo, producto del hacinamiento, esto es un gran problema ya que los organismos con defensas bajas son más propensos a las enfermedades, por tal motivo la población de un estanque se verá afectado. Existen diversas soluciones al problema de la acumulación de materia orgánica, una de ellas puede ser la remoción mecánica de los sedimentos acumulados en los fondos del estanque, otra manera rápida es la remoción de dichas sustancias por medio de los denominados recambios de agua de fondo o con burro que básicamente se centran en remover el agua y la materia orgánica ubicada en el fondo del estanque, pero como ya se conoce estas dos opciones anteriormente mencionadas implican un costo elevadísimo para la granja que incluso muchas veces son opciones que están a libre disposición solo de empresas grandes poseedoras de altos capitales, pero existe una opción más restable que demanda de poca inversión la cual se la conoce como biorremediación, esta herramienta biotecnológica es una excelente alternativa ampliamente conocida por su eficacia a mediano y largo plazo que básicamente consiste en aplicar un coctel de bacterias que se encargan de reducir compuestos orgánicos por medio de la producción de enzimas y otras sustancias reductoras de M.O. para que de esta manera sea un proceso biológico de descomposición controlado que no genera alteraciones del medio ambiente.

Por tal motivo, este trabajo trata de evaluar la eficacia de un producto comercial conformado por un coctel de bacterias Gram positivas del género *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis*, que están direccionados principalmente en reducir materia orgánica presente en los fondos y la columna de agua destinados para la acuicultura, el experimento consistió en la utilización de doce unidades experimentales con capacidad de 15 lts cada una, estas fueron utilizadas para evaluar la eficacia del producto en mención sobre sedimentos de origen acuícola salinos ricos en M.O. La aplicación del producto se la realizo para comparar dos ambientes distintos, ~~vamp~~ marino y otro con agua dulce. Para este ensayo se aplicó 5 gr por cada unidad experimental y se comparó con un suelo al que no se colocó bacteria que fue el control de cada ambiente respectivamente, para

determinar la M.O. presente en el sedimento se utilizó el método de ignición y el ensayo duró 21 días. Como resultados hay que resaltar que existe una notable diferencia entre tratamientos con respecto al control, ya que se puede observar un cambio de coloración y eliminación de olores en el suelo del ambiente marino en comparación con el control y el ambiente con agua dulce. Finalmente, se puede concluir que la aplicación de bacterias de origen comercial para realizar los procesos de biorremediación de los suelos son de vital importancia ya que con este proyecto se logró comprobar la eficacia de dichos macroorganismos en ambientes marinos, resaltando que probablemente esto se debe a que son bacterias de origen marino.

**Palabras clave:** Materia orgánica, Ignición, Biorremediación, Patógenos, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*.

## ABSTRACT

In Ecuador, shrimp farming experiences countless challenges on a daily basis, including trying to meet the international requirement for this product, therefore the industry is forced to intensify farming farms, which leads to a large accumulation of material. organic growth in the bottoms of said farming units, as it is already known, intensification goes hand in hand with other problems such as immunosuppression of cultured organisms, due to overcrowding, this is a big problem since organisms with low defenses are more prone to to diseases, for this reason the population of a pond will be affected. There are several solutions to the problem of the accumulation of organic matter, one of them can be the mechanical removal of the sediments accumulated in the bottom of the pond, another quick way is the removal of said substances through the so-called bottom water exchanges or with a donkey that basically focuses on removing the water and organic matter located at the bottom of the pond, but as is already known, these two previously mentioned options imply a very high cost for the farm, which are often even options that are freely available only of large companies with high capital, but there is a more stable option that requires little investment, which is known as bioremediation. This biotechnological tool is an excellent alternative, widely known for its effectiveness in the medium and long term, which basically consists of applying a cocktail of bacteria that are responsible for reducing organic compounds through the production of enzymes and other substances that reduce O.M. so that in this way it is a controlled biological decomposition process that does not generate environmental alterations.

For this reason, this work tries to evaluate the efficacy of a commercial product, made up of a cocktail of Gram-positive bacteria of the genus *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*, which are mainly aimed at reducing organic matter present in the bottoms and the column. of water intended for aquaculture, the experiment consisted of the use of twelve experimental units with a capacity of 15 liters each, these were used to evaluate the efficacy of the mentioned product on sediments of aquaculture origin rich in OM. The application of the product was carried out to compare two different environments, one marine and the other with fresh water. For this test, 5 gr was applied for each experimental unit and it was compared with a soil to which no bacteria was placed, which was the control of each environment respectively, to determine the O.M. present in the sediment,

the ignition method was used and the test lasted 21 days. As results, it should be noted that there is a notable difference between treatments with respect to the control, since a change in color and elimination of odors can be observed in the soil of the marine environment compared to the control and the freshwater environment. Finally, it can be concluded that the application of bacteria of commercial origin to carry out soil bioremediation processes are of vital importance since with this project it was possible to verify the effectiveness of said macroorganisms in marine environments, highlighting that this is probably due to which are bacteria of marine origin.

**Keywords:** Organic matter, Ignition, Bioremediation, Pathogens, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*.



# 1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura a nivel mundial es una de las industrias alimentarias con mayor éxito registrado según la FAO debido a que el mencionado gremio produce mayor cantidad de alimento que los demás empresas desarrolladas en los ecosistemas terrestres registrando así 53.4 millones de toneladas de peces con un ligero aumento del 5.2% anual en su producción, 17.4 millones de toneladas de moluscos con un 3.46% de crecimiento anual en su producción y 8.4 millones de toneladas de crustáceos en el año 2021, este último con un 9.92% de aumento anual en su producción, convirtiéndose así nuevamente la industria acuícola como una de las industrias con mayor crecimiento anual , lo que demuestra lo rentable y amigable con el ecosistema que esto se vuelve, por otro punto el gran nivel de aceptación que poseen estos productos acuáticos (Pulgarin & Mora, 2022).

En cuanto al Ecuador respecta el aumento de producción de camarón es notorio ya que la demanda mundial continua en crecimiento, por tal motivo es de vital importancia comprender todos los beneficios y perjuicios que genera la excesiva producción a la que están sometidos los ecosistemas, ya que se están sobrecargando los sistemas de cultivo convencionales en busca de saciar la necesidad de exportación que vive actualmente el gremio camaronero en todo el territorio nacional (Azuelo, Montealegre, Campoverde, & Unda, 2021).

Los sedimentos generados por esta intensificación en cuanto a las producciones son realmente un problema ya que estos lodos o residuos están conformados por fosforo, compuestos nitrogenados y carbono orgánico disuelto, como bien se sabe este ultimo aporte mencionado tiene origen de los bentos, zooplancton y fitoplancton, fertilizantes orgánicos, exoesqueletos y alimento no consumido dentro del estanque. Estas cargas orgánicas afectan negativamente el equilibrio del ecosistema ya que cuando el aporte de estos supera la capacidad natural que tiene el ecosistema de reciclaje de nutrientes y esto se convierte en un problema para el cultivo (Drozdz, y otros, 2020).

La acumulación de estos desechos en el fondo de los estanques generan diversos problemas que afectan al cultivo, ya que reducen el área por la cual puedan desarrollarse los camarones, esto es generado directamente por las zonas anóxicas en el estanque, acumulación de compuestos nitrogenados tóxicos y a su vez reduciendo el OD disponible dentro del estanque ya que esta acumulación de desechos eleva la DQO en su batalla de

lograr un ecosistema equilibrado y prolífico para los animales del cultivo (Xu, y otros, 2022).

Según (Jasmin, Syukri, Kamarudin, & Karim, 2020) la solución a este problema mencionado anteriormente es la utilización de microorganismos con capacidad biorremediadora para la reducción de dichas sustancias, estos podrían ser bacterias, enzimas, etc. Según sea la necesidad del caso ya que de esta manera podríamos lograr que el cultivo a mediano y corto plazo sea más eficiente y exitoso.

En cuanto a biorremediación en cultivos de *L. vannamei* se trate según (Kamilya & Devi, 2022) se tiene diversas opciones para realizar este proceso pero destacan una en específico que es la por medio de bacterias probióticas más específicamente con bacterias del género *Bacillus* ya que estas tienen la capacidad de degradar los sedimentos en mal estado en los estanques acuícolas, estas bacterias tienen la capacidad de acelerar la descomposición de las MO en el estanque, dando como resultado suelos de color consistente, niveles de O<sub>2</sub> aceptables, eliminación de olores fétidos provenientes de los fondos, sostenimiento de los ciclos de N llevados a cabo en los estanques acuícolas.

Cabe recalcar que teniendo en cuenta todos los beneficios ya conocidos de las bacterias para dicho proceso, es de suma importancia probar la eficacia de dichas sustancias que hay a nivel comercial para conocer cuan eficaces son estas al someterlas a diversas condiciones medioambientales ya que de esta manera se podrán reafirmar la aseveración colectiva de que son ciertamente eficientes y benéficas para los ecosistemas de cultivo, por lo tanto el presente trabajo de investigación, tiene como objetivo, evaluar un producto de origen comercial a base de *Bacillus*, las cuales su forma de actuación es reducción de MO y degradación de compuestos orgánicos en los fondos de los estanques acuícolas.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el país los organismos de cultivo acuícola predominantes son la Tilapia roja (*Oreochromis sp.*) y el Camarón (*L. vannamei*), pero la industria camaronera en el Ecuador en los últimos años ha visto un crecimiento acelerado, lo que ha obligado a los productores en elevar sus densidades de siembra y buscar ser mas eficientes en cuanto al cultivo concierne, ya que este incremento si bien es cierto beneficia económicamente a los productores también afectan negativamente ya que no solo se incrementa las densidades de siembra si no también el nivel de desechos, el volumen de alimentación y aquí resalta un punto importante ya que la mayor fuente de ingreso de N en el estanque es el alimento balanceado y si este no es consumido la contaminación del mismo seria fatal, como resultado a todos estos factores negativos se podrá tener, mortalidades, enfermedades, incremento de los DQO y DBO, disminución de la velocidad de crecimiento, etc.

Cabe resaltar que la MO muchas veces sirve como sustrato para diferentes especies que conformar la cadena trófica, pero esta misma no controlada siempre generara mas inconvenientes que beneficios en los cultivos acuícolas ya que sus niveles de toxicidad suelen ser muy elevados cuando ya la misma a cogido ventaja en el estanque, es importante resaltar que la capacidad microbiológica de los fondos debe superar a la cantidad y velocidad en la que se acumulan los desechos en los estanques, ya que si no es así será imposible conseguir una degradación eficiente de dichos materiales (Mendoza Cedeño, Pincay Cantos, Giler-Molina, & Zambrano Cedeño, 2022).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La biorremediación es el método estratégico para lograr contrarrestar la contaminación la carga excesiva de MO en los estanques de cultivo, este proceso se lo lleva a cabo con bacterias específicas que están en capacidad de realizar esta tarea según (Kamilya & Devi, 2022), el rol de las bacterias es importante ya que sirven como degradadoras de sustancias y compuestos contaminantes en los estanques acuícolas y además como un plus se tiene evidencia que sirven como alimento de organismos superiores. En base a lo que dice (Wang, Shao, Xu, & Chen, 2022) este proceso es realizado gracias a la capacidad de las bacterias de producir sustancias extracelulares y enzimas con la capacidad de consumir o biodegradar los compuestos orgánicos disponibles en el estanque acuícola, de forma que mejoren las condiciones medioambientales en el cultivo, cabe recalcar que esto debe estar acompañado de buenas condiciones físico-químicas para que estas puedan dar un correcto rendimiento en el medio acuático.

Todos los beneficios proporcionados por la biorremediación son de resaltar como la mejora de los procesos de nitrificación y desnitrificación en los cultivos para mantener bajas las cargas de amoníaco y nitrógeno disponible en el estanque, otro ejemplo es la oxidación del sulfuro para mantener al mínimo las cargas de H<sub>2</sub>S, ayudan a reducir la disponibilidad de carbono mineralizando al mismo para transformarlo en CO<sub>2</sub> y de esta manera evitar que el carbono disponible termine formando parte del sedimento en el fondo del estanque, esto colabora en el equilibrio de la microbiota del estanque y maximiza la productividad primaria, por lo tanto así evitamos que se logre contaminar el cultivo, impulsado un ecosistema óptimo para los organismos que se encuentran en el mismo (Martínez-Córdova, Robles-Porchas, Vargas-Albores, Porchas-Cornejo, & Martínez-Porchas, 2022).

Por lo tanto, con esta investigación lo que se espera es conocer la eficiencia del producto comercial, y lograr determinar si a nivel comercial esta bacteria logra conseguir los beneficios que están determinados en diferentes investigaciones científicas que avalan y certifican la eficacia de los cocteles bacterianos comerciales conformados por *B. subtilis* y *B. licheniformis* en la degradación de MO en los fondos de estanques acuícolas.

## 4. OBJETIVOS

### Objetivo general

Analizar la eficacia en la reducción de M.O. en sedimentos provenientes de estanques de cultivo intensivo de camarón *L. vannamei* por medio de la aplicación de bacterias probióticas de origen comercial, para conocer en qué ambiente es más eficiente si en ambientes marinos o de agua dulce.

### Objetivos específicos

- Determinar el porcentaje de reducción de M.O. en ambientes marinos.
- Analizar el porcentaje de reducción de M.O. en ambientes con agua dulce.
- Evaluar en qué ambiente es más eficiente la aplicación de la bacteria de origen comercial para realizar el proceso biorremediador.

### Hipótesis

La utilización de la bacteria probiótica comercial lograra la reducción de MO con mayor eficacia en los sedimentos extraídos de estanques de cultivo de camarón *L. vannamei*, tanto en ambientes marinos como en agua dulce.

## 5. REVISION BIBLIOGRAFICA

### Acuicultura

Según (FAO, 2020), la acuicultura o acuicultura esta dirigida directamente a la producción y engorde de organismos de origen acuático, para suplir las necesidades de las comunidades y de la humanidad, a ejemplo de esto se tienen diversas opciones de cultivo como peces, moluscos, macroalgas y crustáceos, que como bien se sabe son necesarias para la vida y la alimentación de las poblaciones costeras, la actividad acuícola tiene que ir de la mano con la intervención de personas capacitadas, ya que esta actividad básicamente se centra en producción en masa de dichos organismos en mención, por ende son un ecosistema controlado el cual sin la intervención de personas calificadas no tendría el resultado esperado, además de generar un daño y un impacto ambiental negativo, la actividad acuícola tiene dos ecosistemas muy marcados y estos son ecosistemas marinos y ecosistemas con agua dulce.

### Sistemas de cultivo marinos y con agua dulce

Los sistemas de cultivo marino son aquellos sistemas que se encuentran ubicados en zonas de influencia del mar por ende en estas zonas se podrán realizar actividades acuícolas solo con organismos que soporten o regulen la salinidad presente en el agua, de esta manera se podrá llevar a cabo de principio a fin el cultivo durante todas sus fases sin inconvenientes por la presencia de dicha sustancia mencionada, estas zonas suelen ser islas ubicadas en el perfil costanero, áreas continentales con afluencia de esteros marinos y todas las zonas del perfil costanero en las que se puedan realizar estos cultivos sin alterar o generar mayor impacto ambiental en dicha área, en el caso de los sistemas de cultivo de agua dulce se caracterizan básicamente en tener sistemas de cultivo con aguas provenientes mayoritariamente de ríos, o de acuíferos subterráneos de los cuales se obtiene el agua por medio de bombeo, para así llevar a cabo todo el proceso de cultivo estos pueden ser en zonas altas o bajas dependiendo de los organismos que se pretendan cultivar, existen una variada gama de especies comerciales de cultivo dulceacuícola, el organismo a escoger va a depender de las necesidades y de las capacidades de inversión de cada empresario acuícola (Torres, Rosales, & Pérez, 2019).

### Materia orgánica

La materia orgánica en los cultivos acuícolas tiene su origen en las heces, exoesqueletos, alimentos no consumidos, animales muertos, materia vegetal, sustratos transportados por el agua entre otros, cuando esto supera la capacidad natural del medio de poder realizar la correcta degradación de dichas sustancias, el ecosistema se ve afectado dañando la calidad del agua y suelo en los estanques, generando así diversos problemas como zonas anóxicas, deterioro de la calidad de los fondos, disminución del intercambio de nutrientes entre agua y suelo, generando así problemas en los cultivos que se ven reflejados en mortalidad, enfermedades y bajo o nulo desarrollo de los organismos de cultivo (Coronel Rojas & Yupa Cabadiana, 2019).

### Materia orgánica lábil y refractaria

Muchas veces no se llegan a degradar completamente los residuos de materia orgánica, es por esto que las tasas de composiciones de las mismas llegan a variar, en el caso de la materia orgánica lábil esta se degrada en un corto periodo de tiempo ya que su composición se basa en proteínas, almidón, celulosas y glucosa, en el caso de los taninos son conocidos como materia orgánica recalcitrante ya que su descomposición es un proceso un poco más lento.

Siempre la concentración de materia orgánica más elevada va a estar en los primeros 2-5 cm ya que esta es la primera capa de sedimentos asentada en el fondo de los estanques, en la zona aeróbica del suelo ocurre la descomposición de materia orgánica lábil haciendo una notable diferencia con la materia orgánica recalcitrante que esta lleva a cabo su proceso de descomposición mas lento debido a que este proceso se lleva a cabo en el área subyacente del suelo (Mendoza Garcia, 2021).

### Sedimento

Los sedimentos son todos los desechos que se encuentren en el área del estanque acuícola, estos se dividen en dos, solidos en suspensión y solidos sedimentados, los sólidos en suspensión están compuestos básicamente por micropartículas finas que recorren la columna de agua la forma de encargarse de los mismos es con métodos de sedimentación ya que removerlos mecánicamente es imposible, en el caso de los sólidos sedimentados, se habla específicamente de los lodos en el fondo del estanque, estos están compuestos principalmente por fosforo, carbono y nitrógeno ~~esta~~ composición como tal puede causar efectos negativos en los ecosistemas acuícolas ya que son una gran fuente de

contaminación para el estanque cuando la concentración sobrepasa los niveles de tolerancia de dichos elementos (Drozd, Malinska, & Mazurkiewicz, 2020).

Rol de los microorganismos.

Los ecosistemas ecológicamente hablando tienen un actor importante que son los microorganismos, estos son muy numerosos ya sea en ambientes acuáticos o terrestres, hablando de bacterias las podemos encontrar en diferentes versiones estas pueden estar activas en constante reproducción, en esporas, inactivadas, etc., poseen la facilidad de que cualquier sustrato orgánico lo utilicen para lograr un desarrollo, además tienen la capacidad de vivir en los sustratos, agua o incluso llegando a formar parte de la microbiota natural de un organismo, es decir, que logran vivir dentro de otros organismos formando parte de estos generando efectos y resultados favorables cuando estos son microorganismos benéficos (Yukgehnaish, y otros, 2020).

Es de vital importancia resaltar que, el sustrato donde dicha comunidad se aloja también es utilizada para un determinado crecimiento, por lo tanto, la parte que fácilmente se oxida hablando de lo que al sustrato respecta se complica debido a la reducción microbiana, el consorcio microbiano decrecerá por falta de nutrientes, y una vez que este se acabe las comunidades bacterianas se agotaran por completo y empezara una fase descendente en cuanto a su patrón de crecimiento (Jamal , Abdulrahman, Al Harbi, & Chithambaran, 2019).

Rol de las bacterias

Las bacterias en los ecosistemas acuáticos juegan un rol muy importante ya que estas tienen un sinnúmero de funciones, como por ejemplo las *Nitrosomonas* o *Nitrobacter* que se encargan del proceso de la nitrificación, los *Bacillus* y *Lactobacillus* se encargan de biorremediar los suelos y proveerle una microbiota positiva a los organismos de cultivo ya que su aporte se basa en contrarrestar a los microorganismos patógenos disponibles en el medio acuático, como los *Vibrios* que son la especie de bacterias oportunistas más conocidas en el medio acuático (Lu, y otros, 2021).

Las bacterias en dichos ecosistemas se dividen en dos grupos, bacterias Gram positivas y Gram negativas, que en microbiología se las distingue por la coloración después de un proceso de tinción, siendo en el primer caso de color púrpura y las negativas de color rosa, característica que la obtienen por la composición de su membrana celular (James, Das, Jose, & VJ, 2021).



Como se ha resaltado desde un inicio cada grupo bacteriano tiene una función específica en el ecosistema, cada una de ellas tiene la tarea de degradar o descomponer alguna sustancia específica, como es el caso de los *Bacillus* que se encargan de mineralizar y desnaturalizar las proteínas de la materia orgánica, además de transformar el amonio en sustancias menos tóxicas, otro claro ejemplo son las *Cellulomonas* que se encargan de la desnaturalización de la materia vegetal no consumida en el medio acuático, en el caso de los *Paracoccus* estas bacterias se encargan de degradar H<sub>2</sub>S y reducen drásticamente el amonio disponible en el medio acuático, así se da un claro ejemplo de las funciones específicas que poseen cada una de los tipos de bacterias (Olmos, Acosta, Mendoza, & Pitones, 2020).

Las bacterias se dividen en dos grandes eslabones, las bacterias autótrofas y bacterias heterótrofas, esto va a depender de que fuentes de carbono necesiten, en lo que respecta a las bacterias autótrofas estas tienen la capacidad de tomar su energía requerida del nitrógeno y el fósforo en estado soluble, es decir estas bacterias las podemos clasificar como bacterias consumidoras de nitrógeno en ambientes con altas concentraciones de este elemento que usualmente esta alta disponibilidad suele ser debido al aporte directo que tenemos en los estanques proveniente de los alimentos balanceados, en el caso de las bacterias heterótrofas o heterotróficas podemos resaltar que estas bacterias tienen la capacidad de degradar materiales no vivos disponibles en los estanques de cultivo que se acumulan por diversos motivos, de esta manera extraen la energía requerida y como plus tienen la capacidad de proveer electrones en procesos de oxidación de contaminantes estando así aportando al ecosistema y masificando si propio quorum bacteriano, un punto a destacar de este proceso antes mencionado es que bacterias heterótrofas son las que se ven involucradas en los procesos de conversión de compuestos nitrogenados en los ambientes acuáticos, llevando a cabo el proceso de conversión de nitrógeno inorgánico a nitrógeno orgánico, con la leve diferenciación de que entre las bacterias autótrofas y heterótrofas es que estas últimas no aportan mayormente en los procesos de nitrificación y desnitrificación (Anangono Méndez & Lloacana Bonilla, 2022).

Es importante destacar que muchas de las bacterias heterotróficas pertenecen al género de las Gram positivas ya que poseen un gran potencial para biorremediar los ecosistemas acuícolas, ejemplo de esto tenemos *B. subtilis*<sup>XX</sup>, *B. licheniformis*, entre otros, estos microorganismos tienen la capacidad de degradar eficientemente la MO, usualmente esta termina convirtiéndose en CO<sub>2</sub> de esta forma evitamos las excesivas concentraciones de

MO en los fondos de los estanques de cultivo promoviendo las BPA en nuestros cultivos (Kamilya & Devi, 2022)

### Biorremediación

Se puede definir como biorremediación al proceso por el cual se regeneran los ecosistemas por medio de procesos biotecnológicos como la utilización de hongos, enzimas o bacterias para regresar a su forma natural en el medio ambiente, este proceso se lo realiza a mediano y largo plazo ya que es un proceso demorado debido a que se necesita cumplir con los requerimientos específicos de cada organismo utilizado para dicho proceso de biorremediación, existen diversas formas de comprobación para conocer si el proceso de biorremediación se está llevando a cabo de una manera correcta, uno de ellos es realizando una medición del potencial de redox, análisis microbiológico entre otros tanto de agua o suelo, (Jasmin, Syukri, Kamarudin, & Karim , 2020)

Como bien se sabe los microorganismos deben de cumplir un rol específico en lo que respecta a la participación en los diferentes ciclos de nutrientes, estos microorganismos tienen una función ya sea directa o indirecta, en los procesos que serian importantes destacar son los ciclos del carbono, fosforo, nitrógeno, entre otros (Song, Pang, Guo, & Sun, 2020).

Como se ha mencionado con antelación es importante destacar que las bacterias tienen la capacidad de alterar diferentes formas de sustratos y sustancias, estos microorganismos tienen la capacidad de restituir a su estado natural a los ecosistemas acuáticos ayudando así a evitar problemas en los cultivos por contaminación generada por acumulación de nutrientes y fuentes orgánicas provenientes de los cultivos, como se sabe todo se acumula en los primeros 2 a 5 cm de la capa del suelo y aquí en esta zona donde siempre empezaran

los problemas por sobrecarga del medio dañando de esta manera la interacción agua-suelo-cultivo se ve afectada ya que todo esto está completamente interrelacionado. Cabe destacar que para que se logre una correcta biorremediación no es necesario que el conglomerado de bacterias sea autóctono del medio en cuestión, ya que estas dándoles las fuentes requeridas y las condiciones medioambientales óptimas se desarrollaran sin

ningún problema y empezaran a colonizar el medio, dando así resultados favorables desde el inicio de su aplicación (Kamilya & Devi, 2022).

La acuicultura de bagre en Sangkuriang produce desechos en forma de materia orgánica a partir del alimento restante y los desechos metabólicos. Un estudio anterior reveló que la materia orgánica encontrada en la parte de salida del estanque de peces era tres veces mayor que en la entrada. El intento de disminuir la materia orgánica en ese estudio se realizó utilizando almejas de agua dulce y bacterias *Bacillus subtilis*; sin embargo, la disminución fue inferior al 80 % en 5 días. Este estudio pretende obtener el máximo nivel de disminución de materia orgánica con el menor tiempo de degradación. El medio de unión utilizado en este estudio fue fibra de coco sintética. El tratamiento de control se realizó sin los medios de unión (0%). El experimento se llevó a cabo en un laboratorio bajo condiciones anaerobias facultativas. El nivel de la materia orgánica y el total de suspensión bacteriana (TPC) en el agua se observaron cada 12 horas. La materia orgánica se midió con un oxidante KMnO<sub>4</sub>. Los resultados del estudio indicaron que adherir el 100% de la superficie del medio de unión disminuyó la materia orgánica en un 93,7% en 72 horas. El total de bacterias en el medio acuoso en 12 horas fue de 0,5x10<sup>2</sup> CFU/ml, mientras que el total de bacterias en 72 horas fue de 26x10<sup>2</sup> CFU/ml. Se puede concluir que la utilización de medios de unión bacteriana ha acelerado la disminución de materia orgánica en las aguas residuales de la acuicultura de bagre con una cantidad estable de suspensión bacteriana (Arfiati, Dina, Lailiyah, Adialam, & Cokrowati, 2020).

### **Bacillus como microbio favorable a la acuicultura**

Las bacterias del género *Bacillus* cumplen un papel importante en la biorremediación y son considerados los microorganismos de mejor eficiencia en la transformación de materia orgánica a CO<sub>2</sub>. La biología propia de estos agentes microbianos permite usar la materia orgánica como fuente de carbono para su desarrollo y esto ayudará a controlar la carga orgánica de los estanques de acuicultura. Su capacidad para mejorar los suelos se debe a la producción de enzimas, como la amilasa, la lipasa y la celulasa, que ayudan en la

biodegradación de los desechos que se generan en el cultivo (James, Das, Jose, & VJ, 2021).

Las especies de *Bacillus* se utilizan ampliamente en el campo de biorremediación para eliminar desechos orgánicos, metales pesados y otros compuestos contaminantes. *B. subtilis* es una especie candidata importante utilizada en la acuicultura para mantener la calidad del agua y suelo, varios estudios demostraron propiedades biorremediadoras de especies de *Bacillus* como *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. laterosporus*, *B. circulans* en la reducción del nitrógeno de amonio total en suelo (James, Das, Jose, & VJ, 2021).

**Biorremediación microbiana y sus factores que la afectan**

Para que una biorremediación microbiana surta efecto o por lo menos tenga los efectos deseados esto debe tener una interacción positiva entre los dos agentes involucrados que son los microorganismo y el medioambiente, de esta manera si las condiciones ambientales no son favorables no habrá una correcta interacción y el microorganismo no se desarrollara de la manera esperada ya que esto conlleva a una estrecha interrelación físico-química entre la bacteria y el contaminante, si algo no se desarrolla correctamente o algún factor esta alterado el proceso de biorremediación se vera afectado, estos factores pueden ser espacio, luz temp. del agua, OD, entre otros (Dong, Sun, Qi, & Liu, 2021).

Estos procesos también se ven afectados por la no presencia de aceptores y donantes de electrones, las tasas de degradación de los contaminantes por la no interacción de los sustratos, de esta manera los metabolismos bacterianos se verían afectados ya que no hay una correcta interacción con los sustratos en mención, de esta manera también se debe tomar en cuenta al pH y la disponibilidad y el estado de los nutrientes en el estanque de cultivo, la relación de y la actividad microbiana se afectada por todos los factores previamente mencionados ya que al no encontrarse en equilibrio los mismos se convertirán en una barrera de bloqueo natural de los microorganismos no dejándolos desarrollarse y de esta manera deteniendo la producción de enzimas y demás sustancias degradadoras de MO y demás sustratos involucrados en dichos procesos (Helmy, Karden, & Gustiani, 2019).

Aplicación de biorremediación en acuicultura

### **Biorremediación de detritus orgánicos**

Básicamente el carbono proveniente del detritus en los eslabones de la cadena trófica llega a ser hasta la mitad del carbono que fluye por la cadena trófica, considerando los puntos anteriormente mencionados se tiene conocimiento que la relación entre MO viva MO muerta son 100:10:1 y además que evidencian que existen altas concentraciones de detritus de MO muerta, este en los estanques de cultivo acuícola también son considerados fuentes de alimentos para los organismos presentes en dicho espacio, los cuales tienen altas concentraciones de carbono que son una fuente rica para los microorganismos que realizan sus procesos biorremediadores, en el caso de los microorganismos biorremediadores que su función sea degradar estos compuestos, deben tener la capacidad de degradar de la manera más eficiente todas las sustancias que contengan carbono en sus compuestos, un microorganismo con la capacidad de realizar este proceso son las bacterias del género *Bacillus* (Mamidala, y otros, 2021).

### **Biorremediación de compuestos nitrogenados**

La biorremediación de compuestos nitrogenados básicamente son la captación y eliminación de los mismos en el ecosistema, pero centrándose en el origen, básicamente esto es por la disponibilidad de los compuestos en mención, son debido a la saturación del medio con estas sustancias, lo cual muchas veces el ecosistema es incapaz de absorber los gases nitrogenados disponibles en el medio generando así una contaminación del agua del estanque, es decir desmejora la calidad del agua, es de esta forma en la que la biorremediación llega a ocupar un lugar importante en los procesos del ecosistema controlado de cultivo ya que el nitrito y el amoníaco son nocivos para los cultivos de camarones, ya que estos reducen el porcentaje de excreta de los camarones y a su vez se incrementa la disponibilidad del amoníaco en el organismo y reduce la tasa de absorción de oxígeno, por lo tanto el animal se estresa y se vuelve presa fácil de alguna enfermedad, se conoce que el origen principal de los compuestos nitrogenados son las heces de los animales de cultivo y el alimento no consumido en el estanque (Robles-Porchas, y otros, 2020).

### **Disponibilidad de nutrientes**

La disponibilidad de nutrientes en el microambiente es importante ya que de esta manera se evita que exista la limitante de nutrientes disponibles para la proliferación o masificación de los microorganismos de esta forma hay un equilibrio en el ambiente, es sumamente importante que exista dicho equilibrio y la disponibilidad de nutrientes ya que en base a esto será la tasa de biodegradación del sedimento, a mayor disponibilidad de nutrientes, mayor tasa de reproducción bacteriana, a su vez mayor tasa de biodegradación de los sedimentos, los nutrientes importantes en estos procesos son el fósforo y el nitrógeno, estos tienen la capacidad de mejorar la tasa de la degradación, de esta forma ayudan al equilibrio del C:N:P, es de vital importancia proveer la cantidad adecuada de nutrientes para así poder tener un equilibrio microbiano a la hora de realizar el proceso biodigestor de la materia orgánica disponible en el medio (Colette, Guentas, Patrona, Ansquer, & Callac, 2023).

### **Temperatura y pH**

Como bien se sabe un factor determinante en la reproducción bacteriana es la temperatura medioambiental ya que las sustancias producidas por dichas bacterias deben cumplir un rango específico de temperatura para así poder ser determinantes a la hora de realizar los procesos biorremediadores en el ecosistema, si bien es cierto la temperatura tiene incluso la capacidad de acelerar o detener el proceso biorremediador realizado por las bacterias ya que este influye directamente en el metabolismo de la bacteria debido a la con la temperatura va cogiendo la línea deseada de producción ya sea enzimática o de cualquier otra sustancia que requiera, llegando así a su pico de producción con la temperatura óptima de cada una de las bacterias (Pal, y otros, 2020).

Por otra parte en lo que respecta a pH se puede decir que también entra en el término de factores determinantes en la capacidad y potencialidad del proceso de biorremediación de los microorganismos ya que el pH también tiene la capacidad de influenciar en la capacidad metabólica de las bacterias, además de la influencia en la capacidad de degradar los compuestos, estos serán según la capacidad de cada microorganismo y su origen ya sea ácidos o alcalinos, es por esto que los valores extremos hablando directamente de pH muy altos o muy bajos alterarán la capacidad metabólica de las

bacterias disponibles y esto será un problema para ralentizar los procesos biorremediadores esperados por parte de dichas bacterias, por tal motivo según (Jiménez-Delgadillo, Valdés-Rodríguez, Olalde-Portugal, Abraham-Juárez, & García-Hernández, 2018) asevera en un estudio realizado con cepas de *B. subtilis* que dichas bacterias tienen mejor comportamiento en intervalos específicos de 28 °C y pH de 5 y 28 °C y pH de 8.

Además se debe considerar también que según (Soltani, y otros, 2019) , cada bacteria como ya se tiene conocimiento tiene su rango específico de temperatura óptima, por lo tanto en cada rango de temperatura se reproducirán y cumplirán su efecto cada una de ellas como es el caso de los *B. amyloliquefaciens* que a un rango de 30 – 35 °C llevaran a cabo el proceso de degradación de nitrógeno amoniacal dando como resultado que la mejor actividad de dicha bacteria fue a 35 °C y pH de 7.0 y evidenciando que conforme aumente el pH y la temperatura esta dejara de cumplir con su propósito según lo establecido en el estudio.

### **Concentración de oxígeno**

El proceso de biodegradación de la materia orgánica podrá ser realizado de manera aerobia o de manera anaerobia, por tal motivo la presencia de oxígeno en algunos casos puede significar es la aceleración de la metabolización de los nutrientes, por lo tanto esto también sería un factor crucial dependiendo de que cepas bacterianas se estén utilizando para realizar dicho proceso, como es el caso de (Hlordzi, y otros, 2020), se tiene conocimiento que en el caso de los *B. subtilis* y *B. licheniformis* estas bacterias son aerobios facultativos esto quiere decir que pueden realizar los procesos de biorremediación incluso con la ausencia de oxigenación, aunque como se evidencia estos microorganismos en mención tienen una mayor eficiencia por la vía aerobia, las *B. licheniformis* tienen potencial desnitrificante ya sea por la vía aerobia como la anaerobia, y en el caso de las *B. subtilis* estas por la vía anaerobia tienen la capacidad de nitratos y nitritos para aceptar sus electrones requeridos (Lopes, y otros, 2021).

### **Mecanismos de biotransformación de compuestos tóxicos**

(James, Das, Jose, & VJ, 2021) los *Bacillus* son bacterias con un amplio rango de opciones de producción de enzimas para realizar diferentes procesos biodegradadores, las enzimas son lipasa, celulasa, proteasa, quitinasa, fitasa, entre otras, las cuales pertenecen

a un grupo enzimático con la capacidad de producir efectos biorremediadores, este grupo se lo conoce como enzimas hidrolíticas, al tener la capacidad de degradar los enlaces ácido fílicos previenen que se realice un proceso quelante de los minerales, de esta manera se evita que los elementos trazas se vuelvan insolubles y generen un proceso de precipitación, por lo cual también se conoce que los compuestos que conforman a la MO acuática son materiales de un elevado peso molecular, estos suelen ser polinucleótidos, biopolímeros y polisacáridos, y en ocasiones lignocelulósicos, estos últimos suelen componer hasta en un 90% la MO disponible, estas sustancias llegan a degradarse hasta en un 1 %/ día, en los que participan bacterias hidrolíticas como se menciona anteriormente.



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación del experimento

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Maricultura. Se encuentran ubicado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias cuya dirección es P35P+CCW, E583, El Cambio y tienen las siguientes coordenadas: -3.291056, -79.914248



*Ilustración 1: Ubicación del laboratorio de Maricultura en la Facultad de Ciencias Agropecuarias*

Fuente: Google Earth (2023)

### Materiales y reactivos

#### Materiales

- Crisol
- Autoclave
- Cuchara de laboratorio
- Pinza
- Tamiz de 2 mm y 0.5 mm
- Mortero
- Bandejas de aluminio

#### Equipos

- Balanza analítica
- Mufla

### Diseño experimental. -

Para esta estudio se realizó un diseño experimental al azar con el objetivo de presentar homogeneidad en el material, donde se manipula un factor de estudio a base de bacterias del género *Bacillus* y se segmentó en un tratamiento en dos ambientes con sus respectivas replicas, siendo estas cuatro veces, conformándose doce unidades experimentales (gavetas plásticas) con capacidad de 15 litros y de medidas de 32,5 × 24 × 20 cm (largo x ancho x alto), cubiertas de sedimento acuícola de origen salino hasta una altura aproximada de 10 cm y 5 cm de columna de agua con agua salada a 25 ppm y agua dulce con 0 ppm de salinidad de donde fue extraída la muestra de suelo, siendo estos de origen acuícola, por último, agregando aireación constante para proporcionar condiciones aeróbicas.

### Modelo matemático (diseño completamente al azar)

Tabla 1: Tratamientos

Tratamientos					
TC1	T1	T2	T3	T4	T5
TC2	T1	T2	T3	T4	T5

### 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

## **Caracterización de los tratamientos**

El producto seleccionado para utilizarlo como tratamiento es un producto de origen comercial, de fabricación nacional, que cuenta con una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC/gr de *B. subtilis* y *B. licheniformis*, respectivamente.

### **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.

### **Concentración de Materia Orgánica y Carbono Orgánico Oxidable (g kg<sup>-1</sup>):**

Estas variables son obtenidas por medio de las expresiones de parte de (Navarro, Cegarra, Roig, & Garcia, 1993) y utilizadas por (Lopes, 2021).

### **Manejo del ensayo**

#### **Toma de muestras de suelo en campo**

Las muestras de suelos fueron tomadas en campo dos días después de haberse cosechado en una piscina (5.3 ha) en la camaronera Crustalar (22 ha), ubicada en el archipiélago de Jambelí (Estero La Calavera que tiene las siguientes coordenadas 3°19'48.6"S 69°48'15.0"W. La metodología llevada a cabo para la extracción de las muestras de sedimento se realizó según (Lopes, 2021), mediante la utilización de palas se recolecto 100 kg aproximadamente de sedimento a una profundidad de 8-9 cm, en un diferentes puntos del estanque y fueron almacenadas en fundas de plásticas para finalmente ser transportadas al lugar en donde se realizó el ensayo.

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

Las muestras de suelo fueron llevadas al Laboratorio de Maricultura, la cantidad de 100 kg de sedimento fue mezclado de manera homogénea, antes de ser distribuida en las gavetas plásticas a razón de una cantidad de 7 kg por unidad experimental hasta alcanzar los 10 cm de altura. Posteriormente se recolectó sedimento de las gavetas plásticas para su posterior análisis de suelo para tener como referencia la MOI.

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

La aplicación de los tratamientos consistió en una aplicación de tres días y tres días de descanso, se inició el experimento que tuvo una duración de veinte días, cabe mencionar que se controlaba diariamente el volumen de agua en las gavetas. Durante el tiempo de duración del ensayo se mantuvo una columna de agua de 5 cm con agua de mar filtrada a una salinidad de 25 ppm y agua dulce purificada, con aireadores de la marca POWER 500, una vez finalizado el ensayo se procedió a realizar el análisis del suelo por el método de ignición.

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

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

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

Se recolectó una cantidad de 300 g de sedimento de cada una de las gavetas plásticas y se distribuyeron homogéneamente en moldes de aluminio para ser secadas a temperatura ambiente por 4 días en el laboratorio de suelos, luego se procedió a calcinar la muestra en la mufla para medirla por medio del método de Ignición según (Barrezueta, Cervantes, Ullauri, Barrera, & Condoy, 2020).

Posteriormente es triturada en un mortero y tamizada en un tamiz de 2mm y el de 0.5mm. Cabe señalar que todo el proceso anteriormente descrito se realizó en el Laboratorio de Suelos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

##### **Método de Ignición**

El método Ignición fue llevado a cabo en el Laboratorio de Suelos, utilizando como metodología el protocolo llevado a cabo por (Barrezueta, Cervantes, Ullauri, Barrera, & Condoy, 2020) que se encuentra descrito en los anexos.

## 7. RESULTADOS

### Determinar el porcentaje de reducción de materia orgánica (M.O) en ambientes marinos y de agua dulce.

En la tabla 1, se puede visualizar los resultados obtenidos en laboratorio provenientes de estanques de cultivo intensivo de camarón *L. vannamei* por medio de la aplicación de bacterias probióticas de origen comercial. Estos resultados corresponden a ambientes marinos comparando el porcentaje de materia orgánica inicial (MOI), con el tratamiento control (TC1) y el tratamiento con la aplicación de la bacteria (T1). Así mismo se puede visualizar los resultados correspondientes a ambientes con agua dulce comparando el porcentaje de materia orgánica inicial (MOI), con el tratamiento control para este ambiente (TC2) y el tratamiento con la aplicación de la bacteria (T2).

Tabla 2 Porcentajes de materia orgánica en ambiente marino y de agua dulce con la aplicación de bacterias probióticas.

MOI	TC1	TC2	T1	T2
4,36	3,40	3,15	2,51	3,13
4,76	3,54	3,20	2,67	3,21
4,58	3,55	3,10	2,64	3,16

En la Tabla 1, se puede observar que la materia orgánica inicial medida en el ambiente marino estuvo en un rango entre 4,36 a 4,76%. Para el tratamiento control (sin la bacteria) se reportaron valores de M.O. entre 3,40 a 3,55% mientras que para el T1 (con la batería) se hallaron valores entre 2,51 y 2,67% de M.O, por otro lado, se puede notar que los valores de M.O inicial en ambientes con agua dulce van entre 4,36 y 4,76%, mientras que los valores obtenidos para el TC2 fueron entre 3,10 a 3,20% y para el T2 entre 3,13 a 3,21.

La aplicación de bacterias probióticas que corresponde al T1 logró disminuir el porcentaje de MOI en un 42.89% en ambiente marino. Específicamente se redujo la M.O en un 42.43%, 43.90% y 42.35% para la primera, segunda y tercera repetición, respectivamente. Respecto al TC1, la aplicación de las bacterias (T1) lograron disminuir la M.O. en un

25.45%. Concretamente disminuyó en un 26.17%, 24.57% y 25.63% para la primera, segunda y tercera repetición, respectivamente y la que corresponde al T2 logró disminuir el porcentaje de MOI en un promedio de 30.59% en ambiente de agua dulce. Específicamente se redujo la M.O en un 28.21%, 32.56% y 31% para la primera, segunda y tercera repetición, respectivamente. Con respecto al TC2, solamente en la primera repetición se evidenció una disminución de 0,63% en la M.O, esto puede deberse a que el sedimento posee una mayor cantidad de sales y reduce la eficacia de dichas cepas bacterianas. Sin embargo, en las dos repeticiones subsiguientes se encontró un aumento de M.O. en un 0,31% y 1.93%, para la segunda y tercera repetición, respectivamente.

### **Evaluar en qué ambiente es más eficiente la aplicación de la bacteria de origen comercial para realizar el proceso biorremediador**

Para determinar en qué ambiente es más eficiente la aplicación de la bacteria, se procedió a tratar los datos y explorar la normalidad de los mismos a través de la prueba de Shapiro Wilk. En la Tabla 2 se puede visualizar que los datos obtenidos para todos los tratamientos no siguen una distribución normal ya que su valor de significancia es mayor a 0,05.

Tabla 3: Prueba de Shapiro Wilk

<b>Pruebas de normalidad</b>				
		Shapiro-Wilk		
	Tratamiento	Estadístico	gl	Sig.
% M.O	MOI	,994	3	,850
	T1	,892	3	,361
	T2	,973	3	,686
	TC1	,787	3	,083
	TC2	,996	3	,879
	a. Corrección de significación de Lilliefors			

Una vez realizada la prueba de normalidad se procedió a aplicar la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para determinar diferencias significativas entre los tratamientos y establecer cuál de ellos es el tratamiento más eficiente para realizar el proceso biorremediador. Al aplicar la prueba de Kruskal Wallis se determinó que, si existen diferencias estadísticamente significativas entre los diversos tratamientos empleados, dado que el nivel de significancia obtenido fue de 0,012.

Tabla 4: Prueba de Kruskal Wallis

Estadísticos de prueba <sup>a,b</sup>	
	% M.O
H de Kruskal-Wallis	12,900
gl	4
Sig. asintótica	<b>,012</b>
a. Prueba de Kruskal Wallis	
b. Variable de agrupación: Tratamiento	

En la Figura 1 se puede observar el MOI es mayor que en los demás porcentajes obtenidos tanto para los dos tratamientos control en ambos ambientes, como para el T1 y T2. Se puede evidenciar que el T1 es el que reduce significativamente el porcentaje de M.O. respecto a los otros tratamientos. El T2 y TC2 aparentemente no existen diferencias, mientras que el TC1 es el que menos reduce el porcentaje de M.O.

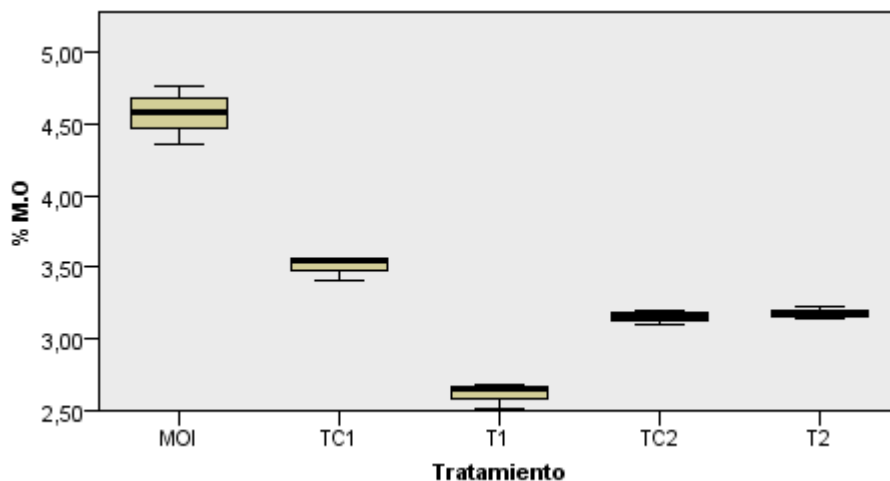


Ilustración 2: Comparación de porcentaje de materia orgánica entre tratamientos

Para averiguar concretamente que tratamientos son los que difieren estadísticamente, se realizó la comparación entre grupos, evidenciando que entre el T1 y el MOI ( $p= 0,010$ ) hay una reducción significativa, en relación con las comparaciones de los otros tratamientos que no mostraron diferencias significativas. Por tanto, se puede sugerir que el T1 que corresponde a la aplicación bacterias probióticas de origen comercial. son más eficientes reduciendo el porcentaje de M.O en ambientes marinos que en ambientes de agua dulce.

Tabla 5: Comparación entre tratamientos

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error Error	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. ajust.
T1-TC2	-4,000	3,651	-1,095	,273	1,000
T1-T2	-5,000	3,651	-1,369	,171	1,000
T1-TC1	9,000	3,651	2,465	,014	,137
T1-M01	12,000	3,651	3,286	,001	,010
TC2-T2	-1,000	3,651	-,274	,784	1,000
TC2-TC1	5,000	3,651	1,369	,171	1,000
TC2-M01	8,000	3,651	2,191	,028	,285
T2-TC1	4,000	3,651	1,095	,273	1,000
T2-M01	7,000	3,651	1,917	,055	,552
TC1-M01	3,000	3,651	,822	,411	1,000



## 8. DISCUSIÓN

La deposición de materia orgánica es la propiedad más importante de los sedimentos en los sistemas de cultivos marinos. Los residuos sedimentarios de las granjas camaroneras van a parar directamente a los entornos adyacentes después del cultivo, y han suscitado preocupación en todo el mundo por los efectos medioambientales adversos (Song, Pang, Guo, & Sun, 2020).

El presente estudio tuvo como finalidad analizar la eficacia en la reducción de M.O. en sedimentos provenientes de estanques de cultivo intensivo de camarón *L. vannamei* por medio de la aplicación de bacterias probióticas (*B. subtilis* y *B. licheniformis*) de origen comercial, en el tratamiento en el cual se utilizó agua de mar, la acción de las bacterias probióticas fue más efectivo, esto se puede deber a una posible mayor cantidad de sales presentes en dicho medio, esto último no fue medido en el mencionado trabajo y hay la posibilidad de que haya generado alguna influencia sobre el resultado del mismo. De acuerdo con los análisis de laboratorio se evidenció que en ambientes marinos el tratamiento que fue aplicado con las bacterias probióticas disminuyó el porcentaje de M.O. inicial en un 42.89%, mientras que en ambientes de agua dulce fue de un 30.59%. Al realizar las pruebas estadísticas se determinó que efectivamente la aplicación de bacterias probióticas de origen comercial, en ambientes marinos es más eficiente que en ambientes de agua dulce en la reducción de materia orgánica.

Existen varios estudios donde se indica la eficiencia del uso de bacterias probióticas aplicadas al suelo, para la reducción de la concentración de materia orgánica, las bacterias más utilizadas son *B. subtilis* y *B. licheniformis*, ya que han demostrado una buena degradación de materia orgánica en ambientes acuáticos (Boyd & Gross, 1998). Entre los beneficios potenciales de los probióticos en los estanques de acuicultura se incluyen: mejoras en la calidad del suelo; reducción de las concentraciones de nitrógeno y fósforo; mejor crecimiento de las algas, entre otros.

Los resultados de este estudio son similares a otros trabajos donde han demostrado que la aplicación de bacterias probióticas logra una menor acumulación de materia orgánica en el fondo de estanques con una mejor penetración de oxígeno en el sedimento y, en general, un mejor entorno para el cultivo de especies acuáticas (Rao, Karunasagar, & Otta, 2000).

Asimismo, estudios en estanques de camarones ~~xx~~ demostraron que la aplicación de un preparado enzimático tiende a potenciar la mineralización microbiana de la materia orgánica. Las bacterias como *B. subtilis* y *B. licheniformis* excretan enzimas

extracelulares que degradan grandes moléculas en partículas más pequeñas que pueden ser absorbidas para su posterior degradación mediante reacciones catalizadas por enzimas dentro de sus células (Boyd & Gross, 1998).

En otra investigación, (Ramu, Sigamani, Venkatachalam, Bommanan, & Ramamurthy, 2017) utilizaron un consorcio bacteriano de *B. subtilis* y *B. licheniformis* como probióticos para la biodegradación de la materia orgánica y controlar la aparición de enfermedades bacterianas en estanques de cultivos de camarones. Estos autores encontraron un aumento significativo de oxígeno disuelto y control de amoníaco, así como nitratos, nitritos y pH.

*Bacillus spp.*, son buenos ejemplos de bacterias adecuadas para la biorremediación de detritus orgánicos. Sin embargo, no suelen estar presentes en las cantidades necesarias en la columna de agua, ya que su hábitat natural son los sedimentos. Cuando ciertas cepas de *Bacillus* se añaden al agua en cantidades suficientes, pueden tener un impacto, compiten con la flora bacteriana presente de forma natural por la materia orgánica disponible, como el pienso lixiviado o en exceso y las heces de peces, calamares o camarones (Soltani, y otros, 2019)

El presente estudio coincide con los hallazgos encontrados en este trabajo, donde la adición de probióticos de la especie *Bacillus* optimiza la descomposición de la carga de materia orgánica (Lu, y otros, 2021) aumentando notablemente el oxígeno disuelto en el agua. (Soltani, y otros, 2019) argumenta que también recicla los nutrientes en la columna de agua y reduce la acumulación de lodos. Estos resultados podrían explicarse por el hecho de que *Bacillus* transforma eficientemente la materia orgánica en CO<sub>2</sub>, que luego es utilizado como fuente de carbono por  $\beta$ - y  $\gamma$ -proteobacterias (Drozd, Malinska, & Mazurkiewicz, Fish pond sediment from aquaculture production-Current practices and the potential for nutrient recovery: a Review., 2020) que convierten la mayor parte de la materia orgánica en limo o biomasa bacteriana (Hlordzi, y otros, 2020).

En otra investigación indican que la aplicación de (*B. subtilis* y *B. licheniformis*), tuvo una influencia positiva en la disminución de la carga de materia orgánica en ambos ambientes (marino y de agua dulce), pero es más eficiente en ambientes marinos, dada las características propias del sistema, ya que, en este tipo de ambientes, la materia orgánica no tiende a acumularse debido a la columna de agua y profundidad del sistema, respecto a ambientes de agua dulce que son más superficiales (James, Das, Jose, & VI, 2021).

(Colette, Guentas, Patrona, Ansquer, & Callac, 2023) señala que las bacterias *Bacillus* no se desarrollan eficientemente con agua dulce, generando un impacto significativo en el ciclo de los nutrientes, la materia orgánica de los sedimentos marinos se descompone mediante una red de procesos más o menos intrincada. El sedimento contiene un entierro eterno para el material refractario restante. De esta manera, los sedimentos aseguran una producción continua en la columna de agua en escalas de tiempo cortas y al mismo tiempo sirven como fuente de carbono inorgánico y nutrientes durante milenios (El-Saadony, y otros, 2021).

La mayor parte de la acuicultura en estanques se lleva a cabo en regiones tropicales, subtropicales o templadas donde las temperaturas del agua son lo suficientemente altas como para permitir una rápida actividad microbiana durante todo el año, o al menos durante siete a ocho meses del año (Huerta, 2018).

Durante los primeros cultivos en un estanque nuevo, la concentración de materia orgánica en el fondo tiende a aumentar, pero pronto se equilibra, típicamente en una concentración de 2 a 3% de carbono orgánico (aproximadamente 4 a 6% de materia orgánica). Esto se debe al hecho de que la materia orgánica en el fondo del estanque se acumula hasta un nivel en el que el aporte anual al sistema equivale a la descomposición anual de la materia orgánica residual en el sedimentos (Han & Boyd, 2018).

En el contexto de la sustentabilidad y la producción sostenida, el estudio y análisis de los probióticos aplicados en el suelo como motor acuícola apuntan a disminuir el impacto ecológico de la producción acuícola (James, Das, Jose, & VJ, 2021)

## 9. CONCLUSIONES

El objetivo de la presente investigación estuvo orientado en analizar la eficacia en la reducción de M.O. en sedimentos provenientes de estanques de cultivo intensivo de camarón *L. vannamei* por medio de la aplicación de bacterias probióticas de origen comercial, para conocer en qué ambiente es más eficiente si en ambientes marinos o de agua dulce, por lo cual se concluye lo siguiente:

Se concluyó que las bacterias probióticas de origen comercial aplicado en ambientes marinos logran reducir el contenido de materia orgánica inicial en un 42.89% y en 25.45% con respecto al tratamiento control al cual no se le aplicó ninguna dosis de bacteria probiótica. Además, se determinó que este mismo grupo de bacterias probióticas se comporta diferente en ambientes con agua dulce, esto se puede deber a que el sedimento al contener menor concentración salina las bacterias podrían estar reduciendo su capacidad probiótica, ya que en unas ocasiones disminuye la concentración de materia orgánica, pero en otras aumenta. Probablemente, esto obedece a las condiciones aeróbicas y anaeróbicas y a las características propias del sistema con agua dulce en la cual la cantidad total de materia orgánica en el fondo de los estanques aumenta gradualmente, a pesar de que la concentración de la misma sea constante.

Se concluye finalmente, que el tratamiento que obtuvo mayor eficiencia para reducir el porcentaje de materia orgánica son las bacterias probióticas aplicadas en ambientes marinos por la posible mayor cantidad de sales presentes en el sedimento, variable que no fue medida en este trabajo, aunque también pueden aplicarse en ambientes con agua dulce, pero con menos eficiencia ya que la eficiencia de los *Bacillus* disminuye cuando se trabaja con agua dulce. En ambientes marinos son más eficientes ya que la materia orgánica se descompone mediante una red de procesos más o menos complejos (productores primarios, secundarios, terciarios). El material refractario que aún permanece queda enterrado en el sedimento. De esta manera, los sedimentos mantienen la producción de columna de agua en escalas de tiempo cortas y al mismo tiempo actúan como una fuente a largo plazo de nutrientes y como inorgánico.

## 10. RECOMENDACIONES

- Es recomendable comprobar por medio de un agar selectivo si los *Bacillus* fueron capaces de colonizar el suelo a biorremediar.
- Reducir el volumen de suelo para el experimento y así poder homogenizar y distribuir mejor el sedimento en las unidades experimentales.
- Utilizar un medio activador para así comprobar si existe un mejor resultado con dicha bacteria.
- 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.
- Es recomendable realizar experimentos a mayor volumen de bacterias y con la utilización de cepa distintas para llegar a valorar cuan eficaces estas pueden ser por medio de su utilización.

# 11. BIBLIOGRAFÍA

- Anangono Méndez, A., & Lloacana Bonilla, E. (2022). Evaluación de la eficiencia de un biofiltro a base de un consorcio bacteriano para degradar fosfatos y amoníaco en aguas residuales de la acuicultura. (*Bachelor's thesis*).
- Arfiati, D., Dina, K., Lailiyah, S., Adialam, E., & Cokrowati, N. (2020). Eficacia de los medios de fijación bacteriana para reducir la materia orgánica de las aguas residuales de la acuicultura del bagre. *Earth and Environmental Science*.
- Azuero, E., Montealegre, V., Campoverde, J., & Unda, S. (2021). Análisis del comportamiento económico de la exportación en el sector camaronero en el Ecuador, periodo 2015-2019. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 112-119.
- Barrezueta, S., Cervantes, A., Ullauri, M., Barrera, J., & Condoy, 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), 25-26.
- Colette, M., Guentas, L., Patrona, L., Ansquer, D., & Callac, N. (2023). Dynamic of active microbial diversity in rhizosphere sediments of halophytes used for bioremediation of earthen shrimp ponds. *Environmental Microbiome*, 18(1), 1-20.
- Coronel Rojas, K., & Yupa Cabadiana, G. (2019). *Evaluación del activador enzimático en la disminución de la materia orgánica en estanques de camarones*. Guayaquil: Universidad de Guayaquil, Facultad de Ingeniería Química.).
- Dong, D., Sun, H., Qi, Z., & Liu, X. (2021). Improving microbial bioremediation efficiency of intensive aquacultural wastewater based on bacterial pollutant metabolism kinetics analysis. *Chemosphere*, 265, 129151.
- Drozd, D., Malinska, K., & Mazurkiewicz, J. (2020). Fish pond sediment from aquaculture production-Current practices and the potential for nutrient recovery: a Review. *International Agrophysics*, 34 (1).
- Drozd, D., Malinska, K., Mazurkiewicz, J., Kacprzak, M., Mrowiec, M., Szczypiór, A., & Stachowiak, T. (2020). Fish pond sediment from aquaculture production-Current practices and the potential for nutrient recovery: a Review. *International Agrophysics*, 34 (1).
- FAO. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. En FAO, *La sostenibilidad en acción* (pág. 22). Romo: FAO.
- Helmy, Q., Kardena, E., & Gustiani, S. (2019). Probiotics and bioremediation. In *Microorganisms*. IntechOpen.
- Hlordzi, V., Kuebutornye, F., Afriyie, G., Abarike, E., Lu, Y., Chi, S., & Anokyewaa, M. (2020). The use of Bacillus species in maintenance of water quality in aquaculture: A review. *Aquaculture Reports*, 18, 100503.
- Jamal, M., Abdulrahman, I., Al Harbi, M., & Chithambaram, S. (2019). Probiotics as alternative control measures in shrimp aquaculture: A review. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 7(3), 69-77.

- James, G., Das, B., Jose, S., & VJ, R. (2021). Bacillus as an aquaculture friendly microbe. *Aquaculture International*, 29, 323-353.
- Jasmin, M., Syukri, F., Kamarudin, M., & Karim, M. (2020). Potential of bioremediation in treating aquaculture sludge. *Aquaculture*, 519, 734905.
- Jasmin, M., Syukri, F., Kamarudin, M., & Karim, M. (2020). Potential of bioremediation in treating aquaculture sludge. *Aquaculture*, 519.
- Jiménez-Delgadillo, R., Valdés-Rodríguez, S., Olalde-Portugal, V., Abraham-Juárez, R., & García-Hernández, J. (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.
- Kamilya, D., & Devi, W. (2022). Bacillus probiotics and bioremediation: an aquaculture perspective. In *Bacilli in Agrobiotechnology: Plant Stress Tolerance, Bioremediation, and Bioprospecting*. Cham: Springer International Publishing., 335-347.
- Kamilya, D., & Devi, W. (2022). Bacillus probiotics and bioremediation: an aquaculture perspective. In *Bacilli in Agrobiotechnology: Plant Stress Tolerance, Bioremediation, and Bioprospecting*. Cham: Springer International Publishing., 335-347.
- Lopes, G. (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.
- Lopes, G., Soligo, T., Yamashita, E., Laterca Matins, M., Loss, A., & Pedreira Mouriño, J. (15 de Marzo de 2021). *Panorama Acuicola*. Obtenido de Panorama Acuicola: <https://panoramaacuicola.com/2021/09/12/la-biorremediacion-y-sus-beneficios-a-la-produccion-acuicola-y-a-los-ambientes-de-cultivo/>
- Lu, S., Liu, X., Liu, C., Cheng, G., Zhou, R., & Li, Y. (2021). A review of ammonia-oxidizing archaea and anaerobic ammonia-oxidizing bacteria in the aquaculture pond environment in China. *Frontiers in Microbiology*, 12, 775794.
- Mamidala, S., Ch, B., Yeshdas, B., Ravinder, B., Mahesh, R., Ch, B., & Rajender, B. (2021). A review on resilience of microbes in aquatic environment. *Journal of etomology and zoology studies*, 9(2).
- Martínez-Córdova, L., Robles-Porchas, G., Vargas-Albores, F., Porchas-Cornejo, M., & Martínez-Porchas, M. (2022). Microbial bioremediation of aquaculture effluents. In *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, 409-417.
- Mendoza Cedeño, L., Pincay Cantos, M., Giler-Molina, J., & Zambrano Cedeño, I. (2022). Influence of Bacterial Microbiota on the Organic Matter Content of Shrimp Pond Soil. *Influence of Bacterial Microbiota on the Organic Matter Content of Shrimp Pond Soil*, 12.
- Mendoza Garcia, A. (2021). Influencia de la actividad acuícola en la calidad ambiental del agua, mediante la determinación de la carga orgánica. *Moyobamba*.
- Navarro, A., Cegarra, J., Roig, A., & Garcia, D. (1993). Relationships between organic matter and carbon contents of organic wastes. *Bioresource Technology*, 44(3), 203- 207.

- 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, 427-435.
- Pal, A., Singh, J., Soni, R., Tripathi, P., Kamle, M., Tripathi, V., & Kumar, P. (2020). The role of microorganism in bioremediation for sustainable environment management. In *Bioremediation of pollutants*. Elsevier, 227-249.
- Pulgarin, R., & Mora, R. (2022). Comportamiento de las exportaciones de camarón y su incidencia en el crecimiento económico del Ecuador en el periodo 2011–2021. *Polo del Conocimiento*, 7(2), 810-837.
- Robles-Porchas, G., Gollas-Galván, T., Martínez-Porchas, M., Martínez-Cordova, L., Miranda-Baeza, A., & Vargas-Albores, F. (2020). The nitrification process for nitrogen removal in biofloc system aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 12(4), 2228-2249.
- Soltani, M., Ghosh, K., Hoseinifar, S., Kumar, V., Lymbery, A., 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.
- Song, X., Pang, S., Guo, P., & Sun, Y. (2020). Evaluation of carrying capacity for shrimp pond culture with integrated bioremediation techniques. *Aquaculture Research*, 51(2), 761-769.
- Stankus, A. (2021). State of world aquaculture 2020 and regional reviews: FAO webinar series. *FAO aquaculture newsletter*, 17-18.
- Torres, V., Rosales, V., & Pérez, J. (2019). Especies y sistemas de producción acuícola en Baja California. *Acuicultura en Baja California. Redes, Actores y Empresas*, 49.
- Wang, L., Shao, X., Xu, M., & Chen, S. (2022). Bioremediation of nitrogen-and phosphorus-polluted aquaculture sediment by utilizing combined immobilized effective microorganisms and. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 192-201.
- Xu, M., Xu, R., Shen, X., Gao, P., Xue, Z., Huang, D., & Cao, J. (2022). The response of sediment microbial communities to temporal and site-specific variations of pollution in interconnected aquaculture pond and ditch systems. *Science of The Total Environment*, 86.
- Yukgehnaish, K., Kumar, P., Sivachandran, P., Marimuthu, K., Arshad, A., Paray, B., & Arockiaraj, J. (2020). Gut microbiota metagenomics in aquaculture: factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1903-1927.



## 12.ANEXOS



Anexo1 : Instalación del proyecto



Anexo 2: Aplicación del probiótico



Anexo 3 : Control del volumen del agua



Anexo 4 : Secado de muestras



Anexo 5 : Materiales para el tamizado de muestras



*Anexo 6: Muestras secas y tamizadas*