



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE ACUICULTURA

**EFECTO DE BIORREMEDIADORES COMERCIALES EN LA
INCIDENCIA
BACTERIANA PATÓGENA DEL AGUA EN CULTIVO DE CAMARÓN
(*Litopenaeus vannamei*)**

**SIGUENCIA SUNCION EMELY GEANELLA
INGENIERA ACUICOLA**

**MACHALA
2023**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE ACUICULTURA

**EFFECTO DE BIORREMEDIADORES COMERCIALES EN LA
INCIDENCIA
BACTERIANA PATÓGENA DEL AGUA EN CULTIVO DE
CAMARÓN**

**SIGUENCIA SUNCION EMELY GEANELLA
INGENIERA ACUICOLA**

**MACHALA
2023**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE ACUICULTURA

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

**EFFECTO DE BIORREMEDIADORES COMERCIALES EN LA
INCIDENCIA
BACTERIANA PATÓGENA DEL AGUA EN CULTIVO DE
CAMARÓN**

**SIGUENCIA SUNCION EMELY GEANELLA
INGENIERA ACUICOLA**

RIVERA INTRIAGO LEONOR MARGARITA

**MACHALA
2023**

EFFECTO DE BIORREMEDIADORES COMERCIALES EN LA INCIDENCIA BACTERIANA PATÓGENA DEL AGUA EN CULTIVO DE CAMARÓN (*Litopenaeus vannamei*)

INFORME DE ORIGINALIDAD

0%

INDICE DE SIMILITUD

0%

FUENTES DE INTERNET

0%

PUBLICACIONES

0%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 10%

Excluir bibliografía

Activo

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

La que suscribe, SIGUENCIA SUNCION EMELY GEANELLA, en calidad de autora del siguiente trabajo escrito titulado EFECTO DE BIORREMEDIADORES COMERCIALES EN LA INCIDENCIA BACTERIANA PATÓGENA DEL AGUA EN CULTIVO DE CAMARÓN (*Litopenaeus vannamei*), 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.

La autora 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.

La autora 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.


SIGUENCIA SUNCION EMELY GEANELLA

0705576957

AGRADECIMIENTO

Quiero dedicar estas palabras de agradecimiento para todos aquellos que han sido parte fundamental en el desarrollo de esta investigación. Han sido testigos de mi pasión por el conocimiento y me han brindado su apoyo incondicional a lo largo de este arduo camino. En primer lugar, quiero agradecer a mis padres Manuel Francisco Siguencia Bermello y Edita de Jesús Suncion Ludeña por su amor, paciencia y constante apoyo en todas mis decisiones. Gracias por creer en mí y por ser mi fuente de inspiración. Su amor y sacrificio han sido el motor que me ha impulsado a seguir adelante en cada etapa de mi vida académica.

A mis hermanos y hermana por su compañía y por siempre estar dispuestos a escuchar mis ideas y brindarme su perspectiva. Sus consejos y comentarios han sido de gran valor para enriquecer mi investigación. A mis amigos y amigas, quienes han estado a mi lado durante esta travesía. Gracias por su amistad incondicional, por ser mi soporte emocional y por celebrar cada pequeño logro en este proceso.

A mi tutora la Ing. Acu. Rivera Intriago Leonor Margarita, PhD, quien han compartido su conocimiento, experiencia y sabiduría conmigo, al Ing. Wilmer Galarza Mora, M.Sc, quien me oriento en todo en el proceso de investigación, gracias por su guía, por desafiarme intelectualmente y por ayudarme a crecer como investigadora. Su dedicación y pasión por la enseñanza han dejado una huella imborrable en mi formación. Expreso mis agradecimientos al Ing. Agr. Irán Rodríguez Delgado, Dr. Mauro Nirchio Tursellino, PhD, Ing. Acuac. Patricio Quizhpe Cordero, Mg. Sc, Ing. Ivanna Tuz Guncay y Ing. Wilmer Moreira Blacio, por brindarme su tiempo y conocimientos, sin su colaboración este trabajo no hubiera sido posible.

Por último, agradezco a la empresa ECUAHIDROLIZADOS CIA. LTDA. y a su gerente general, el Ing. Cristhian Vargas Farias por su gran aporte de recurso e insumos necesarias para la ejecución de la investigación

Gracias a todos por formar parte de este viaje. Su apoyo ha sido fundamental para superar los desafíos y alcanzar mis metas.

Emely Geanella Siguencia Suncion

DEDICATORIA

Esta investigación va dedicado a mis padres y hermanos.

*"La investigación es ver lo que todo el mundo ha visto y pensar lo que nadie más ha
pensado."*

Albert Szent-Györgyi

RESUMEN

En cultivos acuícolas la presencia de enfermedades son componentes naturales del medio teniendo un efecto negativo en la economía para la acuicultura, sin embargo, es una industria que está en constante crecimiento por ello la manifestación de enfermedades por las altas densidades de siembra llegan a ser un problema afectando la calidad de agua. Ante ello surge la necesidad de implantar alternativas para solucionar dicho problema implementando microorganismos beneficiosos como biorremediadores de agua. La investigación realizada tiene como objetivo determinar el efecto de biorremediadores comerciales en comunidades bacterianas patógenas en el agua de cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei*. El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de citogenética ubicado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias con un diseño experimental completamente al azar (DCA) manipulando los factores de estudio siendo los dos biorremediadores comerciales denominado (A y B) con siete tratamientos, (control, A1-0,5 g, A2-0,75 g, A3-1,0 g, B1-0,5 g, B2-0,75 g, B3-1,0 g) y dos replicas, en matraz balón de 500 ml con una columna de agua de 300ml, distribuidos aleatoriamente. Se realizaron análisis de la concentración de *Vibrios* en agua (UFC/ml) utilizando la técnica de muestras seriadas con una dilución de 9:1 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) realizando siembras en placas. La interpretación de los tratamientos se ejecutó en función a la prueba ANOVA de Kruskal-Wallis (p -valor $\leq 0,05$). Los resultados obtenidos no presentaron diferencias estadísticas significativas durante todo el experimento, no obstante, si presento reducción numérica. Al inicio del experimento la concentración de *Vibrios* en el agua fue de ($3,0E+05$ UFC/ml) en todos los tratamientos, al transcurso de las 24 horas, el tratamiento B3 obtuvo una reducción de ($1,30E+05$ UFC/ml), siendo el tratamiento más efectivo durante el tiempo transcurrido. A las 48 horas el tratamiento B2 tuvo una disminución de la carga de *Vibrios* en el agua de ($5,50E+04$ UFC/ml) teniendo mayor reducción. A las 72 horas, el tratamiento B3 obtuvo una disminución del ($1,55E+04$ UFC/ml). De la misma forma ocurrió a las 96 horas, con una disminución de ($3,00E+04$ UFC/ml). Concluyendo que, que la actividad del *Vibrio spp*, obtuvo reducción constante a nivel numérico durante todo el experimento, se observó que el tratamiento (B3) mostró mejores resultados, logrando un porcentaje de reducción del 58,67% en la carga de *Vibrio* en comparación con el (A3), que tuvo una eficiencia del 42,33%, a lo largo de todo el experimento.

Palabras claves: Biorremediadores, *Vibrios*, *Bacillus subtilis* y bacterias patógenas.

ABSTRACT

In aquaculture crops the presence of diseases are natural components of the environment having a negative effect on the economy for aquaculture, however, it is an industry that is constantly growing so the manifestation of diseases by high planting densities become a problem affecting water quality. Therefore, the need arises to implement an alternative to solve this problem by implementing beneficial microorganisms as water bioremediators. The aim of this research is to determine the effect of commercial bioremediators on pathogenic bacterial communities in shrimp *Litopenaeus vannamei* culture water. The experiment was carried out in the cytogenetics laboratory located in the Faculty of Agricultural Sciences with a completely randomised experimental design (DCA) manipulating the study factors being the two commercial bioremediators (A and B) with seven treatments (control, A1-0.5 g, A2-0.75 g, A3-1.0 g, B1-0.5 g, B2-0.75 g, B3-1.0 g) and two replicates, in a 500 ml balloon flask with a 300 ml water column, randomly distributed. Analysis of the concentration of Vibrios in water (CFU/ml) was carried out using the serial sample technique with a dilution of 9:1 (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³) using plate seeding. The interpretation of the treatments was performed according to the Kruskal-Wallis ANOVA test ($p\text{-value} \leq 0.05$). The results obtained did not show significant statistical differences throughout the experiment, although there was a numerical reduction. At the beginning of the experiment, the concentration of Vibrios in the water was (3.0E+05 CFU/ml) in all the treatments. After 24 hours, treatment B3 obtained a reduction of (1.30E+05 CFU/ml), being the most effective treatment during the time elapsed. At 48 hours, treatment B2 had a decrease in the Vibrio load in the water of (5.50E+04 CFU/ml), being the most effective treatment during the elapsed time. At 72 hours, treatment B3 had a decrease of (1.55E+04 CFU/ml). The same occurred at 96 hours, with a decrease of (3.00E+04 CFU/ml). Concluding that, that the activity of Vibrio spp, obtained constant reduction at numerical level during the whole experiment, it was observed that the treatment (B3) showed better results, achieving a percentage of reduction of 58.67% in the load of Vibrio in comparison with (A3), which had an efficiency of 42.33%, throughout the whole experiment.

Keywords: Bioremediators, Vibrios,

INDICE

AGRADECIMIENTO	I
RESUMEN	III
ABSTRACT.....	IV
INDICE.....	V
1 INTRODUCCION.....	1
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMÁTICA	2
3 JUSTIFICACIÓN.....	3
3.1 Objetivo general	4
3.2 Objetivo específico	4
3.3 Hipótesis	4
4 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
4.1 Sector Acuícola en el Ecuador	5
4.2 Contaminantes de los estanques	5
4.3 Calidad de agua	6
4.4 Parámetros fisicoquímicos del agua	7
4.4.1 Parámetro físico	8
4.4.1.1 Sólidos totales disueltos	8
4.4.1.2 Temperatura	8
4.4.1.3 Conductividad eléctrica	8
4.4.1.4 Dureza (CACO3)	9
4.4.2 Parámetro químico	9
4.4.2.1 Amonio	9
4.4.2.2 Nitrito	9
4.4.2.3 Nitrato	10
4.4.2.4 pH	10
4.4.2.5 Oxígeno disuelto	11
4.5 Desarrollo de bacterias patógenas en estanques de acuicultura	11
4.6 Género <i>Vibrio</i>	11
4.7 <i>Bacillus</i>	12
4.7.1 <i>Bacillus subtilis</i>	13
4.8 <i>Bacillus licheniformis</i>	13
4.9 Mecanismos de acción	14
4.10 Biorremediación	14

4.11	Biorremediación de efluentes del cultivo de camarón	15
4.12	Potencial de los biorremediadores	15
5	Materiales y Métodos	16
5.1	Ubicación de la investigación	16
5.2	Materiales	16
5.2.1	Materiales	16
5.2.2	Insumos	17
5.2.3	Equipos generales	17
5.2.4	Variables físicos - químicas	17
5.3	Diseño experimental	18
5.4	Preparación de la unidad experimental	18
5.4.1	Unidad experimental	18
5.5	Tratamientos	19
5.6	Variables a medir	19
5.6.1	Interpretación de los tratamientos	19
5.7	Metodología	20
5.7.1	Obtención de bacterias patógenas (<i>Vibrio sp</i>)	20
5.7.2	Activación de los hisopos <i>Vibrio alginolyticus</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i> 20	
5.7.3	Obtención de las curvas de absorbancia vs concentración de <i>Vibrios</i> 20	
5.7.4	Inoculación de cada cepa de <i>Vibrios</i>	21
5.7.5	Preparación de las bacterias	21
5.7.6	Aplicación de las bacterias en cada tratamiento	21
5.7.7	Recolección de muestra para su evaluación	21
5.7.8	Análisis microbiológico	21
5.8	Procedimiento estadístico	22
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
6.1	Comportamiento de las variables físico-químicos durante los 5 días del experimento	23
6.2	Interpretación general de los tratamientos durante los 5 días	25
6.3	Interpretación de los tratamientos por horas	27
6.3.1	Carga de <i>Vibrios</i> en el agua a las 0 horas	27
6.3.2	Carga de <i>Vibrios</i> durante las 24 horas	27
6.3.3	Carga de <i>Vibrios</i> durante las 48 horas	29
6.3.4	Carga de <i>Vibrios</i> durante las 72 horas	30
6.3.5	Carga de <i>Vibrios</i> durante las 96 horas	31

6.4	Identificación del mejor tratamiento durante los 96 horas transcurrido ante la presencia de <i>Vibrios</i> .	33
7	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	34
7.1	Conclusiones	34
7.2	Recomendaciones	34
8	REFERENCIAS	35
9	ANEXOS	42

Índice de Tablas

Tabla 1 Rangos adecuados para la medición de parámetros	7
Tabla 2 niveles de toxicidad de NH ₃ mg/l y NH ₄ mg/l.....	10
Tabla 3 Especies de <i>Vibrios</i> que afectan con mayor frecuencia los cultivos.	11
Tabla 4 Efecto del Género <i>Bacillus</i> en presencia de <i>Vibrios</i>	13
Tabla 5 variables dependientes del experimento	19
Tabla 6 Tratamientos y concentraciones	20
Tabla 7 Medias comparativas del <i>Vibrios</i> en el agua en los diferentes tiempos de evaluación	25
Tabla 8 Eficiencia de los biorremediadores A y B	33

Índice de Figuras

Figura 1 Facultad de Ciencia Agropecuarias	16
Figura 2 Diseño del experimento	18
Figura 3 Comportamiento de la temperatura durante los 5 días del experimento	23
Figura 4 Comportamiento del pH en el agua durante todo el experimento	24
Figura 5 Comportamiento de la concentración de lo solidos disueltos en el agua	24
Figura 6 Comparación de las diferentes dosis de biorremediadores ante la presencia de <i>Vibrios</i> durante los 5 días.....	26
Figura 7 Carga de <i>Vibrios</i> en el agua al inicio del experimento.....	27
Figura 8 Comparación de las diferentes dosis de biorremediadores ante la presencia de <i>Vibrios</i> durante las 24 horas.....	28
Figura 9 Comparación de las diferentes dosis de biorremediadores ante la presencia de <i>Vibrios</i> durante las 48 horas.....	29
Figura 10 Comparación de las diferentes dosis de biorremediadores ante la presencia de <i>Vibrios</i> durante las 72 horas.....	30
Figura 11 Comparación de las diferentes dosis de biorremediadores ante la presencia de <i>Vibrios</i> durante las 96 horas.....	32

Índice de Anexos

Anexo 1 Activación de los hisopos de <i>V. parahemolyticus</i> y <i>V. alginolyticus</i>	42
Anexo 2 Replicación de las cepas de <i>Vibrios</i>	42
Anexo 3 Inoculación de las cepas de <i>Vibrios</i> en cada unidad experimental	42
Anexo 4 Inoculación de los biorremediadores comerciales en cada unidad experimental	43
Anexo 5 Toma de parámetros (pH, Temperatura, sólidos disueltos)	43
Anexo 6 Recolección de muestras de agua.....	43
Anexo 7 Siembras microbiológicas de <i>Vibrios</i>	44
Anexo 8 Placas de <i>Vibrios</i> en los diferentes tratamientos	44

1 INTRODUCCION

El desarrollo de la acuicultura se da en diferentes tipos de producción, tales como extensivos, semi-intensivos, dependiendo al nivel de control y calidad de agua. En sistemas de producción intensiva descargan grandes cantidades de agua después de ser utilizadas o pueden ser tratadas para la reutilización. Generalmente, la contaminación del agua en los cultivos acuícolas conlleva la abundancia de desechos producidos por los organismos acuáticos que contaminan las fuentes de aguas y son descargadas en las fuentes hídricas naturales.

(Hassan et al., 2022) Afirma que, el uso de probióticos como fuente de biorremediación desempeña una parte importante en la productividad acuícola con la finalidad de prevenir enfermedades y mejorar las fuentes de agua librando de contaminantes tóxicos. La biorremediación en los cultivos acuícolas se ha convertido alternativas que ayudan a mejorar la calidad, por ello se relacionan estudios de caso que contribuyen las discusiones sobre el aporte de las biotecnologías aplicadas a la descontaminación del ambiente y al desarrollo sostenible. Por otra parte, durante los procesos de biorremediación utilizan microorganismos vivos para mitigar las condiciones que están desfavorables en las piscinas de cultivos por alteración de contaminantes.

La aplicación eficiente de estos protocolos en el agua y suelo de las piscinas, acorta los tiempos de producción del crustáceo y aumenta los ciclos por año, además, aumenta el rendimiento y sobrevivencia del camarón mejorando la rentabilidad de la operación y minimizar el impacto negativo ambiental.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMÁTICA

En los últimos años, la producción acuícola se enfrenta a problemas ambientales por la deficiencia del manejo de producción acuícola, provocando la acumulación de residuos orgánicos, llegando a ser perjudicial durante el ciclo de cultivo. En la provincia de El Oro y en otros lugares del país han implementado nuevas técnicas utilizando sistemas de recirculación de agua, teniendo riegos de producir impactos ambientales originados por el incremento de la biomasa y aumenta los metabolitos tóxicos que llegan afectar a la calidad del agua.

La degradación del alimento no consumido por el camarón genera grandes problemas químicamente en el agua, desencadenado desequilibrio en los parámetros físicos químicos que interactúan entre los nutrientes presentes, por lo que la acuicultura aplica alterativas que disminuyan los contaminantes que afecten al cultivo (Juárez-Rosales et al., 2021).

El consumo de agua en los cultivos llega a ser muy altos durante todo el proceso de producción, el agua es un factor importante por lo que debe mantener la sanidad y calidad para cada etapa del camarón, evitando enfermedades por los sólidos en suspensión y microorganismo presentes en la columna de agua.

3 JUSTIFICACIÓN

Considerando la sobreexplotación de los recursos naturales de los organismos acuáticos y el consiguiente deterioro de la industria, la producción de organismos acuáticos parece ser una necesidad inevitable para el futuro cercano de la humanidad. Para hacer esto, es necesario no solo producir de manera eficiente, sino también tener el menor impacto posible en el medio ambiente.

El sector acuícola se ve afectada por la calidad de agua en los cultivos por lo que se ejecutan alternativas para remediar dicho problema mediante la utilización de bacterias beneficiosas para la biorremediación del agua recirculante en cultivos intensivos y semi-intensivo de camarón blanco, como estrategia de aplicar procesos de Buenas Prácticas de Producción, que garantice la calidad del agua, la producción acuícola, la seguridad alimentaria, la implementación de proyectos sostenibles, y la conservación del medio ambiente (Alvarado Caballero & Aveiga Cortez, 2016).

Roblez (2020) Afirma que la biorremediación es una técnica que se basa en la capacidad de crecimiento de los microorganismos a partir del uso de sustancias recalitrantes, permitiendo degradar los compuestos hasta dióxido de carbono, agua, entre otros productos. Dado que el agua está siendo ingerida constantemente por todos los animales acuáticos, mejorar la calidad del agua (biorremediación) en acuicultura es un requisito importante para el cultivo de camarones y peces.

OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar el efecto de biorremediadores comerciales en comunidades bacterianas patógenas en el agua de cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei*.

3.2 Objetivo específico

- Evidenciar el efecto de las dosis de biorremediadores comerciales en la concentración bacteriana de *Vibrios* en el agua en diferentes tiempos de evaluación.
- Definir el mejor biorremediador comercial para minimizar la carga bacteriana de *Vibrio spp.* en el agua.

3.3 Hipótesis

¿La aplicación de biorremediadores en el agua de cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei* reduce la presencia de bacterias patógenas en el agua?

H0: No existe diferencias significativas entre los tratamientos con biorremediadores comerciales en comunidades bacterianas patógenas del agua en cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei*.

H1: Si existe diferencias significativas entre los tratamientos con biorremediadores comerciales en comunidades bacterianas patógenas en el agua de cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei*.

4 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Sector Acuícola en el Ecuador

La acuicultura en el Ecuador se conforma por diferentes tipos de cultivos como camarón, trucha en algunas zonas de la sierra y tilapia en la costa. En 1968 inicia el cultivo de camarón en la provincia de El Oro, cantón Santa Rosa, con pequeñas empresas que observaron que los camarones crecían en pequeños pozos salinas. En el sector acuícola obtuvo beneficio durante los años setenta, expandiéndose convirtiéndose en un gran negocio de corto plazo. En la actualidad el sector cuenta con 175 mil hectáreas de piscinas camaroneras activas, lo cual representan 2.578 empresas acuicultoras con producción de 450 millones de libras, teniendo el 34% de la producción, siendo el tercer producto no petrolero del país (Armijos Suárez et al., 2015)

La acuicultura se ha convertido en la actividad con mayor crecimiento a nivel mundial, incrementando anualmente el 6.7% con aportaciones mayores a 90.4 millones de toneladas (Méndez Martínez et al., 2021). El éxito del sector está enfocado en especies de alto interés acuícola, por lo que algunos cultivos demandan una amplia tecnología de producción, en cambio, en otros cultivos mejoran en estudios por otra, parte el consumo de especies acuáticas a nivel mundial fue de 9.9 kg en 1960 en comparación del 2015 que fue de 20.1 kg de organismos acuáticos incrementando la demanda de los recursos acuícolas. Sin embargo, existe un temor en el sector por el incremento alimenticio para la población, la disminución de los productos acuícolas no es generada por escasez de agua o tierra, sino que es por la demanda de los productos (Ullsco Azuero et al., 2021).

4.2 Contaminantes de los estanques

Según Curbelo Hernández & Palacio Dubois (2021) La actividad en el sector acuícola presenta características principales en la generación de residuos que contaminan el agua y suelo, pueden ser distribuidos en dos grupos de materia, siendo orgánicas e inorgánicas en teoría puede aumentar el contenido de ceniza y proteínas.

El alimento no consumido aumenta la carga de desechos afectando la calidad de agua, los contaminantes son asimilados por procesos físicos, químicos y biológicos dentro de los cultivos acuícolas. La densidad y la calidad de agua influyen en el consumo de alimento. El consumo de alimento llega ser el 80% sin él embargo, el 10 al 20% consumido por la

especie es transformado en heces. Los residuos de alimento son descompuestos por bacterias y microorganismos, los nutrientes que provee el alimento son absorbidos por los organismos, una parte se va convirtiéndose en biomasa y el restante se metaboliza y se excreta como dióxido de carbono, fosfato, amonio, y otros componentes (Chatvijitkul et al., 2017).

Según Luis, (2021) los cultivos intensivos son unos de los sistemas que generan mayores residuos orgánicos por el exceso de alimento para sustentar la biomasa presente en estos tipos de sistemas, por otra parte, se genera la floración de fitoplancton, concentraciones bajas de oxígeno, niveles altos de amonio, por lo que produce estrés al camarón provocando la disminución de producción y supervivencia.

4.3 Calidad de agua

La calidad de agua está constituida por factores tales como físicos, químicos y biológicos, que intervienen en las propiedades de las fuentes hídricas, teniendo efecto en la salud de los ecosistemas, además actúan sobre los estadios larvarios del camarón durante los ciclos de desarrollo y el proceso de muda. (Gutiérrez M. O., 2018) menciona lo siguiente:

“La deficiencia de la calidad de agua provoca disminución del crecimiento y supervivencia, la detención de muda aumenta la deformidad y mortalidad, además interviene en la aparición de enfermedades en los cultivos de camarón. La calidad de agua es diferente según la especie, además, se lleva un control constante para asegurar la supervivencia y crecimiento de especies”.

La calidad de agua en los estanques de cultivos puede alterar significativamente la producción, los parámetros que se monitorean en la calidad de agua por lo general incluyen, oxígeno disuelto, pH, salinidad y temperatura. Obtener las condiciones adecuadas del ambiente acuático favorece a la productividad de estanques y grandes ganancias, los parámetros con mayor importancia en los cultivos son el oxígeno disuelto, pH, salinidad y temperatura, estos factores influyen directamente en la salud del animal, crecimiento y patrón alimenticio (p. 17).

La importancia del conocimiento de los parámetros microbiológicos y físico-químicos de las fuentes de aguas son imprescindibles para la descripción de calidad, al mismo tiempo beneficia al sector acuícola, ayudando a mejorar las condiciones del medio acuático, por

otra parte, evita enfermedades vinculadas con el estrés de especies acuáticas siendo mayor eficiente para generar información ayudando a comparar el mejor método de productividad (Quintanilla Corena & Castro Miranda, 2022).

El agua es un factor importante para mantener la salud de las especies en cultivo, ejerciendo un efecto positivo durante el desarrollo. La calidad del agua afecta la abundancia, composición y diversidad de los organismos que en ella habitan, incluyendo su condición fisiológica y productividad. Existen parámetros generales de calidad del agua para la acuicultura, no obstante, cada especie posee intervalos óptimos para su desarrollo, si la calidad del agua se aparta de lo establecido se deberán aplicar medidas que permitan mejorar y ajustar a las condiciones óptimas (Briones-Pérez et al., 2017).

4.4 Parámetros fisicoquímicos del agua

Los parámetros físico-químicos del agua suelen presentar cambios constantes, siendo inestable fuera de sus rangos adecuados, desestabilizan el ambiente, es de interés mantener niveles máximos y mínimos que se toleran en cada uno de los ecosistemas. Por lo tanto, los parámetros óptimos se describen como rangos de medición, los valores fuera de rango llegan a causar dificultades en la calidad de agua (Carbajal Hernández et al., 2015).

Tabla 1. Rangos adecuados para la medición de parámetros

Parámetros	Rango	
	Mínimo	Máximo
Temperatura (°C)	25	32
Salinidad (ppt)	15	23
Oxígeno disuelto (ppm)	4	10
pH	7	9
Turbidez (cm)	35	45

Fuente: (Díaz & López, 1993)

4.4.1 Parámetro físico

4.4.1.1 Sólidos totales disueltos

Los TDS en los cultivos se presenta de forma disuelta y en suspensión, las concentraciones de TDS presentes en el agua debe ser de 400 mg L⁻¹ para sólidos líquidos y valores de <80 mg L⁻¹ para sólidos suspendidos. En cantidades mayores del TDS disminuye el desarrollo de los peces, además afecta a las branquias y movilidad reduciendo el consumo de alimento (Mozombite, 2019).

4.4.1.2 Temperatura

Según Altamirano, (2018) para los cultivos de camarón la temperatura llega a ser un factor importante porque interviene en los procesos de alimentación, consumo de oxígeno, muda, crecimiento, metabolitos tóxicos y supervivencia. La temperatura del agua debe oscilar entre 20 y 32 °C siendo 22 y 30°C los rangos óptimos para el cultivo de *P. vannamei*. La temperatura límite es entre 34 a 36°C siendo letal para el cultivo debilitando el sistema inmune del camarón.

La supervivencia de los microorganismos está determinada por la temperatura porque es un factor físico importante dentro de los ecosistemas acuáticos. Los catalizadores participan en la degradación de compuestos por medio de la ruta biológica que realizan las enzimas en óptimas condiciones de temperaturas; sin embargo, no ocurre de la misma forma para todas las temperaturas, por lo cual la temperatura puede ralentizar o acelerar los procesos de biorremediación porque interviene en la fisiología de los microbios. La actividad microbiana se incrementa cuando la temperatura llega a su nivel máximo a una temperatura óptima, por lo tanto, disminuye súbitamente con un incremento o reducción de temperaturas, por ende, se detiene al llegar a temperaturas específicas (Abatenh et al., 2017).

4.4.1.3 Conductividad eléctrica

Es una medida que tiene soluciones acuosas para transportar la corriente eléctrica, esta cualidad depende de la disposición de iones, temperatura, movilidad, y concentración. Las soluciones inorgánicas son buenas conductoras. Los compuestos orgánicos en el agua transportan bajas corrientes (Maury, 2019).

4.4.1.4 Dureza (CaCO₃)

La dureza del agua hace referencia a la cantidad de proporción de sales de calcio y magnesio diluido en el agua. El origen de los minerales se encuentra en las zonas rocosas calcáreas y se hayan en menor a mayor proporción en aguas naturales en su mayoría. Tiene un límite estándar de 120 mg CaCO₃/L designados como aguas duras. (Romo Toledano & Chilpa Navarrete, 2017).

El agua se clasifica según su dureza:

- Aguas suaves: < 60 mg/L
- Aguas levemente duras: (60-120) mg/L
- Aguas medias duras: (120-180) mg/L
- Aguas duras: > 180 mg/L

Las aguas duras producen conductividad, además, hay otros iones que pueden ser capaces de incrementar la conductividad como el cloruro de sodio. No obstante, en mayor proporción se encuentran en aguas subterráneas tales como los nacientes y pozos, existiendo una alta relación entre la dureza y conductividad (Solís-Castro et al., 2018).

4.4.2 Parámetro químico

4.4.2.1 Amonio

Es un producto de la excreción, orina de los peces y descomposición de la materia (degradación de la materia vegetal y de las proteínas del alimento no consumido). El amonio no ionizado (forma gaseosa) y primer producto de excreción de los peces, es un elemento tóxico, La toxicidad del amonio en forma no ionizada (NH₃) aumenta cuando la concentración de oxígeno disuelto es baja, el pH indica valores altos (alcalino) y la temperatura es alta. Cuando los valores de pH son bajos (ácidos), el amonio no causa mortalidades (Colorado Gómez & Ospina Correa, 2019).

4.4.2.2 Nitrito

Los nitritos en el agua son de suma importancia por su toxicidad alta y agente contaminante, se producen por la transformación de amonio a nitritos. Los agentes tóxicos

de los nitritos son en función a la proporción de cloruros, oxígeno y temperatura del agua. Los nitritos sirven como alimento para los microorganismos nitrobacter las cuales se transforman en metabolitos beneficiosos para los cultivos (Colorado Gómez & Ospina Correa, La Acuaponía como herramienta de formación en tiempos de paz”, 2019).

Tabla 2. niveles de toxicidad de NH_3 mg/l y NH_4 mg/l

Toxicidad	NH_3 mg/l	NH_4 mg/l
Optimo	0.00	0.00 – 0.4
Aceptable	0.006	1.0
Aceptable por 15 días	0.025	1.6
Mortalidad total	0.08	3.0

Fuente: (Díaz & López, 1993).

4.4.2.3 Nitrato

Los niveles de nitratos en el agua son entre 0 y 40 ppm siendo seguros para los cultivos. Si los valores sobrepasan a los 80 ppm pueden ser perjudiciales. Sin embargo, es difícil determinar el origen de los contenidos altos de nitritos debido a que puede originarse de muchas fuentes (Colorado Gómez & Ospina Correa, La Acuaponía como herramienta de formación en tiempos de paz”, 2019).

4.4.2.4 pH

Regularmente el pH alto no puede ser tolerado por los microorganismos, en condiciones altas y bajas se llegan a hidrolizar en compuestos microbianos alterando las enzimas. Por lo tanto, algunos microorganismos acidófilos (medio ácidos) y alcalófilas (medios alcalinos) soportan pH altos (Ramírez, 2015).

La actividad metabólica se ve afectada por el pH, además la eliminación los compuestos pueden presentar fluctuaciones como incrementar o disminuir. Los efectos de PH altos y bajos intervienen en los procesos metabólicos de los microorganismos, siendo susceptibles a los cambios de pH en la descomposición de la materia. Además, de degradación ocurre

en rangos amplios de PH que va entre 6,5 a 8,5 siendo óptimos en la biodegradación (Abatenh et al., 2017).

4.4.2.5 Oxígeno disuelto

El oxígeno disuelto es un factor importante para la calidad de agua, además puede limitar la producción en sistemas abiertos y cerrados. Por lo tanto, al requerir altos niveles de oxígeno por la producción de biomasa alta y escasa solubilidad de gas en el agua, puede generar pérdidas por ello es esencial el suministro de oxígeno en los sistemas, el oxígeno disuelto es afectado por el incremento de salinidad, temperatura y al aumentar la presión. Al aumentar la temperatura y el incremento de la actividad metabólica el requerimiento de oxígeno es mayor (Gutiérrez & Aguilera B., 2015).

4.5 Desarrollo de bacterias patógenas en estanques de acuicultura

Las bacterias patógenas *E. coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Streptococo* y *Vibrios* llegan a ser comunes en el agua de cultivo de camarón por actividades antropogénicas que aumentan el riesgo de bacterias no beneficiosas en los estanques tales como: deficiencia del manejo de cultivos, el uso de alimentos inseguros en las dietas. El exceso de agentes patógenos toma control de los estanques cuando las condiciones de crecimiento no son apropiadas, los patógenos van evolucionando por la alteración de parámetros de oxígeno, altos niveles de nitrógeno, fosfato, sulfato y pH altos. Por otra parte, los patógenos se adaptan y generan componentes tóxicos, sin embargo, las bacterias patógenas son resistentes a la gran parte de antibióticos lo que ocasiona problemas en eliminar y prevenir (Olmos et al., 2020).

4.6 Género *Vibrio*

En la actualidad el género *Vibrio* es el principal en causar grandes problemas en los cultivos acuícolas, los *vibrios* son microorganismos Gram negativo que se encuentran en los medios de cultivos en casi todas las áreas costeras del mundo. Son los grupos de bacterias con mayor presencia en los cultivos con concentraciones de 10^{-2} UFC/ml en muestras de agua y en sedimentos entre 10^{-5} y 10^{-6} UFC/g (Castro Castro et al., 2022).

Tabla 3. Especies de *Vibrios* que afectan con mayor frecuencia los cultivos.

Especies	Enfermedad	Afecta
----------	------------	--------

<i>V. harveyi</i>	Vibriosis Luminiscente	Larvas
<i>V. parahaemolyticus</i>	EMS/AHPND	Camarones de 40 días o menos
<i>V. vulnificus</i>	SHB (septicemia hemorrágica bacteriana)	Camarones adultos
<i>V. Fluvialis</i>	SHB	Camarones adultos
<i>V. alginolyticus</i>	SHB	Camarones adultos
<i>V. damsela</i>	SHB	Camarones adultos
<i>V. mimicus</i>	SHB	Camarones adultos
<i>V. cholera(non01)</i>	SHB	Camarones adultos

Fuente: (Castro Castro & Lagos Moreno, 2022).

4.7 *Bacillus*

Aunque se considera que la bacteria es aeróbica, bien puede adoptar el entorno gastrointestinal anóxico no solo para sobrevivir sino también para multiplicarse dentro de él mediante el uso de nitrato/nitrito (en lugar de oxígeno) durante el proceso de respiración anaeróbica las bacterias pueden tolerar temperatura, pH y salinidad variados que van desde 10 a 50 °C; 4–11; y 0–9%. Las especies de *Bacillus* establecen un papel importante en los aspectos nutricionales, inmunohematológicos, fisiológicos y terapéuticos, así como en la mejora de la calidad del agua y los índices ambientales durante las condiciones de cría y cultivo (Nayak, 2020).

Las especies de *Bacillus* son bacterias grampositivas que tiene la capacidad de transformar sustancias orgánicas en dióxido de carbono siendo más eficiente que las bacterias gramnegativas que transforman cantidades mayores de MO en biomasa bacteriana, el uso de bacterias ayuda a mejorar la calidad de agua, por otra parte, los bacterias *Bacillus licheniformis* disminuye niveles de amoníaco con un porcentaje de 85,2% de concentraciones de nitrato de amonio, además, presentan característica de aumentar la composición de especies microbianas mejorando la calidad de agua (Jahangiri & Esteban , 2018).

4.7.1 *Bacillus subtilis*

Generalmente, *Bacillus spp* son bacterias Gram-positivas, que son mejores convertidores de materia orgánica a CO₂ que la de las bacterias Gram-negativas, minimizando así la acumulación de carbono orgánico disuelto y en partículas. Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre *Bacillus spp.* se centró en el uso de un solo cultivo, mientras que es en gran medida especulativo si dos o incluso múltiples combinaciones de cepas/especies serían beneficiosas. Según se informa, los probióticos de múltiples cepas/especies también mejoraron la protección contra la infección patógena (Ren et al., 2021).

4.8 *Bacillus licheniformis*

Es una bacteria Gram positiva que crea esporas de interés biotecnológico con diferentes usos en la actualidad como en la acuicultura, agricultura, etc. Su uso como vector de producir enzimas y otros productos de interés comercial ayudan a la aplicación de biotecnológicas tales como la biorremediación. *Bacillus licheniformis* involucra acción sobre el entorno del microbiota y reduce el pH. Por otra parte, estimula la exclusión de microorganismos patógenos, mejorando la calidad de agua debido a la eliminación de los desechos acumulados en el medio a base de nitrógeno y fósforo y mejora el contenido de nutrientes (Murasa et al., 2021).

Tabla 4. Efecto del Género *Bacillus* en presencia de *Vibrios*

Género	Especie	Aislamiento	Inhibe (antagonismo <i>in vitro</i>)
<i>Bacillus</i>	<i>B. flexus</i> LD-	Agua y sedimento de piscinas de camarón	<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. alginolyticus</i>
	<i>B. licheniformis</i> LS- <i>1</i>	Agua y sedimento de piscinas de camarón	<i>V. harveyi</i> , <i>V. vulnificus</i>
	<i>sutiles</i> BT23	Piscinas de cultivo de camarones	<i>V. Harvey</i> , <i>V. anguillarum</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. damisela</i>
	<i>B. subtilis</i> (IPA- S.51)	Tracto digestivo de <i>L. vannamei</i>	<i>V. alginolyticus</i>
	<i>B. subtilis</i> SH23	Intestino de <i>L. vannamei</i>	<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i>

<i>Lactobac acidófilo 04 illus</i>	Cuajada casera	<i>V. _ parahaemolyticus , V. _ cholerae , V. _ harveyi y V. alginolítico</i>
----------------------------------------	----------------	---------------------------------------------------------------------------------------

Fuente: (Knipe et al., 2021).

4.9 Mecanismos de acción

Los mecanismos de acción principales para los probióticos empelados en el área de acuicultura influyen en la capacidad de colonizar y adherirse al tracto digestivo, compuestos beneficioso, generación de sustancias para combatir patógenos y el medio acuático. Las bacterias positivas del género *Bacillus* intervienen en la transformación de la materia orgánica (MO) en CO₂ en cambio las bacterias negativas se enfocan en convertir la MO en biomasa bacteriana. Al aplicar bacterias al agua de cultivo reduce la MO, nitratos, pH y las concentraciones de fósforo mejorando la supervivencia, productividad y conversión alimenticia (Toledo et al., 2018).

4.10 Biorremediación

El término de biorremediación hace referente a la utilización de microorganismos vivos con la finalidad de ayudar a mitigar problemas desfavorables durante el proceso de cultivo de camarón alterada por los insumos utilizados, manteniendo estable el ecosistema obteniendo buena producción (Montenegro Gómez y otros, 2019).

En los procesos de biorremediación intervienen los géneros *Bacillus*, las cuales tiene características fisicoquímicas, entre ellas abarca la capacidad de degradar compuestos orgánicos como almidón, celulosa, proteína e hidrocarburos, además presenta la capacidad de generar antibióticos y cumple un papel fundamental en la nitrificación y desnitrificación, magnesio oxidante, selenio oxidante. La biorremediación es el uso de microorganismos para reducir los niveles de contaminantes, además las enzimas producidas por los microorganismos modifican los contaminantes tóxicos en menos tóxico convirtiendo en estructuras inofensivas (Safitri et al., 2015).

Los recursos hídricos durante los últimos años han presentado daño por el aumento de la población de bacterias gram negativas. Por ello es esencial la planificación de saneamiento simple que ayude en la calidad y disponibilidad de las fuentes hídricas para el futuro. Por otra parte, es de interés el estudio de la biorremediación de agua que tienen

concentraciones altas de materia orgánica, lixiviados de sólidos, además de sustancias tóxicas mediante el uso de microorganismo como bacterias, hongos, algas, permitiéndola disminución concentraciones nocivas presentes en el agua (Polania Janzasoy & Calderón-Vallejo, 2018).

4.11 Biorremediación de efluentes del cultivo de camarón

Navarrete Álava et al. (2022) afirma que, en los cultivos de camarón el incremento de materia orgánica provocada por la excreción y la alimentación del camarón ha llegado ser un problema para los cultivos durante los inicios de la acuicultura. El excedente de nitrógeno en los estanques por la capacidad de carga causa daños a la calidad de agua por el aumento constante del amonio, nitrito, nitratos, siendo tóxicos para el cultivo afectando los parámetros de pH y oxígeno disuelto produciendo microorganismo que perjudican al agua. Las fuentes hídricas de la acuicultura son contaminadas por solidos en suspensión, muerte del camarón, alimento no consumido, heces de los animales y otros factores que intervienen.

4.12 Potencial de los biorremediadores

La biorremediación es conocido como un proceso que sirve de agente microbiológico de forma positiva sobre los residuos contaminantes en el agua. Ciertos autores hacen referencia como eliminación de residuos transformando los compuestos contaminados por medio de los procesos biológicos. Estos tipos de métodos se establecen en las condiciones hidrogeológicas (Jasmin y otros, 2020).

5 Materiales y Métodos

5.1 Ubicación de la investigación

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Citogenética y el análisis microbiológico en el laboratorio de Sanidad Vegetal, la cual se encuentra ubicado en la Universidad Técnica de Machala, Facultad de ciencias agropecuarias en el Sector Santa Inés, teniendo las siguientes coordenadas $3^{\circ}17'30''\text{S}$ $79^{\circ}54'48\text{W}$

Figura 1. Facultad de Ciencia Agropecuarias



Fuente: Google Earth

5.2 Materiales

5.2.1 Materiales

- Muestra de agua
- Biorremediadores comerciales
- Matraz balón de 500 ml
- Aireadores
- Cajas Petri
- Asa de digralsky
- Mechero de alcohol

- Micropipetas de 100 y 1000 μ l
- Puntas azules de 1000 μ l y puntas amarillas de 100 μ l
- Porta puntas de 100 y 100 μ l
- Tubo de microcentrífuga Eppendorf de 2 ml PK/500
- Tubos de 40 ml
- Espátula
- Vaso de precipitación de 250 ml
- Balón de vidrio
- Gradilla

5.2.2 Insumos

- Agua destilada
- Alcohol industrial
- CHROMagar™ Vibrio
- Cloruro de sodio
- Agar marino
- Caldo marino
- Caldo soya tripticaseina

5.2.3 Equipos generales

- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Incubadora
- Balanza

5.2.4 Variables físicos - químicas

- Temperatura
- pH
- Sólidos disueltos

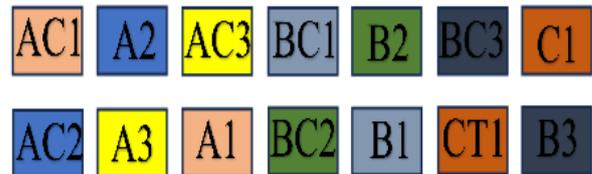
5.3 Diseño experimental

Se implemento un diseño completamente al azar (DCA) 7x2, utilizada para comparar dos o más tratamientos de forma aleatoria, se manipulo dos factores de estudio siendo biorremediadores comerciales denominadas como (A y B) compuestos por *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*, con siete tratamientos y dos replicas dando como resultado catorce unidades experimentales en balones de vidrios de 500 ml con una columna de agua de 300 ml. En la Figura 2 muestra los tratamientos distribuidos al azar en las unidades experimentales presentando homogeneidad posible en parámetros, materiales y en el ambiente donde se llevó a cabo el experimento.

Figura 2. Diseño del experimento

TRATAMIENTOS

- C1: Tratamiento control
- A: Tratamiento con *Bacillus Subtilis* y *Bacillus Licheniformis*
A1(0,5g), A2(0,75g), A3(1,0g)
- B: Tratamiento con *Bacillus Subtilis*, *Bacillus Licheniformis* y *Lactobacillus acidophilus*
B1(0,5g), B2(0,75g), B3(1,0g)



5.4 Preparación de la unidad experimental

El agua utilizada para el experimento fue esterilizada en la autoclave durante 30 min con salinidades de 20 g/lit teniendo 27,1 de temperatura y un pH de 7,5 en todos los tratamientos.

5.4.1 Unidad experimental

La unidad experimental utilizada en la investigación está compuesta por catorce matraces balón de 500ml con una columna de agua de 300 ml con aireación constante durante 5 días. Para simular los nutrientes que presentan en cultivos de camarón *Litopenaeus vannamei* se suministró 10 ml de caldo soya tripticaseina 5 veces durante todo el experimento.

5.5 Tratamientos

Para el presente estudio se utilizó dos biorremediadores comerciales denominados producto (A y B). En el producto **A** esta conformado por una concentración de 1×10^{14} *Bacillus subtilis* UFC/g y 1×10^{14} UFC/g *Bacillus licheniformis* según las especificaciones del fabricante, comparada con el producto **B** que consta de una concentración de 3.3×10^7 UFC/g *Bacillus subtilis*, 8.8×10^7 UFC/g *Bacillus licheniformis* y 3.3×10^4 UFC/g *Lactobacillus acidophilus*.

5.6 Variables a medir

La Tabla 5 presenta las variables dependientes del experimento evaluadas en el agua para cada tratamiento.

Tabla 5. variables dependientes del experimento

Variable dependiente	Método de medición
Bacterias patógenas en el agua (<i>Vibrios</i>).	La carga de <i>Vibrios</i> en el agua (UFC/ml) son variables cuantitativas, por lo que, se determinaron a través de siembras microbiológicas utilizando agar selectivo (CHROMagar™ <i>Vibrio</i>).

5.6.1 Interpretación de los tratamientos

En la presente investigación se estudiaron parámetros fisicoquímicos del agua y las bacterias presentes en el medio de cultivo, por otra tanto, se utilizaron productos a base de *Bacillus subtilis* como principal característica en los dos biorremediadores comerciales obtenidos en el cantón Machala

En cada tratamiento se utilizó la relación de 1:1 dimensionando las concentraciones recomendadas de cada producto. Cada dosificación del producto se mantuvo en activación durante 24 horas llegando a tener en el tratamiento (A) 3×10^7 UFC/g y tratamiento (B) 3×10^6 UFC/g.

Tabla 6. Tratamientos y concentraciones

	Tratamiento A			Tratamiento B		
	A1	A2	A3	B1	B2	B3
Dosis (g)	0.5	0.75	1,0	0.5	0.75	1,0

5.7 Metodología

5.7.1 Obtención de bacterias patógenas (*Vibrio sp*)

La cepa patógena *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio alginolyticus* fue importada con la empresa Medibac.

5.7.2 Activación de los hisopos *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio parahaemolyticus*

El proceso de activación de los hisopos se realizaron en placas Petri con agar marino mediante la siembra por estrías incubadas durante 24 horas a una temperatura de 35°C. Previamente al bioensayo se masificó cada cepa con caldo marino (Difco™ marine Broth 2216) incubada por 48 horas a 35 °C.

5.7.3 Obtención de las curvas de absorbancia vs concentración de *Vibrios*

Para establecer de la curva de absorbancia, primero se realizó un cultivo masivo de *Vibrios*, en caldo Marino. El cultivo de bacterias se implementó en dos matraces una para cada cepa de *vibrio* de 500 ml con 250 ml de medio de cultivo, colocados en autoclave por 30 minutos a una temperatura de 121°C dejando reposar durante 15 minutos. Para la inoculación inicial de la cepa *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio alginolyticus* se activó los isopos colocando una pequeña muestra en cada caldo de cultivo dejando incubar durante 48 horas a una temperatura de 35°C.

Terminando el periodo de cultivo para cada cepa de *Vibrios*, se extrajo 12 ml del caldo marino transferidos en tubos falcón de 15 ml. Cada tubo se centrifugo durante 15 minutos a una velocidad de 8500 rpm. Al culminar el tiempo se retiró el sobrante de caldo agregando 10 ml de agua estéril al 2% para homogenizar la muestra. Este proceso se repitió 3 veces hasta obtener la cepa pura sin residuo de caldo. Para la lectura de turbidez los sólidos suspendidos se llevó a cabo diluciones de 1:10.

Para saber la concentración de bacterias a inocular se empleó un patrón de turbidez con el Kit estándar de Macfarland (N° 0.5, 1, 2, 3 y 4). Se midió la absorbancia y transmitancia de cada muestra del Kit, además se realizó la medición de los sólidos suspendidos de las muestras diluidas de cada cepa *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio alginolyticus* determinado la concentración de bacterias según el rango del kit de Macfarland.

5.7.4 Inoculación de cada cepa de Vibrios

En cada unidad experimental se colocó 3×10^5 de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio alginolyticus* en 300 ml.

5.7.5 Preparación de las bacterias

Se reactivó con una relación de 1:1 siendo para la primera concentración 0.5 ml de melaza, 0.5 g de bacteria y 500 ml de agua a una salinidad de 20 g/l de la misma forma para la concentración de 0.75 y 1 g en los dos tratamientos A y B, activadas durante 24 horas.

5.7.6 Aplicación de las bacterias en cada tratamiento

Durante todo el proceso de estudio se implementó una sola vez los biorremediadores, inoculados durante las 24 horas de la experimentación.

5.7.7 Recolección de muestra para su evaluación

Las muestras se recolectaron una vez al día cada 24 horas durante los 5 días de experimentación, recolectados en tubos Eppendorf de 2 ml PK/500. Además, al mismo tiempo se tomó parámetros como pH, temperatura, salinidad y sólidos disueltos.

5.7.8 Análisis microbiológico

En cada unidad experimental se realizaron análisis microbiológicos, extrayendo muestras de agua diaria durante 5 días, utilizando la técnica de muestras seriadas con diluciones sucesivas de 9:1 con una micropipeta de 1000 μ l (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) realizando siembras en placas en medios de cultivo CHROMagar™ Vibrio, colocando 100 μ l extraída de la muestra de agua previamente diluidas. Luego, fueron incubadas durante 24 horas a una temperatura de 35°C según las especificaciones del fabricante.

5.8 Procedimiento estadístico

Para conocer si existen o no diferencias significativas entre los dos biorremediadores y las diferentes concentraciones (A1-0,5 g, A2-0,75 g, A3-1,0 g y B1-0,5 g, B2-0,75 g, B3-1,0 g), en función de la prevalencia bacteriana patógena (*Vibrios*) en el agua, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de un factor intragrupo. Previamente se verificó el cumplimiento de los supuestos de normalidad de datos y homogeneidad de varianzas con la prueba post hoc.

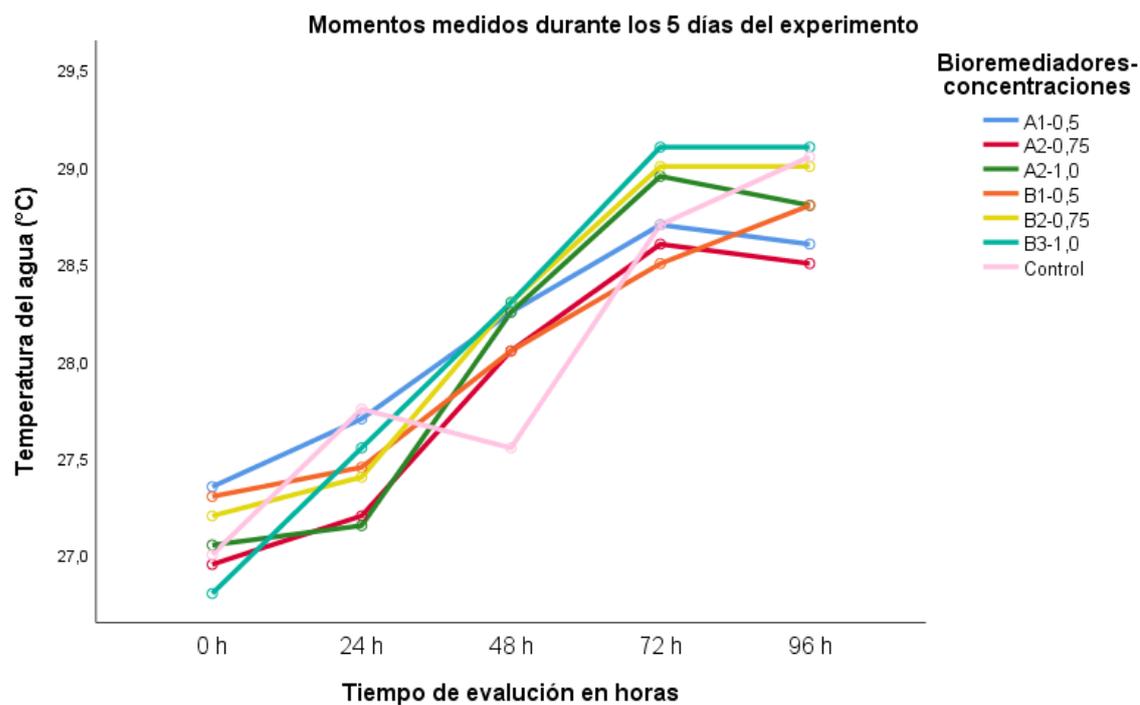
En caso de presentarse diferencias estadísticas entre tratamientos objeto de estudio, y con la finalidad de conocer dónde se encuentran las diferencias o similitudes, se aplicó la prueba de rangos y comparaciones múltiples de Duncan. En caso de no cumplir alguno de los supuestos del modelo paramétrico, se realizó el ANOVA de Kruskal-Wallis.

El procesamiento estadístico de los datos se realizará mediante un software estadístico SPSS versión 25 de prueba para Windows y con una confiabilidad de estimación del 95% ($\alpha=0,05$).

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

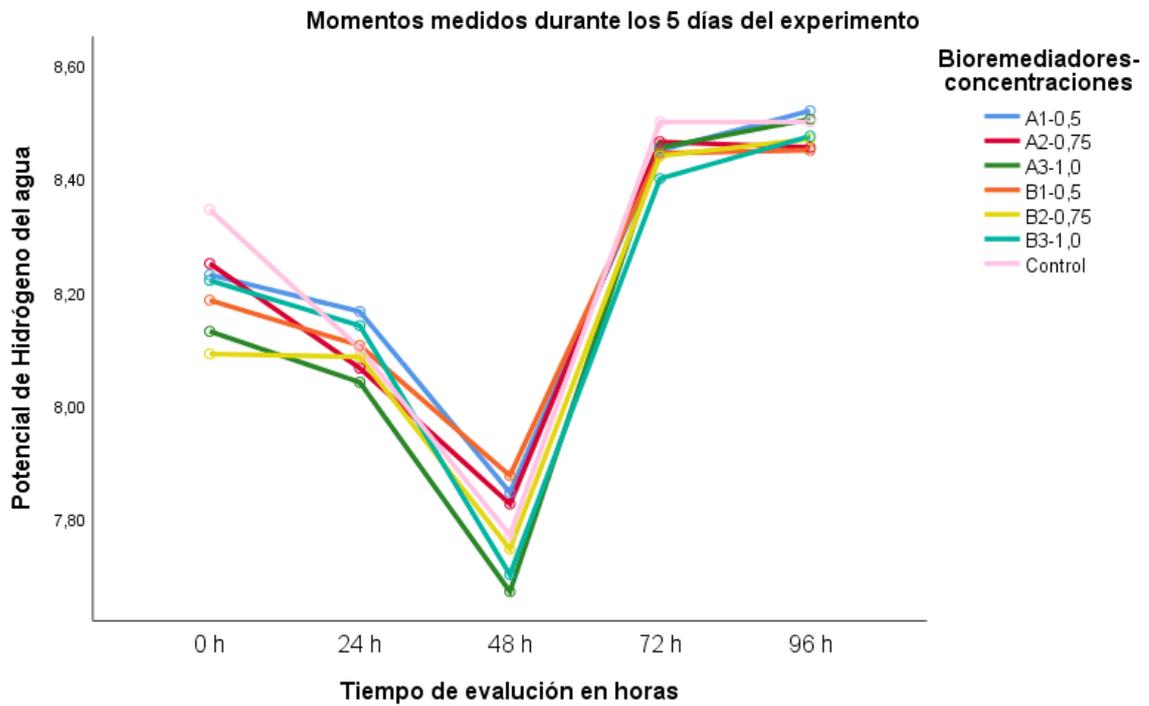
6.1 Comportamiento de las variables físico-químicos durante los 5 días del experimento

Figura 3. Comportamiento de la temperatura durante los 5 días del experimento



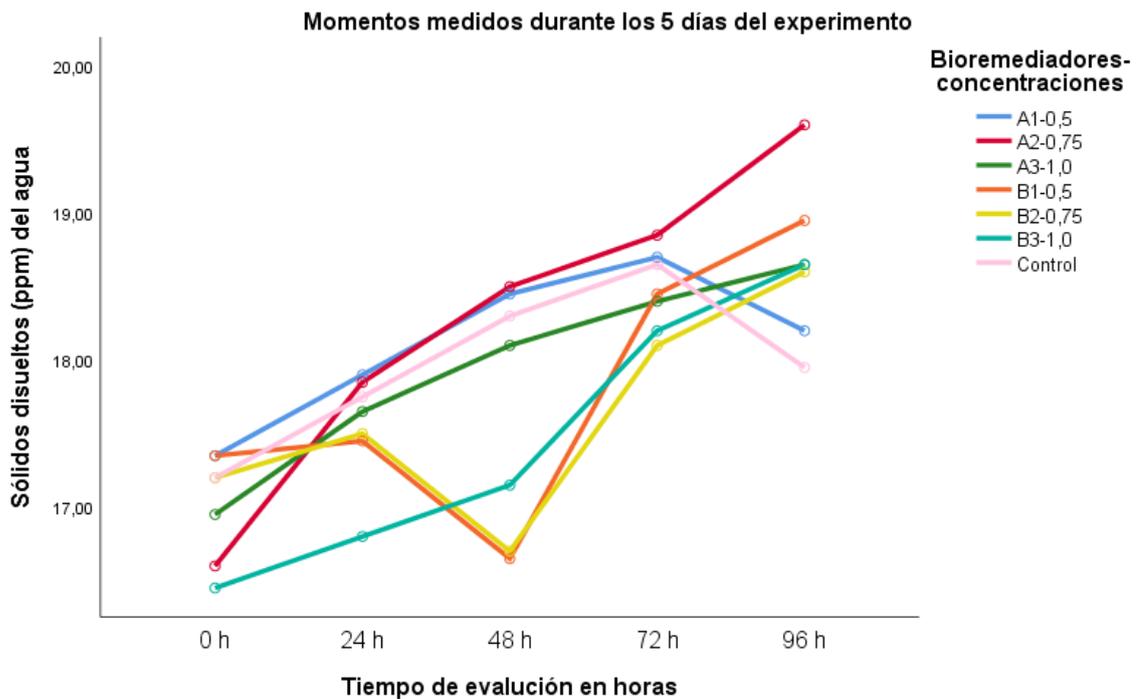
La **Figura 3** muestra que temperatura en el agua se mantuvo entre 27°C a 29°C durante todo el experimento siendo óptimo para mantener las bacterias presentes en el agua.

Figura 4. Comportamiento del pH en el agua durante todo el experimento



En la **Figura 4** se puede observar que el potencial de hidrogeno se mantuvo en un rango de 7 a 8 pH.

Figura 5. Comportamiento de la concentración de lo solidos disueltos en el agua



En la **Figura 5** se puede observar que los sólidos disueltos se mantuvieron en rangos de 16 a 20 ppm.

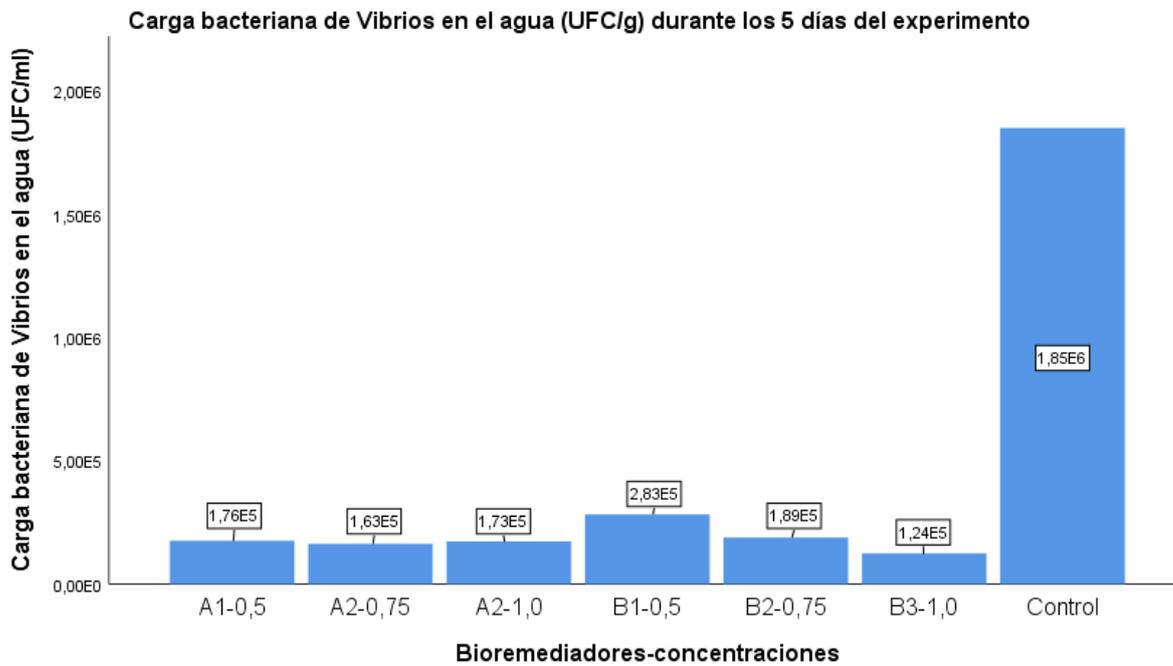
6.2 Interpretación general de los tratamientos durante los 5 días

Los resultados obtenidos en la prueba Duncan demuestran que la carga de *Vibrios* en el agua no presentan diferencias estadísticas significativas durante todo el experimento con un p-valor (**0,844**) siendo $<0,05$ por lo que, se acepta la hipótesis nula.

Tabla 7. Medias comparativas del *Vibrios* en el agua en los diferentes tiempos de evaluación

Bio-concentración	<i>Vibrios</i> en el agua (UFC/ml)					
	0h	24h	48h	72h	96h	Promedio
A1-0,5g	3,00E+05	3,00E+05	1,70E+05	7,30E+04	3,60E+04	1,76E+05
A2-0,75g	3,00E+05	2,75E+05	8,50E+04	3,55E+04	1,20E+05	1,63E+05
A3-1,0g	3,00E+05	2,55E+05	1,70E+05	1,05E+05	3,50E+04	1,73E+05
B1-0,5g	3,00E+05	4,70E+05	5,70E+05	3,95E+04	3,35E+04	2,83E+05
B2-0,75g	3,00E+05	4,95E+05	5,50E+04	4,60E+04	5,00E+04	1,89E+05
B3-1,0g	3,00E+05	1,30E+05	1,45E+05	1,55E+04	3,00E+04	1,24E+05
Control	3,00E+05	8,65E+06	2,05E+05	5,85E+04	3,40E+04	1,85E+06
p-valor	1,000	0,146	0,220	0,380	0,629	0,844

Figura 6. Comparación de las diferentes dosis de biorremediadores ante la presencia de *Vibrios* durante los 5 días.



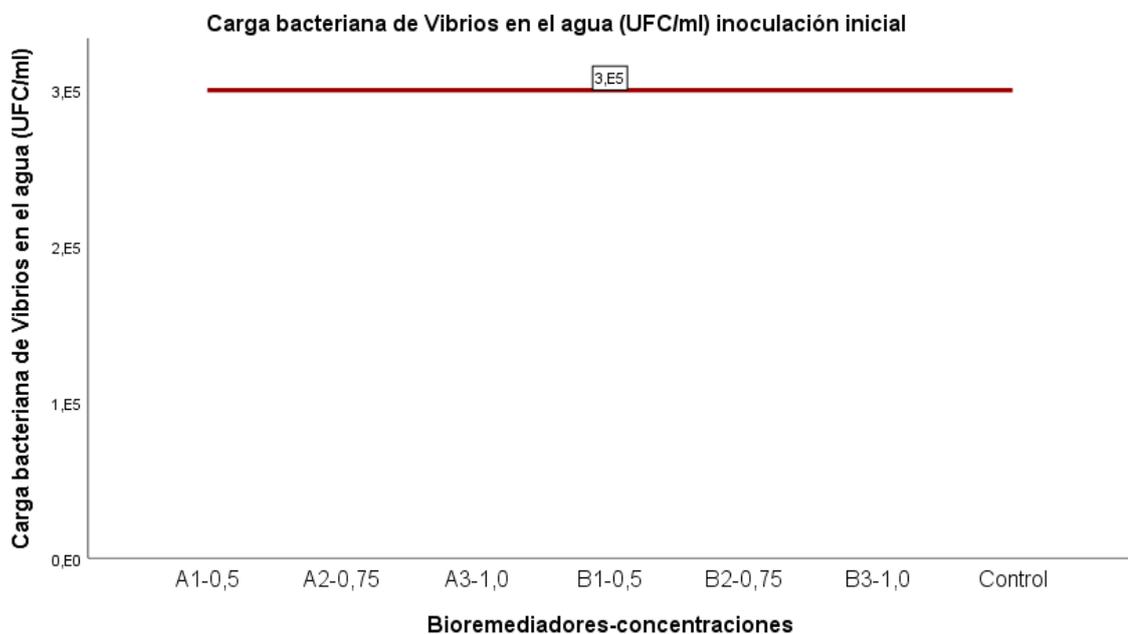
En la **Figura 6** muestra el efecto de los dos biorremediadores comerciales utilizados en diferentes concentraciones ante la presencia de *Vibrios* en el agua durante los 5 días del experimento. Se puede observar que en el tratamiento control ($1,8E+06$) se mantuvo en concentración alta en comparación del tratamiento (A1, A2, A3, B1, B2, B3). El tratamiento que mantuvo una concentración de (0.5g) comparada entre los biorremediadores comerciales, la cual el A1 ($1,76E+05$) termino con una concentración menor numéricamente en comparación al B1 ($2,83E+05$), mientras que el tratamiento de (0,75g) en A2 ($1,63E+05$) y B2 ($1,89E+05$) si hubo diferencias significativas numérica por lo que, la concentración suministrada solo mantiene la concentración de *Vibrios* en el agua mostrando que los recursos son limitados por la competencia de bacterias tanto como *Bacillus* y *Vibrios* en el medio. Sin embargo, en la concentración de (1g) en el tratamiento A3 ($1,73E+05$) si muestra diferencias numéricas al tener una concentración menor en B3 ($1,24E+05$) demostrando que entre los tratamientos si hubo disminución de *Vibrios* durante los 5 días que duró el experimento en comparación con el inicio que estuvo $3,0E+05$ UFC/ml. La concentración de bacterias beneficiosas al inicio del experimento fue de $3,0E+06$ UFC/ml por lo que se llegando a la conclusión que la actividad biológica, las condiciones de crecimiento y las interacciones con el entorno son posibles razones detrás de las diferencias observadas en la carga de *Vibrios*. Comparando con la

investigación realizada por Samani et al., (2016) menciona que las bacterias presentes en los tratamientos disminuyeron debido que los *Bacillus* utilizan el espacio y los nutrientes más que otras bacterias compitiendo entre ellos generando antibióticos disminuyendo los agentes patógenos en el medio (*Vibrios*). Por lo que la concretación de *Bacillus* en el agua al culminar la experimentación fue de $2,7E+10$ UFC/ml en el tratamiento B3 que obtuvo mejores resultados.

6.3 Interpretación de los tratamientos por horas

6.3.1 Carga de *Vibrios* en el agua a las 0 horas

Figura 7. Carga de *Vibrios* en el agua al inicio del experimento

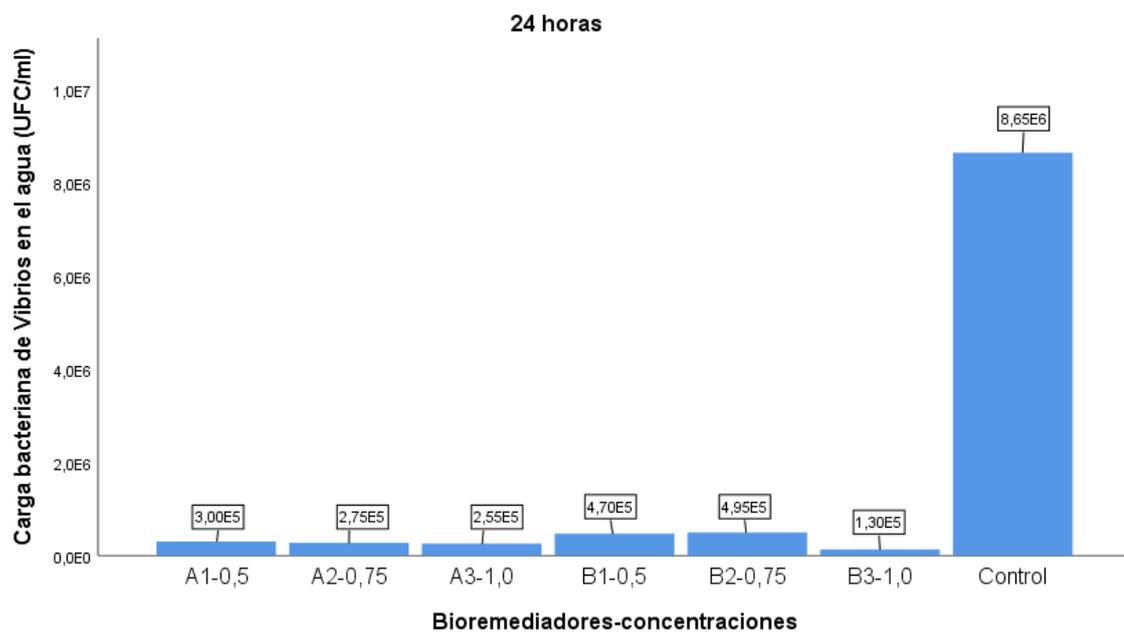


En la Figura 7 Muestra la carga de *Vibrio* al inicio del experimento dando un valor de $3,0E+05$ UFC/ml en todos los tratamientos (Control, A1, A2, A3, B1, B2, B3).

6.3.2 Carga de *Vibrios* durante las 24 horas

Los resultados obtenidos en la prueba Duncan demuestran que la carga de bacterias en el agua se mantuvo constante a lo largo de todo el experimento. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las diferentes dosis de tratamiento, ya que p-valor (0,146) es $<0,05$ por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Figura 8. Comparación de las diferentes dosis de biorremediadores ante la presencia de *Vibrios* durante las 24 horas

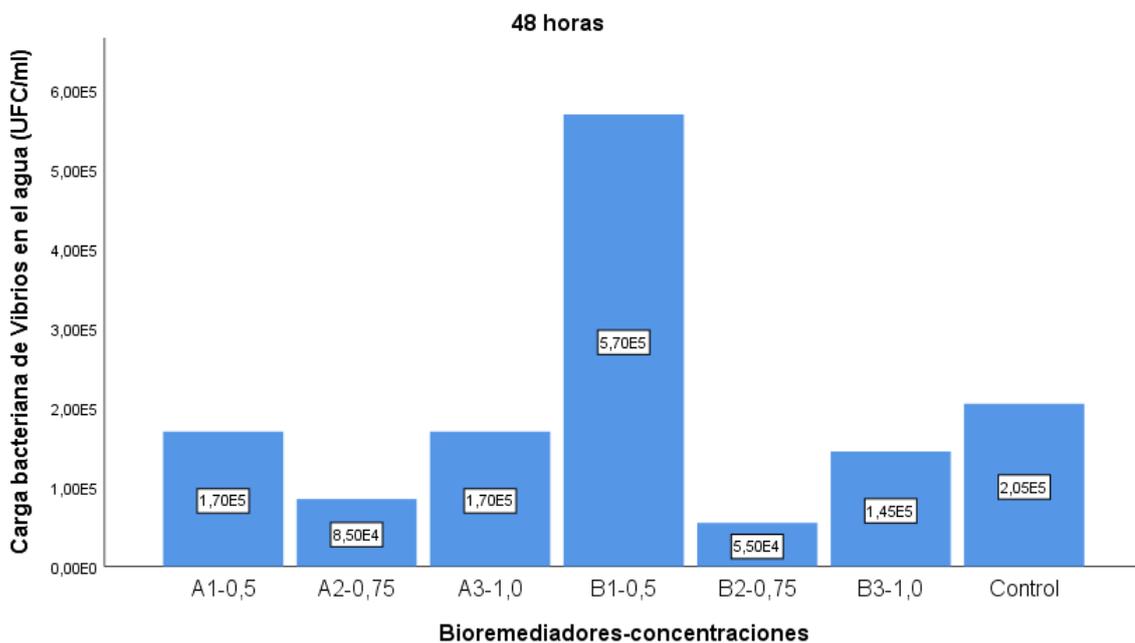


En la **Figura 8** muestra el efecto de los biorremediadores ante la presencia de *Vibrios* en el agua durante las 24 horas del experimento. Se observa que el tratamiento control se mantuvo en (8,65E+06 UFC/ml) siendo mayor en comparación de los tratamientos (A1, A2, A3, B1, B2, B3). Sin embargo, en el tratamiento A1 a una concentración de (0.5g), se mantuvo un valor de (3,00E+05 UFC/ml) en comparación al B1 (4,70E+05 UFC/ml) siendo A1 numéricamente menor, esto demuestra que, durante las 24 horas, el producto 1 es eficiente a la concentración inicial, Por otro lado, en el tratamiento A2 (2,75E+05 UFC/ml) y B2 (4,95E+05 UFC/ml), ambos con concentraciones de (0.75g), se observa que A2 es menor que B2 a lo largo de las 24 horas. Esto sugiere que la carga de *Bacillus* en el tratamiento A2 es adecuada durante el tiempo transcurrido, mientras que en el tratamiento de A3 (2,55E+05 UFC/ml) en comparación al tratamiento B3 (1,30E+05 UFC/ml), ambos con una concentración de (1g), demuestra que B3 es menor que A3, lo que indica que la concentración mencionada durante el transcurso de 24 horas es más eficiente. Esto sugiere que, durante este tiempo, los nutrientes en el medio son insuficientes para sustentar la carga de *Vibrio* y *Bacillus*. Concordando con Chen et al., (2014) menciona que el efecto de inhibidores de *Bacillus spp.* ante la presencia de *Vibrios* puede ser limitado por la alteración de pH y competencia de nutrientes esenciales para la producción de antimicrobiano.

6.3.3 Carga de *Vibrios* durante las 48 horas

Los resultados obtenidos en la prueba Duncan demuestran que la carga de bacterias *Vibrios* en el agua se mantuvo constante a lo largo de todo el experimento. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las diferentes dosis de tratamiento, ya que p-valor (0,220) es $<0,05$ por la cual se acepta la hipótesis nula.

Figura 9. Comparación de las diferentes dosis de biorremediadores ante la presencia de *Vibrios* durante las 48 horas



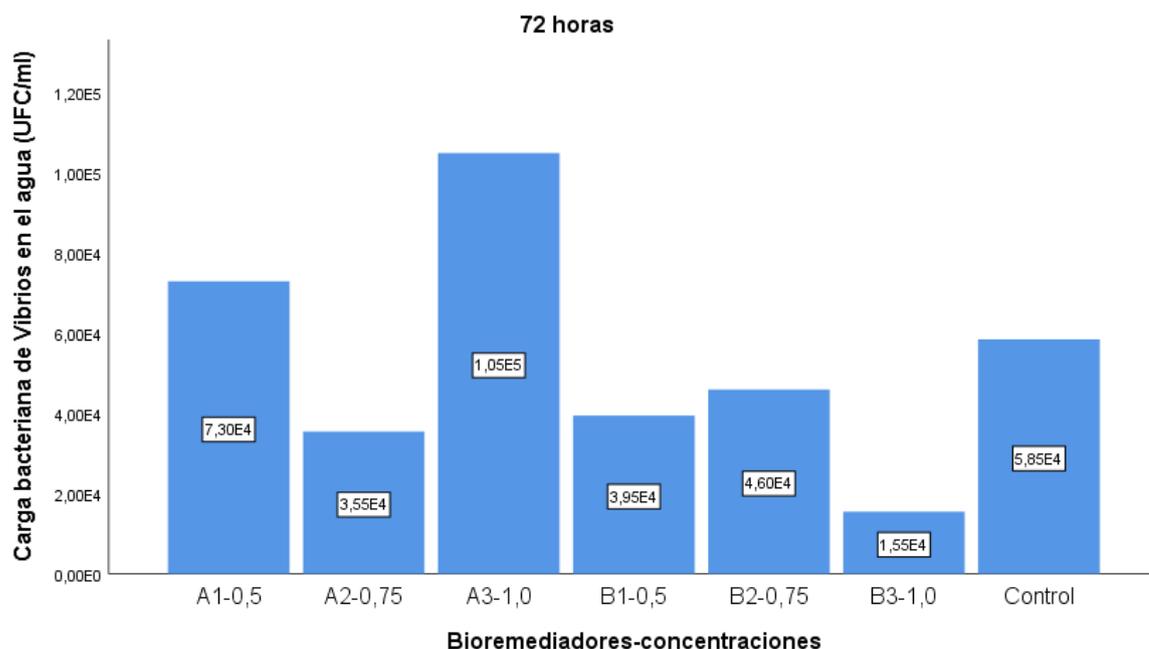
La **Figura 9** presenta los resultados obtenidos a lo largo de un período de 48 horas al evaluar el efecto de biorremediadores comerciales en la reducción de la carga de *Vibrio* en el agua. Se observa que en el tratamiento control mantuvo una concentración alta, con un valor de (2,05E+05 UFC/ml), demostrando que al tener ausencia de biorremediadores (*Bacillus*) no disminuye la carga de *Vibrios*, sin embargo, comparando al control de las 24 horas existe una disminución significativa por lo que hace referencia que los nutrientes presentes en el medio son limitados, por otro lado, al comparar con los tratamientos (A1, A2, A3, B1, B2, B3) se mantiene en concentraciones altas. En el tratamiento A1 (1,70E+05) y B1 (5,70E+05 UFC/ml) con concentraciones de (0,5g) si muestran diferencias numéricas por lo que A1 es menor que B1 siendo el producto 1 eficiente durante las 48 horas, mientras que en el tratamiento de (0,75g) A2 mostros un valor de (8,50E+04 UFC/ml) y B2 (5,50E+04 UFC/ml), se observa que B2 es menor que A2

significando que el producto B2 es más eficiente a la concentración de (0.75g) en comparación del tratamiento A1 y B1 que la reducción de *Vibrios* fue menor. En el caso del tratamiento A3 (1,70E+05 UFC/ml) y B3 (1,45E+05 UFC/ml) ambas con concentraciones de (1g) muestra que A3 fue ligeramente mayor al B3 esto sugiere que el tratamiento B3 fue más efectivo en la reducción de la carga de *Vibrios* en el agua en el período de tiempo transcurrido bajo las mismas condiciones, al presentarse una pequeña variación de temperatura y pH dan lugar a diferentes resultados, teniendo las mismas condiciones. Esto concuerda con lo indicado por Soltani et al., (2019) que el crecimiento de agentes patógeno es limitado por bacterias beneficiosas por la producción de antibacterianos individuales de metabolitos esenciales, por competencia de nutrientes, alteración de pH por la generación de ácido orgánicos y exclusión competitiva.

6.3.4 Carga de *Vibrios* durante las 72 horas

Los resultados obtenidos en la prueba Duncan demuestran que la carga de bacterias *Vibrios* en el agua se mantuvo constante a lo largo de todo el experimento. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, ya que p-valor (0,380) es <0,05, por la cual se acepta la hipótesis nula.

Figura 10. Comparación de las diferentes dosis de biorremediadores ante la presencia de *Vibrios* durante las 72 horas

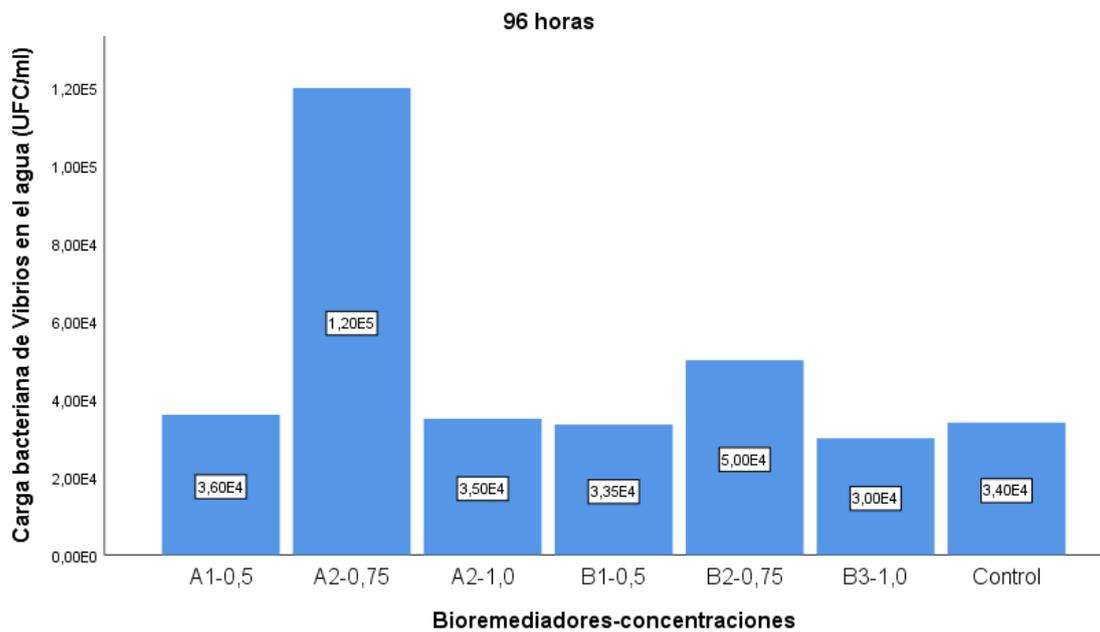


La **Figura 10** muestra los resultados obtenidos durante las 72 horas al evaluar el efecto de los biorremediadores comerciales en la reducción de *Vibrios* en el agua. El tratamiento control tiene un valor de (5,9E+04 UFC/ml), siendo menor en comparación con el tratamiento control de las 24 horas, sin embargo es menor numéricamente en comparación al valor de A1 (7,30E+04 UFC/ml) por lo que la falta de nutrientes en el agua son un limitante para mantener la carga de *Vibrios* en el tratamiento control, por otro lado en el A1 demuestra que el *Bacillus* presente en el medio no es suficiente para contrarrestar la carga de *Vibrio*, por lo contrario el control es mayor al tratamiento (A2,A3,B1,B2,B3), mientras que el A1 (7,3E+04 UFC/ml) en comparación de B1 (4,0E+04 UFC/ml) ambas en concentraciones de (0,5g) es mayor siendo más eficiente durante las 72 horas, no obstante al comparar con A1 y B1 de las 24 horas si mostro reducción en los dos tratamientos, mientras que A2 (3,6E+04 UFC/ml) y B2 (4,6E+04 UFC/ml) en concentraciones de (0,75g) siendo A2 menor a B2 demostrando que hay reducción al transcurso de las 72 horas. En el caso del tratamiento A3 (1,1E+05 UFC/ml) es mayor que B3 (1,6E+04) en concentraciones de (1g), por lo tanto, B3 redujo la carga de *Vibrios* sin embargo al comparar con los resultados de las 24 horas A3 no tuvo diferencia significativa al contrario del B3 que si disminuyo durante las 72 horas. Es importante destacar que la investigación realizada por Nayak, (2020) hace referencia que los *Bacillus* son eficaz para inhibir patógenos por medio de la exclusión competitiva, además demuestra que las bacterias pueden eliminar competitivamente el 61.81% y el 90% de reducción de los *Vibrios* y otras bacterias gram-negativas.

6.3.5 Carga de *Vibrios* durante las 96 horas

Los resultados obtenidos en la prueba Duncan en el transcurso de las 96 horas demuestran que la carga de bacterias *Vibrios* en el agua se mantuvo constante a lo largo de todo el experimento, además no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, ya que p-valor (0,629) es <0,05 por la cual, se acepta la hipótesis nula.

Figura 11. Comparación de las diferentes dosis de biorremediadores ante la presencia de *Vibrios* durante las 96 horas



En la **Figura 11** muestra lo resultado obtenido en el transcurso de las 96 horas evaluando el efecto de los biorremediadores comerciales en la reducción de *Vibrios* en el agua. Se puede observar en el tratamiento control un valor de (3,40E+04 UFC/ml), siendo menor numéricamente al control de las 72 horas debido a que la fuente de carbono es escasa a diferencia de los demás tratamientos, mientras en el tratamiento A1 (3,60E+04 UFC/ml) y B1 (3,35E+04 UFC/ml), ambas con concentraciones de (0,5g) no muestran diferencias significativas entre A1 y B1 mostrando reducción mínima durante las 96 horas en comparación a las 72 horas que si mostro diferencias siendo B1 menor que A1. El tratamiento A2 (1,20E+05 UFC/ml) es mayor la carga de Vibrio que B2 (5,00E+04 UFC/ml) ambas en concentraciones (0,75g), comparadas con las 72 horas B2 aumento la carga de *Vibrios* debido a que las bacterias gran positivas permanecen latente durante un perdido prolongado, mientras que en el tratamiento de A3 (3,50E+04 UFC/ml) y B3 (3,00E+04 UFC/ml) con concentraciones de (1g), B3 en menor que A3 sin embargo al comparar con el A3 y B3 de las 72 horas A3 redujo la concentración de Vibrio en el agua siendo diferente al B3 que subió la concentración demostrando que el producto 1 fue más eficiente durante las 96 horas en concentraciones de (1g) por lo que la falta de fuente de carbono y nutrientes presentes son un limitante en la prevalencia bacteria beneficiosa. Colaborando con lo descrito por Villarreal-Delgado et al., (2018) las bacterias tienen una

etapa exponencial siendo la fase inicial ya que se encuentran en condiciones favorables para su crecimiento, la segunda fase inicia por la presencia de estrés, densidades altas, ausencia de nutrientes y factores externos como: pH, temperatura, salinidades entre otros factores.

6.4 Identificación del mejor tratamiento durante los 96 horas transcurrido ante la presencia de *Vibrios*.

Tabla 8. Eficiencia de los biorremediadores A y B

Biorremediadores- concentraciones (g)	Concentración de <i>Vibrios</i> (UFC/ml)	% de eficiencia
B3-1,0	1,24E+05	58,67
A2-0,75	1,63E+05	45,67
A3-1,0	1,73E+05	42,33
A1-0,5	1,76E+05	41,33
B2-0,75	1,89E+05	37,00
B1-0,5	2,83E+05	5,67

Durante todo el proceso del experimento, se concluye que el tratamiento (B3) fue más efectivo con una concentración de 1g, teniendo una eficiencia del 58,67% siendo superior al biorremediador de (A3) teniendo ambas las mismas concentraciones.

7 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 Conclusiones

- La actividad del *Vibrio spp.* en el agua en los diferentes tiempos y dosis, aplicando consorcios bacterianos (*Bacillus*) de dos biorremediadores comerciales (A y B), mostro un decrecimiento constante significativo a nivel numérico durante todo el experimento.
- En los productos evaluados, se estableció que el mejor biorremediador alcanzo un porcentaje de eficiencia en la reducción de la carga bacteriana patógena *Vibrio* del 58,67%, siendo el tratamiento (B3) más eficiente durante los 5 días de experimentación.

7.2 Recomendaciones

- Para alcanzar una reducción mayor de patógenos y asegurar mejores resultados, se recomienda utilizar al menos dos veces los biorremediadores.
- Ampliar el tiempo de evaluación para obtener mejores resultados y demostrar hasta que tiempo llega hacer eficiente cada producto.
- Evaluar otros parámetros químicos que no se tomaron en cuenta en la investigación como: oxígeno, amonio, etc.

8 REFERENCIAS

- Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z., & Misganaw, W. (2017). The Role of Microorganisms in Bioremediation- A Review. *Open Journal of Environmental Biology*, 2(1), 038-046. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Zerihun-Tsegaye/publication/322065216_Open_Journal_of_Environmental_Biology_The_Role_of_Microorganisms_in_Bioremediation-A_Review/links/5a4209eeaca272d29456fd20/Open-Journal-of-Environmental-Biology-The-Role-of-Microor
- Altamirano, R. M. (2018). *Efecto de la temperatura sobre la susceptibilidad del camarón blanco*. [Tesis de Licenciatura], (ESPOL). Obtenido de <https://www.dspace.espol.edu.ec/retrieve/4a39c4e3-cd2d-49e0-b8a5-ed7f3420cb13/D-76636.pdf>
- Alvarado Caballero , K., & Aveiga Cortez, S. (2016). *Evaluación de Bacillus subtilis como potencial probiótico en camarón blanco (Penaeus vannamei) en etapa de post larva en Choluteca*. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano . Obtenido de <http://hdl.handle.net/11036/5891>
- Armijos Suárez, M., Macuy Calle, J., Mayorga Quinteros, E., Rodriguez Valencia, L., & Clavijo Basantes, M. (2015). Análisis del impacto económico de la aplicación del decreto n° 1391 en la regularización de la industria acuícola camaronera del Ecuador. *Revista Ciencia UNEMI*, 8(16), 11-20. Retrieved from <https://repositorio.unemi.edu.ec/bitstream/123456789/3101/1/AN%c3%81LISIS%20DEL%20IMPACTO%20ECON%c3%93MICO%20DE%20LA%20APLICACI%c3%93N%20DEL%20DECRETO%20N%c2%ba%201391%20EN%20LA%20REGULARIZACI%c3%93N%20DE%20LA%20INDUSTRIA%20ACU%c3%8dCOLA%20CAMARONERA%20DE>
- Briones-Pérez, E., Hernández-Acosta, E., Leal-Mendoza, A. I., & Calvario-Rivera, C. I. (2017, Octubre). La calidad del agua en diferentes unidades de producción acuícola de Tlaxcala, México. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 4(5), 40-80. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Elizabeth-Acosta-2/publication/320624258_La_calidad_del_agua_en_diferentes_unidades_de_pro

duccion_acuicola_de_Tlaxcala_Mexico/links/5d8d1376299bf10cff12b43d/La-
calidad-del-agua-en-diferentes-unidades-de-produccion-acui

- Carbajal Hernández, J. J., Sánchez Fernández, L. P., & Aguilera Larrañaga, L. A. (2015). Diseño y construcción de un sistema de supervisión para la evaluación de la calidad del agua en sistemas de cultivo de camarón. *Revista Pistas Educativas*, 36(112). Retrieved from <http://www.itc.mx/ojs/index.php/pistas/article/view/449/436>
- Castro Castro, I. M., & Lagos Moreno, L. A. (2022). *Análisis in vitro del efecto de insumos acuícolas sobre la*. Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil. Retrieved from <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/52736/1/T-76764%20Castro%20Castro.pdf>
- Castro Castro, I., Lagos Moreno, L., & Burgos, F. (2022). *CASTRO CASTRO, Ivonne Michelle, et al. Análisis in vitro del efecto de insumos acuícolas sobre la abundancia de Vibrio parahaemolyticus durante la preparación de piscinas*. [Doctoral dissertation], ESPOL. Retrieved from <https://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/52736>
- Chatvijitkul, S., Boyd, C. E., Davis, D. A., & McNevin, A. A. (2017, Agosto 1). Pollution potential indicators for feed-based fish and shrimp culture. *Revista ScienceDirect*, 477(1), 43-49. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.034>
- Chen, Y., Li, J., Xiao, P., Zhu, W., & Mo, Z. (2014). The ability of marine *Bacillus* spp. isolated from fish gastrointestinal tract and culture pond sediment to inhibit growth of aquatic pathogenic bacteria. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15(2), 701-714. Retrieved from <http://jifro.ir/article-1-2206-fa.pdf>
- Colorado Gómez, M. A., & Ospina Correa, M. (2019). *La acuaponía como herramienta de formación en tiempos de paz*. Centro de Biotecnología Agropecuaria, Colombia. Retrieved from https://repositorio.sena.edu.co/bitstream/handle/11404/5555/acuaponia_como_herramienta_de_formaci%C3%B3n.pdf?sequence=3

- Colorado Gómez, M. A., & Ospina Correa, M. (2019). La Acuaponía como herramienta de formación en tiempos de paz”. *Revista Centro de Biotecnología Agropecuaria*, 65-66.
- Curbelo Hernández, C., & Palacio Dubois, Y. (2021). Tratamiento químico de residuos de camarón para la obtención de quitina. *Revista Scielo*, 48(2), 103-116. Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/caz/v48n2/2223-4861-caz-48-02-103.pdf>
- Díaz, F., & López, R. (1993). El cultivo de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) y de la cachama negra (*Colossoma macropomum*). *Fundamentos de Acuicultura Continental. Ministerio de Agricultura, Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (INPA)*., 207-219.
- Gutiérrez, J., & Aguilera B., A. (2015). Calidad de agua en la producción de smolt. *Revista Salmonexpert*, 5, 28-36. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/281463529_Calidad_de_agua_en_la_produccion_de_smolt
- Gutiérrez, M. O. (2018). *Prototipo para el monitoreo automatizado de parámetros de calidad del agua en una granja de camarón*. Instituto Tecnológico de Colima. Retrieved from <https://dspace.colima.tecnm.mx/bitstream/handle/123456789/1238/TESIS%20M AURICIO%20OLIVO%20GUTIERREZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Hassan, M., Fathallah, M., Elzoghby, M., Salem, M., & Helmy, M. (2022). Influence of probiotics on water quality in intensified *Litopenaeus vannamei* ponds under minimum-water exchange. *AMB Express*, 12(1), 22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13568-022-01370-5>
- Jahangiri , L., & Esteban , M. (2018). Administration of Probiotics in the Water in Finfish Aquaculture Systems: A Review. *Fishes*, 3(3), 33. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/fishes3030033>
- Jasmin, M. Y., Syukri, F., Kamarudin, M. S., & Karim, M. (30 de March de 2020). Potential of bioremediation in treating aquaculture sludge: Review article. *Revista Acuicultura*, 519, 734905. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734905>

- Juárez-Rosales, J., Ponce-Palafox, J. T., & Román-Gutiérrez, A. D. (2021, Noviembre). Factores técnicos del manejo de la calidad agua y sedimento en policultivo camarón-tilapia en estanques. *MVZ Córdoba*, 27(1). Retrieved from <https://revistamvz.unicordoba.edu.co/article/view/e2147/3583>
- 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>
- Luis, C. F. (1 de Septiembre de 2021). *Análisis comparativo de dos bacterias (Pro 4000x y Hgs7) utilizadas en procesos de biorremediación en las piscinas del cultivo de Litopenaeus vannamei de la empresa acuícola San Andrés (El Oro)*. [Examen complejo], Universidad Católica de Santiago de Guayaquil. Obtenido de <http://repositorio.ucsg.edu.ec/bitstream/3317/17185/1/T-UCSG-PRE-TEC-AGRO-180.pdf>
- Maury, C. P. (2019). *Impacto ambiental de la acuicultura en jaulas en los componentes agua y sedimentos en el embalse del Guajaro departamento del Atlántico*. Universidad de manizales. Obtenido de <https://ridum.umanizales.edu.co/bitstream/handle/20.500.12746/4075/TESIS%20%20CLAUDIA%20PATRICIA%20URBANO%20MAURY%20.pdf?sequence=2&isAllowed>
- Méndez Martínez, Y., Morales Torres, M., Reyes Pérez, J. J., Cárdenas Zea, M. P., Carranza Patiño, M. S., & Rivas Salas, S. (2021). Análisis de la pertinencia de la maestría en acuicultura en la universidad técnica estatal de quevedo, ecuador. *Revista Universidad y Sociedad*, 13(53), 467-476. Retrieved from <https://rus.ucf.edu.cu/index.php/rus/article/view/2506>
- Montenegro Gómez, S. P., Pulido, S. Y., & Calderón Vallejo, L. F. (2019). Prácticas de biorremediación en suelos y aguas. *Escuela de Ciencias Agrícolas Pecuarias y del Medio Ambiente*(1), 14-23. <https://doi.org/https://doi.org/10.22490/notas.3451>
- Mozombite, J. A. (2019). *Efecto de las diferentes concentraciones de microorganismos eficaces en la mejora de la calidad de agua de estanques en Ucayali, Amazonia*

- Peruana*, 2017. Perú. Retrieved from http://repositorio.unia.edu.pe/bitstream/unia/197/1/T084_70749101_T.pdf
- Murasa , A., Romero, M., Mayera , 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 Álava, J., Aguilar, P. N., & Delgado Villafuert, C. (29 de Abril de 2022). Biorremediación de efluentes del cultivo de camarón por medio de consorcios microbianos autóctonos y microalgas nativas en Manabí, Ecuador. *Revista AquaTechnica*, 4(1), 53-65. <https://doi.org/10.5281/zenodo.6536004> 10.5281
- Nayak, S. K. (2020, September 27). Multifaceted applications of probiotic *Bacillus* species in aquaculture with special reference to *Bacillus subtilis*. *Reviews 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(3), 427-435. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00203-019-01757-2>
- Polania Janzasoy, A. V., & Calderón-Vallejo, L. F. (26 de Febrero de 2018). Evaluación De Una Estrategia Centralizada Y Una Descentralizada Para El Control De Contaminación En Cuerpos Hídricos. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(1), 146-156. <https://doi.org/https://doi.org/10.22490/21456453.2077>
- Quintanilla Corena, A., & Castro Miranda, J. d. (2022). *Estudio de la calidad del agua e implementación de un protocolo de buenas prácticas acuícolas en la producción de camarón marino: en asocio con cooperativa camaronera Eben Ezer, San Alejo, La Unión*. ITCA Editores. Retrieved from <http://redicces.org.sv/jspui/handle/10972/4525>
- Ramírez, L. Á. (2015). *Diagnóstico de la calidad microbiológica del agua durante un ciclo de cultivo de camarón marino del grupo de cooperativas del sector el zompopero, bahía de jiquilisco, usulután*. Escuela especializada en ingeniería ITCA. ITCA Editores. Obtenido de

<http://redicces.org.sv/jspui/bitstream/10972/2671/1/13%20Acuicultura%202014.pdf>

- Ren, W., Wu, H., Guo, C., Xue, B., Long, H., Zhang, X., . . . Xie, Z. (2021). Multi-Strain Tropical *Bacillus* spp. as a Potential Probiotic Biocontrol Agent for Large-Scale Enhancement of Mariculture Water Quality. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 699378. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.699378>
- Roblez, A. M. (2020). *Biorremediación de agua contaminada con cadmio aplicando el producto decon®*. [Trabajo de Titulación]. Guayaquil: Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil. Obtenido de <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/48722>
- Romo Toledano , J. H., & Chilpa Navarrete, A. (2017, Junio 15). Eliminación de dureza del agua por medio de aireación. Caso de estudio. *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química*(3), 11. Retrieved from http://zaloamati.azc.uam.mx/bitstream/handle/11191/8337/Eliminacion_de_dureza_del_agua_2017.pdf?sequence=1
- Safitri, R., Priadie, B., Miranti, M., & Astuti, A. W. (2015). Anility of bacterial consortium: *Bacillus coagulans*, *Bacilus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Nitrosomonas* sp. and *Pseudomonas putida* in bioremediation of waste water in cisirung waste water treatment plant. *Revista científica AgroLife*, *4*(1), 146-152. Retrieved from https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/87750847/Art22-libre.pdf?1655682631=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DABILITY_OF_BACTERIAL_CONSORTIUM_Bacillus.pdf&Expires=1675747453&Signature=SWOVkef083RfwXpXq2zCK9HIAo9RMu4Tvx-TsU5tKOun6z~tVcNp1VQj
- Samani, M., Jafaryan, H., Gholipour, H., Harsij, M., & Farhangi, M. (2016). Effect of different concentration of profitable *Bacillus* on Biorremediation of common carp (*Cyprinus carpio*) pond discharge. *Sustainable Aquaculture and Health Management Journal*, *2*(2), 44-54. Retrieved from <https://ijaah.ir/article-1-122-en.pdf>
- Solís-Castro, Y., Zúñiga-Zúñiga, L. A., & Mora-Alvarado, D. (2018, M). La conductividad como parámetro predictivo de la dureza del agua en pozos y

nacientes de Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha*, 31(1), 35-46.
<https://doi.org/10.18845/tm.v31i1.3495>

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.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1597010>

Toledo, A., Castillo, N., Carrillo, O., & Arenal, A. (2018). Probióticos: una realidad en el cultivo de camarones. Artículo de revisión. *Revista de Producción Animal*, 30(2), 57-71. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-79202018000200009

Ullsco Azuero, E. S., Garzón Montealegre, V. J., Quezada Campoverde, J. M., & Barrezueta Unda, S. (Junio de 2021). Análisis del comportamiento económico de la exportación en el sector camaronero en el Ecuador, periodo 2015- 2019. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 4(51), 112-119. Obtenido de <http://remca.umet.edu.ec/index.php/REMCA/article/view/418/438>

Villarreal-Delgado, M., Villa-Rodríguez, E., Cira-Chávez, L., Estrada-Alvarado, M., Parra-Cota, F., & Santos-Villalobos, S. (2018). El género Bacillus como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Scielo*, 36(1).
<https://doi.org/https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>

9 ANEXOS

Anexo 1 Activación de los hisopos de *V. parahemolyticus* y *V. alginolyticus*



Anexo 2 Replicación de las cepas de *Vibrios*



Anexo 3 Inoculación de las cepas de *Vibrios* en cada unidad experimental



Anexo 4 Inoculación de los biorremedidores comerciales en cada unidad experimental



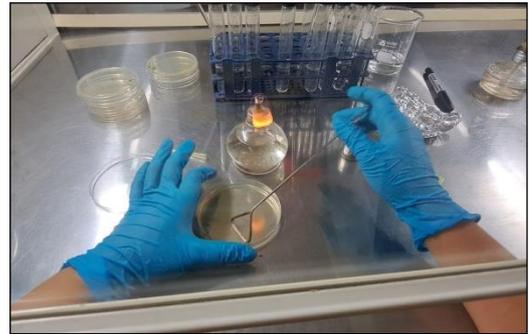
Anexo 5 Toma de parámetros (pH, Temperatura, sólidos disueltos)



Anexo 6 Recolección de muestras de agua



Anexo 7 Siembras microbiológicas de *Vibrios*



Anexo 8 Placas de *Vibrios* en los diferentes tratamientos

