



**UTMACH**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE ACUICULTURA**

**Evaluación de la biostimulación del floc bacteriano  
presente en suelos acuícolas de baja salinidad para  
tratamiento de materia orgánica.**

**RAMIREZ LOAIZA JUSTIN RODRIGO  
INGENIERO ACUICOLA**

**RAMÍREZ SOLANO KEVIN MAXIMO  
INGENIERO ACUICOLA**

**MACHALA  
2024**



**UTMACH**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE ACUICULTURA**

**Evaluación de la biostimulación del floc bacteriano  
presente en suelos acuícolas de baja salinidad para  
tratamiento de materia orgánica.**

**RAMIREZ LOAIZA JUSTIN RODRIGO  
INGENIERO ACUICOLA**

**RAMÍREZ SOLANO KEVIN MAXIMO  
INGENIERO ACUICOLA**

**MACHALA  
2024**



**UTMACH**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE ACUICULTURA**

**PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN**

**Evaluación de la biostimulación del floc bacteriano  
presente en suelos acuícolas de baja salinidad para  
tratamiento de materia orgánica.**

**RAMIREZ LOAIZA JUSTIN RODRIGO  
INGENIERO ACUICOLA**

**RAMÍREZ SOLANO KEVIN MAXIMO  
INGENIERO ACUICOLA**

**SORROZA OCHOA LITA SCARLETT**

**MACHALA  
2024**

# Tesis Final R&R

---

## INFORME DE ORIGINALIDAD

---

6%

INDICE DE SIMILITUD

6%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL  
ESTUDIANTE

---

## FUENTES PRIMARIAS

---

1	<a href="https://downloads.hindawi.com">downloads.hindawi.com</a> Fuente de Internet	1%
2	<a href="http://www.congreso.mesoamericano.unach.mx">www.congreso.mesoamericano.unach.mx</a> Fuente de Internet	<1%
3	<a href="http://www.cna-ecuador.com">www.cna-ecuador.com</a> Fuente de Internet	<1%
4	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	<1%
5	Submitted to Macquarie University Trabajo del estudiante	<1%
6	<a href="http://dspace.esPOCH.edu.ec">dspace.esPOCH.edu.ec</a> Fuente de Internet	<1%
7	<a href="http://www.mcnabbraeside.com">www.mcnabbraeside.com</a> Fuente de Internet	<1%
8	<a href="http://colposdigital.colpos.mx:8080">colposdigital.colpos.mx:8080</a> Fuente de Internet	<1%
9	<a href="http://repositorio.unsch.edu.pe">repositorio.unsch.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1%

---

10	<a href="http://uvb.nrel.colostate.edu">uvb.nrel.colostate.edu</a> Fuente de Internet	<1 %
11	<a href="http://www.researchgate.net">www.researchgate.net</a> Fuente de Internet	<1 %
12	Submitted to Universidad Técnica de Machala Trabajo del estudiante	<1 %
13	<a href="http://idus.us.es">idus.us.es</a> Fuente de Internet	<1 %
14	<a href="http://doczz.es">doczz.es</a> Fuente de Internet	<1 %
15	Submitted to unia Trabajo del estudiante	<1 %
16	<a href="http://www.fontagro.org">www.fontagro.org</a> Fuente de Internet	<1 %
17	Daniel A. Jacobo-Velázquez, Gerardo Castellanos-Dohnal, Porfirio Caballero-Mata, Carmen Hernández-Brenes. "Cambios bioquímicos durante el almacenamiento de puré de aguacate adicionado con antioxidantes naturales y procesado con alta presión hidrostática", CyTA - Journal of Food, 2013 Publicación	<1 %
18	Submitted to IED Barcelona Trabajo del estudiante	<1 %

19	Submitted to Universidad Privada Antenor Orrego Trabajo del estudiante	<1 %
20	de.slideshare.net Fuente de Internet	<1 %
21	es.scribd.com Fuente de Internet	<1 %
22	mascapacitacioncrudosymarinados.wordpress.com Fuente de Internet	<1 %
23	repositorio.unheval.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
24	vsip.info Fuente de Internet	<1 %
25	D Valdés, E Real. "Ammonium, nitrite, nitrate and phosphate fluxes across the sediment-water interface in a tropical lagoon", Ciencias Marinas, 1994 Publicación	<1 %
26	agris.fao.org Fuente de Internet	<1 %
27	cmc.ihmc.us Fuente de Internet	<1 %
28	www.belt.es Fuente de Internet	<1 %

29

Fuente de Internet

<1 %

---

30

documentop.com

Fuente de Internet

<1 %

---

31

www.aqualex.org

Fuente de Internet

<1 %

---

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

Apagado

Excluir bibliografía

Activo

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

Los que suscriben, RAMIREZ LOAIZA JUSTIN RODRIGO y RAMÍREZ SOLANO KEVIN MAXIMO, en calidad de autores del siguiente trabajo escrito titulado Evaluación de la biostimulación del floc bacteriano presente en suelos acuícolas de baja salinidad para tratamiento de materia orgánica., otorgan 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 tienen potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

Los autores declaran 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.

Los autores como garantes de la autoría de la obra y en relación a la misma, declaran que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asumen 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.



RAMIREZ LOAIZA JUSTIN RODRIGO

0705268522



RAMÍREZ SOLANO KEVIN MAXIMO

0706421443

## **Agradecimientos.**

Quiero agradecer a mis padres, Rodrigo Ramirez y Martha Loaiza, a mi tía Itamar Loaiza y hermano Santiago Ramirez 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 mi compañero de tesis Kevin Ramirez y los grandes amigos que me dio la carrera y que los puedo considerar mi segunda familia ya que brindaron su ayuda, confianza y su valiosa amistad en todos estos años. Que las aventuras que vivimos serán los más preciados recuerdos que tengo de ustedes y esperando las nuevas que vendrán en esta nueva etapa. Asimismo, quiero agradecer a mi tutora la Dra. Lita Sorroza que gracias a su apoyo, consejo y guía en el presente trabajo se pudo desarrollar de la mejor manera posible, al Ing. Irán Rodríguez, Dr. Patricio Rentería, Sr. Patricio Espinoza y a los especialistas Biolg. Milton Cun, Dra. Leonor Rivera y Ing. Acuac. Edison Echeverria 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, Dr. Mario Loayza y Ing. Lenin Chuquisala que gracias a su indispensable ayuda se logró realizar el proceso experimental sin ningún inconveniente.

Finalmente, agradezco al Sr. Patricio Pardo por su ayuda incondicional durante la tesis y él apoya brindado a lo largo de todos estos años de estudio, al igual que al Ing. Miguel Aguilar que me brindo su ayuda durante mi etapa estudiantil.

*Justin Rodrigo Ramirez Loaiza*

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que, de una u otra forma, contribuyeron a la realización de esta tesis, en primer lugar, quiero agradecer profundamente a mis padres, Kelvis Ramírez y Margoth Solano, a mi hermana Lissette Ramírez, por su amor incondicional, sus sacrificios y su constante aliento han sido la base sobre la que se asienta este logro, han sido mi pilar de fuerza y motivación, y esta meta alcanzada es tan suya como mía.

A mis compañeros de curso, quienes compartieron conmigo los desafíos y alegrías del camino académico, sus palabras de aliento y apoyo hicieron que los momentos difíciles fueran más llevaderos, en especial a Diana, Nayeli y Rommel, por brindarme momentos de distracción y alegría que me ayudaron a mantener el equilibrio entre el estudio y la vida personal.

A mi tutora, Dra. Lita Sorroza, por su invaluable guía, paciencia y constante apoyo a lo largo de todo el proceso, a los especialistas Biolg. Milton Cun, Dra. Leonor Rivera y Ing. Acuac. Edison Echeverria que contribuyeron con su asesoría y conocimientos técnicos, brindándome la claridad y dirección necesarias en momentos cruciales. También quiero extender mi agradecimiento a la Facultad de Ciencias Agropecuarias por brindarme la oportunidad de formarme y desarrollarme como profesional. Además, expreso mi profunda gratitud a la Ing. Ivanna Tuz, Ing. Karen Miranda, Dr. Mario Loayza y Ing. Lenin Chuquisala, cuya invaluable ayuda fue esencial para llevar a cabo el proceso experimental sin contratiempos.

Finalmente, agradezco al Sr. Patricio Pardo por brindarnos las muestras e insumos, lo cual permitió su uso en esta investigación.

*Kevin Máximo Ramirez Solano*

## **Dedicatoria**

*Este trabajo va dedicado a mis padres, Rodrigo Ramirez y Martha Loaiza, a mi tía Itamar Loaiza y hermano Santiago Ramirez. Lo que fui, lo que soy y lo que seré ha sido gracias a ustedes, a mi gran amigo de la infancia Víctor Andres (+), sé que nos veremos algún día en algún lugar por lo que espero que estas pocas palabras contengan el espíritu de su intención y sobre todo a ti Noelia Veglio que eres la personas que más quiero y aprecio en este mundo, gracias por ser mi apoyo y acompañarme en los momentos difíciles todos estos años.*

*Justin Rodrigo Ramirez Loaiza*

*Este trabajo va dedicado a mis padres y a mi hermana.  
Cada paso que he dado y cada éxito alcanzado son resultado de su apoyo y guía.*

*Kevin Máximo Ramirez Solano*

## **Resumen.**

La alta producción acuícola genera acumulación de sedimentos y materia orgánica en los fondos, propiciando compuestos nitrogenados tóxicos y microorganismos perjudiciales como el *Vibrio*. Para abordar este problema, se han desarrollado bioestimuladores y bioaumentadores. La bioestimulación, menos intrusiva, aprovecha microorganismos nativos como el *Bacillus* para controlar la materia orgánica en entornos de baja salinidad. Se requieren productos que proporcionen nutrientes y carbono para aumentar la biomasa bacteriana y facilitar la biorremediación. Esta investigación bioestimula el floc bacteriano en suelos acuícolas de baja salinidad mediante la aplicación de nutrientes, midiendo la efectividad de las bacterias nativas que se encuentran en el sedimento, como alternativa a productos comerciales, cuya eficacia no siempre está garantizada en todos los escenarios de producción acuícola.

Este experimento es completamente al azar conformado por 12 bandejas plásticas y tres diferentes tratamientos (SiCa, Melaza y SiCa + Melaza), con un tratamiento control (0) al que no se le aplicaba nada. El experimento tuvo una duración de 28 días, para determinar la carga de *Bacillus* spp. y *Vibrio* sp., después de la bioestimulación se determinó mediante siembra en placa con diluciones sucesivas y para determinar la carga de materia orgánica obtenida después de haber bioestimulado el floc bacteriano se usó el método de Walkley & Black.

Los resultados obtenidos del experimento, lograron determinar una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos siendo el tratamiento 3 (SiCa + Melaza) que presentó una mayor carga de *Bacillus* con respecto al tratamiento control y una reducción a la carga de *Vibrio*, además que logró evidenciar una reducción considerable de la materia orgánica presente ya que de 4,25% el Tratamiento 3 logró obtener un valor de 0,23%. Concluyendo que la bioestimulación puede ser usada para bioestimular el floc bacteriano nativo en suelos acuícola de baja salinidad para el tratamiento de materia orgánica.

Palabras claves : Acuicultura, Bioestimulación, *Bacillus*, *Vibrio* y Materia orgánica

## ABSTRACT

High aquaculture production leads to the accumulation of sediments and organic matter on the bottom, resulting in toxic nitrogen compounds and harmful microorganisms such as *Vibrio*. Biostimulants and biosurfactants have been developed to address this problem. Biostimulation, which is less intrusive, uses native microorganisms such as *Bacillus* to control organic matter in low salinity environments. Products that provide nutrients and carbon are needed to increase bacterial biomass and facilitate bioremediation. This research biostimulates bacterial floc in low salinity aquaculture soils through the application of nutrients, measuring the effectiveness of native bacteria found in the sediment, as an alternative to commercial products, whose effectiveness is not always guaranteed in all aquaculture production scenarios.

In a completely randomized experiment consisting of 12 plastic trays, three different treatments (SiCa, Molasses and SiCa + Molasses) and a control treatment (0) to which nothing was applied. The experiment lasted for 28 days; to determine the load of *Bacillus* and *Vibrio* after biostimulation, it was determined by seeding in plates of successive dilutions, and to determine the load of organic matter obtained after biostimulation of the bacterial floc, the Walkley & Black method was used.

This experiment is completely randomized, consisting of 12 plastic trays and three different treatments (SiCa, Molasses and SiCa + Molasses), including a control treatment (0) to which nothing was applied. The experiment lasted for 28 days; to determine the load of *Bacillus* spp. and *Vibrio* sp. after biostimulation was determined by plate seeding with successive dilutions and to determine the load of organic matter obtained after biostimulation of the bacterial floc, the Walkley & Black method was used.

The results obtained from the experiment were able to determine a significant difference between the different treatments, with treatment 3 (SiCa + Molasses) showing a higher *Bacillus* load with respect to the control treatment and a reduction in the *Vibrio* load, in addition to showing a considerable reduction in the organic matter present, since from 4.25%, treatment 3 achieved a value of 0.23%. In conclusion, biostimulation can be used to biostimulate the native bacterial floc in aquaculture soils of low salinity for the treatment of organic matter.

Key Words : Aquaculture, biostimulation, *Bacillus*, *Vibrio* and organic matter.

# ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.2.	JUSTIFICACIÓN.....	4
1.3.	OBJETIVOS .....	5
1.3.1.	Objetivo general .....	5
1.3.2.	Objetivos específicos.....	5
1.4.	Hipótesis.....	5
1.5.	Suelos acuícolas.....	6
1.5.1.	Suelos de baja salinidad.....	6
1.6.	Materia orgánica.....	6
1.6.1.	Materia orgánica en suelos acuícolas.....	7
1.6.2.	Impacto de la materia orgánica en suelos acuícolas .....	8
1.6.3.	Consumo de oxígeno.....	8
1.6.4.	Tratamiento de la Materia Orgánica (M.O).....	8
1.7.	Formación del Floc Bacteriano .....	9
1.7.1.	Definición y características de los floc bacterianos.....	9
1.8.	<i>Bacillus spp</i> .....	10
1.8.1.	<i>Bacillus spp.</i> en suelos acuícolas .....	10
1.9.	Bacterias patógenas <i>Vibrio spp.</i> .....	11
1.10.	Bioestimulación en Suelos Acuícolas.....	12
1.10.1.	Mecanismos de acción de la bioestimulación .....	12
1.10.1.1.	Importancia de los nutrientes para la bioestimulación.....	13
1.10.1.2.	Nutrientes/Minerales. Carbono.....	13
1.10.2.	Beneficios de la bioestimulación.....	14
II.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
2.1.	Ubicación del experimento.....	15
2.2.	Materiales y reactivos.....	15
2.2.1.	Materiales.....	15
2.2.2.	Equipos .....	15
2.2.3.	Insumos de laboratorio.....	16
2.2.4.	Reactivos.....	16

2.2.5.	Insumo biológico .....	16
2.3.	Diseño experimental.....	16
2.3.1.	Modelo matemático (diseño completamente al azar) .....	17
2.3.2.	Caracterización de los tratamientos .....	17
2.4.	VARIABLES A MEDIR .....	18
2.4.1.	VARIABLES DEPENDIENTES. ....	18
2.4.2.	VARIABLES INTERVINIENTES ALEATORIAS. ....	18
2.5.	MANEJO DEL EXPERIMENTO.....	18
2.5.1.	Toma de la muestra.....	18
2.5.2.	Preparación de las unidades experimentales.....	19
2.5.3.	Aplicación de tratamientos y toma de parámetros.....	19
2.6.	METODOLOGÍA EMPLEADA PARA MEDIR LAS VARIABLES Y RECOLECCIÓN DE DATOS. ....	19
2.6.1.	Método para análisis de <i>Bacillus</i> y <i>Vibrio</i> presentes en el sedimento. ....	19
2.6.1.1.	Recolección y preparación muestra de la parte lábil. ....	19
2.6.1.2.	Método de siembra y conteo en placa para <i>Bacillus</i> . ....	19
2.6.1.3.	Método de siembra y conteo en placa para <i>Vibrio</i> . ....	20
2.6.2.	Método de análisis de materia orgánica de la parte lábil del sedimento.....	20
2.6.2.1.	Secado y tamizado de la muestra.....	20
2.6.2.2.	Método de Walkley & Black para análisis de Materia Orgánica (MO). ....	20
III.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	21
3.1.	Análisis de los parámetros fisicoquímicos del ensayo. ....	21
3.2.	Análisis de los aditivos que bioestimulan la producción de bacterias en suelos acuícolas de baja salinidad. ....	21
3.3.	Análisis de la carga de <i>Bacillus</i> (UFC/g) después de la bioestimulación. ....	21
3.4.	Análisis de la carga de <i>Vibrio</i> (UFC/g) después de la bioestimulación.....	23
3.5.	Análisis del porcentaje de materia presente en la parte lábil del suelo. ....	25
IV.	CONCLUSIONES .....	29
V.	RECOMENDACIONES.....	30
VI.	BIBLIOGRAFÍA .....	31
VII.	ANEXOS. ....	38
7.1.	Método de Walkley & Black.....	43

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de las concentraciones de carbono orgánico del suelo para la acuicultura.	7
<b>Tabla 2.</b> Croquis del experimento establecido. ....	17
<b>Tabla 3.</b> Tratamientos . ....	18
<b>Tabla 4.</b> ANOVA de un factor entre grupos de crecimiento de colonias de <i>Bacillus spp.</i> ....	22
<b>Tabla 5.</b> ANOVA de un factor entre grupos en los días 3, 6, 9 y 15 de la carga de <i>Vibrios sp...</i>	24
<b>Tabla 6.</b> ANOVA de un factor entre grupos de la materia orgánica medido cada 6 días. ....	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ubicación del laboratorio de maricultura en la Facultad de Ciencias Agropecuarias..	15
<b>Figura 2.</b> Crecimiento de colonias de <i>Bacillus spp</i> (UFC/g de suelo).....	23
<b>Figura 3.</b> Crecimiento de colonias de <i>Vibrios sp.</i> (UFC/g de suelo) .....	25
<b>Figura 4.</b> Degradación de materia orgánica en los 21 días de tratamiento. ....	27
<b>Figura 5</b> Crecimiento de colonias de <i>Bacillus spp.</i> , respecto a la degradación de materia orgánica.....	28

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Obtención de suelo acuícola de baja salinidad.....	38
<b>Anexo 2.</b> Preparación de unidades experimentales. ....	38
<b>Anexo 3.</b> Pasaje de insumos para los tratamientos. ....	39
<b>Anexo 4.</b> Aplicación de tratamientos.....	39
<b>Anexo 5.</b> Medición de parámetros físico-químicos. ....	40
<b>Anexo 6.</b> Siembra en placa .....	40
<b>Anexo 7.</b> Conteo de colonias de <i>Bacillus spp</i> y <i>Vibrios sp</i> . ....	41
<b>Anexo 8.</b> Tamizado de muestras de suelo. ....	41
<b>Anexo 9.</b> Fase de digestión del suelo mediante ácido sulfúrico + dicromato de potasio. ....	42
<b>Anexo 10.</b> Fase de titulación mediante solución de sulfato ferroso amoniacal.....	42

## I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la acuicultura moderna, motivada por la necesidad de incrementar las densidades de cultivo y explorar nuevas extensiones de terreno para expandir las áreas productivas, ha provocado que las nuevas granjas acuícolas se expandan tierra adentro, dando origen a las camaroneras de tierra alta o baja salinidad. Estas expansiones plantean nuevos desafíos y, al mismo tiempo, impulsan de nuevos métodos de producción. El incremento en las densidades genera problemas ambientales que afectan la producción, siendo uno de ellos el exceso de Materia Orgánica (MO), que origina bacterias que impactan la composición química y estructural de los suelos acuícolas.

Los sedimentos resultan de la acumulación de alimento balanceado, excretas de los organismos, mudas, etc., depositándose en el fondo, donde las bacterias gram positivas se encargan de degradar la materia orgánica, y las gram negativas aportan a su acumulación. Este proceso da origen a compuestos nitrogenados tóxicos, especialmente en ambientes de baja salinidad, donde por la eutrofización se aprecia más este fenómeno. Además, aportan otros elementos como el carbono, dando origen a microorganismos bacterianos, tanto beneficiosos como perjudiciales.

Estos microorganismos, presentes en los fondos y la columna de agua, desempeñan diversas funciones según su especie, destacando el tratamiento de la materia orgánica. Por esta razón, la industria camaronera actual desarrolla el uso de estos microorganismos bacterianos mediante productos destinados tanto a la bioestimulación como a la bioaumentación. Esto aborda el problema de la materia orgánica, que afecta significativamente a los sistemas de producción, provocando pérdidas económicas y alterando el entorno, impidiendo condiciones óptimas de cultivo.

El principal género utilizado en procesos de biorremediación son las bacterias del género *Bacillus*, que se encuentran habitando principalmente en los fondos en el medio natural, compartiendo espacio con otros géneros como el *Vibrio*. Los procesos de bioestimulación buscan satisfacer los requisitos nutricionales de las bacterias del género *Bacillus* para aprovechar sus capacidades biorremediadoras en el tratamiento de la materia orgánica. Esto implica el uso de microorganismos adaptados al medio, mejorando la eficacia del proceso.

Este enfoque evita el uso de microorganismos no nativos que podrían alterar el medio y no siempre logran adaptarse para cumplir sus funciones, lo que resultaría en fuertes pérdidas

económicas, ya que algunos productos de este tipo pueden tener precios exorbitantes. Por lo tanto, es necesario poner a prueba y medir la efectividad de los productos empleados en la bioestimulación del floc bacteriano presente en los medios acuícolas de baja salinidad para el tratamiento de la Materia orgánica (MO).

### **1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

La materia orgánica es un factor presente dentro de los cultivos acuícolas, este es originado por la propia densidad del cultivo llegando afectar la calidad de agua y a los fondos donde habitan los organismos, es por eso que se han desarrollado productos con funciones de bioaumentación a base de bacterias con la finalidad de controlar la materia orgánica, sin embargo, no todos estos productos demuestran eficacia en diversas condiciones presentes en los estanques acuícolas, especialmente aquellos con baja salinidad, donde los factores limitantes son más prominentes, por lo que el proceso de bioaumentación no es la mejor opción que se puede usar en estos escenarios, ya que estos son fermentos o cultivos que se los realizan fuera de las piscinas, este enfoque no solo conlleva costos adicionales, sino que en algunos casos puede tener efectos perjudiciales para el propio medio acuático, por lo tanto, se hace necesario considerar cuidadosamente las condiciones específicas de cada estanque acuícola y evaluar la idoneidad de los productos comerciales en función de la salinidad y otros factores limitantes presentes en el medio ambiente acuático.

## 1.2. JUSTIFICACIÓN.

Debido a los elevados niveles de producción de camarón que se pueden observar actualmente, se produce una considerable acumulación de sedimentos en los fondos acuícolas, generando materia orgánica y propiciando la acumulación de compuestos nitrogenados tóxicos. Además, estos fondos se convierten en el hábitat de microorganismos perjudiciales como el *Vibrio*, que afecta directamente a la producción, constituyéndose como un importante problema. Si no se controlan adecuadamente, estos pueden ocasionar pérdidas económicas significativas y afectar el entorno. Por esta razón, se han desarrollado productos bioestimuladores y bioaumentadores para abordar el tratamiento de la materia orgánica.

La bioestimulación, a diferencia de la bioaumentación, es un proceso menos intrusivo para el medio acuático, aprovecha los microorganismos bacterianos nativos adaptados a entornos de baja salinidad, como el género *Bacillus*, con el objetivo de controlar la materia orgánica generada por los propios cultivos acuícolas. El uso de productos comerciales en condiciones adversas, como las que se observan en los cultivos de camarón en baja salinidad, no garantiza siempre su efectividad. Por lo tanto, aprovechar microorganismos adaptados a ese medio representa una mejor opción para realizar los procesos de degradación de la materia orgánica.

Las bacterias del género *Bacillus* para que realicen los procesos de bioestimulación y biorremediación, es necesario cumplir con sus requerimientos nutricionales. Por lo tanto, se deben utilizar productos que ayuden a satisfacer estos requisitos, proporcionando micronutrientes y carbono para aumentar su biomasa. Esto también contribuye como fuente energética para realizar el proceso de biorremediación y así mismo degradar la materia orgánica en los fondos, bajo condiciones adecuadas, la comunidad de microorganismos presente en el medio acuático puede degradar cualquier componente orgánico mediante procesos biológicos.

Por ende, la finalidad de esta investigación radica en bioestimular el floc bacteriano nativo presente en suelos acuícolas de baja salinidad para el tratamiento de la materia orgánica, y así, medir la efectividad de las bacterias del medio nativo después de haber pasado por un proceso de bioestimulación. Para saber si representa una alternativa viable a la utilización de productos comerciales, los cuales no siempre garantizan su efectividad en todos los escenarios que pueden surgir durante la producción acuícola.

### **1.3. OBJETIVOS**

#### **1.3.1. Objetivo general**

Evaluar el floc bacteriano presente en suelos acuícolas de baja salinidad, mediante la bioestimulación para el tratamiento de materia orgánica.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Identificar los aditivos que bioestimulan la producción de bacterias en suelos acuícolas de baja salinidad.
- Definir la carga de *Bacillus spp.* obtenida después de la bioestimulación
- Determinar la carga de *Vibrios spp.* obtenida después de la bioestimulación.
- Evaluar la reducción de la materia orgánica.

#### **1.4. Hipótesis**

El uso de micronutrientes con fuentes de carbono bioestimulan el floc bacteriano nativo del suelo acuícola de baja salinidad y así degradar la Materia orgánica (MO).

## **1.5. Suelos acuícolas.**

Los suelos acuícolas se los define como una mezcla de partículas orgánicas e inorgánicas, albergando tanto organismos vivos como restos inertes, estos comprenden materia de origen vegetal, resultado de la descomposición de elementos tanto animales como vegetales, además, contienen componentes como arcilla, piedras y gravas, que en algún momento formaron parte de una estructura rocosa más extensa, pero con el transcurso del tiempo experimentaron desintegración (Food and Agriculture Organization, 1998).

Los suelos acuícolas emergen como uno de los factores preeminentes a considerar durante el desarrollo de la actividad acuícola, entre las características fundamentales a tener en cuenta, destacan las topográficas, accesibilidad y, sobre todo, las relacionadas con la textura del suelo, los suelos arcillosos se erigen como la elección ideal, gracias a su notable capacidad de retención de agua, además de este atributo, su utilización presenta otro beneficio significativo como la capacidad de interactuar de manera eficaz con el entorno en la gestión de nutrientes y minerales (González, 2020).

### **1.5.1. Suelos de baja salinidad**

En suelos de baja salinidad se lleva a cabo la crianza de organismos acuáticos como el camarón, lo que implica una asociación con condiciones particulares, este tipo de cultivo demanda una fuente de agua con perfiles iónicos específicos y una técnica adecuada para la aclimatación de los organismos, lo que permite explorar diversas alternativas de cultivo, así mismo, existe diversificación de la producción acuícola no solo amplía las oportunidades de mercado, sino que también abre nuevas posibilidades en este ámbito (Aguirre, *et al.*, 2019).

Los suelos que utilizan fuentes de agua con un balance iónico insuficiente para un desarrollo óptimo se clasifican como suelos de baja salinidad, en estas áreas, la ausencia de minerales esenciales como potasio y magnesio es notable, por otro lado, factores como la presencia de materia orgánica, el tamaño de partículas y su composición nutricional del entorno influye significativamente en el desarrollo de los cultivos de estos suelos (Pine, *et al.*, 2012).

## **1.6. Materia orgánica.**

Podemos definir la materia orgánica como la acumulación de residuos, que puede ser de origen animal o vegetal, y otros productos, estos compuestos suelen ser depositados en el suelo, contribuyendo a su fertilidad y proporcionando un hábitat para una diversidad de microorganismos (Pérez, 2008). En el contexto de la acuicultura, la materia orgánica constituye una capa superficial

en los suelos empleados en todo el mundo, en su mayoría, esta materia está compuesta por desechos de animales convirtiéndola en un fertilizante rico en nitrógeno y fósforo después de procesos de degradación (Schipper, 2013).

### 1.6.1. Materia orgánica en suelos acuícolas.

La calidad del suelo para la producción de camarón deja de ser apta cuando esta alcanza un máximo de 10% de Materia Orgánica (MO). Sin embargo, es crucial tener en cuenta que la mayor proporción de esta materia en el suelo debe ser refractaria. En caso contrario, si la predominancia recae en la fracción lábil, la calidad del suelo resultaría inadecuada para el cultivo de organismos acuáticos, también, es esencial destacar que esta materia orgánica tiene aproximadamente un 45% a 50% de carbono, lo cual se puede obtener una estimación cercana de cantidad total de la materia orgánica multiplicando por dos la cantidad de carbono presente en el suelo (Boyd, 2002).

**Tabla 1.** Clasificación de las concentraciones de carbono orgánico del suelo para la acuicultura.

<b>Carbono orgánico (%)</b>	<b>Comentario</b>
> 15	Suelo orgánico
3,1 a 15	Suelo mineral, alto contenido de materia orgánica
1,0 a 3,0	Suelo mineral, contenido moderado de materia orgánica, mejor variedad para acuicultura
< 1	Suelo mineral, bajo contenido de materia orgánica.

*Autores: Rodrigo Ramírez y Kevin Ramírez (2024)*

La materia orgánica presente en los suelos acuícolas se origina a partir de la acumulación de diversos elementos, como fertilizantes, excrementos de los animales cultivados, restos no consumidos de alimento balanceado, así como fitoplancton y zooplancton en descomposición, además, cualquier otro organismo muerto contribuye a esta mezcla depositada en los fondos acuícolas, por lo general, esta capa de materia orgánica se localiza en la superficie de los fondos, con un espesor recomendado de 2 a 5 cm; sobrepasar este rango puede generar ciertas dificultades (Boyd, 2020).

### **1.6.2. Impacto de la materia orgánica en suelos acuícolas**

La acumulación de materia orgánica propicia el desarrollo bacteriano, provocando modificaciones en su composición química, estructura y funciones dentro del medio ambiente. El aumento de materia orgánica y nutrientes genera consecuencias tales como la reducción de la concentración de oxígeno y también la demanda biológica de oxígeno ocasionando alteraciones en los ciclos de nutrientes, lo que conlleva al aumento de nitrógeno y fósforo, estas condiciones propician la producción de metanogénesis e hidrógeno sulfhídrico (Buschman, 2001).

Los residuos de alimento balanceado, que constituyen una parte de la materia orgánica depositada en los fondos, incrementan las concentraciones de elementos nitrogenados y fosforados. Estos compuestos se liberan en la columna de agua, creando un ambiente propicio que favorece las floraciones de cianobacterias. Estas floraciones no solo impactan directamente a los cultivos acuáticos presentes en el entorno, sino que también generan inestabilidad en los ecosistemas acuáticos circundantes, afectando a su fauna y otros elementos constituyentes (Wang, *et al.*, 2023).

### **1.6.3. Consumo de oxígeno**

La presencia de oxígeno en el medio de cultivo está determinada por varios factores, como la actividad respiratoria de los organismos vivos, incluyendo las bacterias aeróbicas, así como la degradación de la materia orgánica. Se describe que aproximadamente el 50-55% del oxígeno disuelto es consumido por la respiración que tiene lugar en el fondo del medio, mientras que el 40-45% es utilizado por el fitoplancton, y el restante 5% es absorbido por los organismos cultivados (Carranza, 2020).

Durante el proceso de degradación, se evidencia un consumo de 1,2 gramos de oxígeno por cada gramo de sustancia descompuesta. En paralelo, en el contexto de la fotosíntesis, la fijación de cada gramo de carbono resulta en la generación de 2,6 gramos de oxígeno. Por lo tanto, se recomienda que los procesos de biorremediación estén respaldados por niveles adecuados de oxígeno disuelto o, alternativamente, disponer siempre de una fuente óptima de carbono para propiciar condiciones favorables en los procesos fotosintéticos, asegurando así la producción de oxígeno (Food and Agriculture Organization, 1993).

### **1.6.4. Tratamiento de la Materia Orgánica (M.O)**

La biorremediación microbiana implica la utilización de microorganismos, particularmente bacterias, que tienen la capacidad de acumular y metabolizar compuestos pesados. Este proceso

posibilita la transformación de sustancias nocivas en compuestos de menor toxicidad. Aunque las bacterias son las más empleadas en este contexto, diversas investigaciones han explorado el uso de otros microorganismos como son los hongos, algas, cianobacterias y actinomicetos que permiten degradar compuestos tóxicos presentes en el suelo (Acuña, *et al.*, 2010).

En la actualidad, para abordar la gestión de la materia orgánica generada en diversas actividades acuícolas se disponen de varias alternativas. Entre las más destacadas se encuentran los sistemas RAS, los sistemas acuapónicos y, por último, los sistemas simbióticos. En estos últimos, en algunos casos se emplean algas, mientras que en otros se utilizan comunidades microbianas. Estas comunidades, a través de diversos procesos biológicos, descomponen de manera natural la materia orgánica acumulada en los fondos o a través de los filtros biológicos incorporados en el sistema (Tom, *et al.*, 2021).

Los biorreactores son otra alternativa, que están compuestos por extractos vegetales, componentes enzimáticos naturales, minerales biocatalizadores, hidratos de carbono, además extractos de levaduras y microorganismos seleccionados previamente fermentados de manera controlada, han dado buenos resultados favorables para la eliminación contaminantes, por lo que diversas investigaciones han facilitado el uso en sistema acuáticos (Ape, *et al.*, 2019).

## **1.7. Formación del Floc Bacteriano**

Los floc bacterianos se pueden definir como la agrupación de diversos géneros de microorganismos, compuestos tanto por materia orgánica como inorgánica, y ciertos filamentos de glicocálix producidos por un grupo específico de bacterias. La formación del flóculo bacteriano se ve afectada por diversos factores ambientales, como la edad del lodo, la presencia de metales y compuestos orgánicos, los cuales ejercen una influencia directa en su composición. Esto se traduce en variaciones en los géneros que lo conforman, así como en el número de colonias presentes, generando una diversidad en la estructura y características del flóculo (Arcos, 2013).

### **1.7.1. Definición y características de los floc bacterianos.**

Las bacterias desempeñan una función crucial en los cultivos de organismos acuáticos, que se dividen en dos grupos, por un lado, las bacterias Gram positivas, como por ejemplos *Bacillus* y *Lactobacillus*, que desempeñan un papel esencial al participar en la biorremediación del suelo y proporcionar una microbiota beneficiosa a los organismos cultivados, por otro punto, las bacterias Gram negativas, como *Nitrosomas* o *Nitrobacter*, donde desempeñan un papel clave en los

procesos de nitrificación, además, destacan las bacterias oportunistas, como los *Vibrios*, reconocidas por su relevancia en los cultivos acuícolas (James, et al., 2021); (Lu, et al., 2021).

Una de las características destacadas del floc bacteriano en los suelos acuáticos es su notable diversidad en comparación con el que se encuentra en la columna de agua. Esto se debe a que el lecho del cultivo acuático proporciona un hábitat más propicio, gracias a la presencia de sedimentos que cumplen con los requisitos nutricionales y fomentan un aumento significativo de la biomasa. Es importante considerar siempre el entorno específico en el que se desarrollan estos microorganismos (Schveitzer, et al., 2020).

### **1.8. *Bacillus spp***

El género *Bacillus* fue inicialmente caracterizado por Cohn en 1872, y engloba aproximadamente 336 especies, se distinguen por ser productoras de endosporas, una característica que les confiere la capacidad de habitar tanto ambientes acuáticos como terrestres, presentan un crecimiento aerobio y, en determinadas condiciones, también pueden desarrollarse de manera anaerobia facultativa, asimismo, exhiben movilidad flagelar y tienen un tamaño que oscila entre 0.5 y 10  $\mu\text{m}$ , su desarrollo óptimo se da en entornos con pH neutro y en un rango de temperaturas dentro de los laboratorios en entornos que va desde los 30 hasta los 45°C en condiciones controladas (Villarreal, et al., 2018).

Las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* encuentran una amplia aplicación en el ámbito acuícola, gracias a su probada eficacia en el mantenimiento rentable de la calidad del agua y del suelo, en sintonía con el entorno, la efectividad de este género bacteriano está intrínsecamente vinculada al entorno en el que se desenvuelve, dependiendo de que dicho medio satisfaga los requisitos necesarios para que estas bacterias lleven a cabo sus procesos de manera óptima (Hlordzi, et al., 2020).

#### **1.8.1. *Bacillus spp.* en suelos acuícolas**

Las bacterias gram positivas, comúnmente utilizadas como probióticos, cumplen la función de convertir la materia orgánica presente en el cultivo en CO<sub>2</sub>, a diferencia de las bacterias gram negativas, que tienden a transformar esta materia orgánica en biomasa bacteriana o limo. Sin embargo, diversos estudios han indicado que las mejoras en los parámetros evaluados dependen de la aplicación y dosificación específicas en el medio. Además, su aplicación proporciona un suelo con un color consistente, niveles adecuados de oxígeno, elimina olores desagradables

provenientes de los fondos y promueve un equilibrado ciclo de nitrógeno en el medio acuático (Toledo, *et al.*, 2018); (Kamilya & Devi, 2022).

Los *Bacillus* presentes en los fondos acuícolas han demostrado una destacada capacidad biorremediadora, además de actuar como reguladores eficaces de diversos parámetros físicos y químicos. Entre estos, se incluyen los sólidos disueltos totales y la transparencia del agua, así como factores químicos como el pH, la demanda de oxígeno en los fondos de los cultivos acuáticos, metales pesados, compuestos nitrogenados, fosfatos y conductividad, entre otros. La biomasa bacteriana de *Bacillus* está sujeta a las condiciones ambientales, donde factores como nutrientes, pH, temperatura y oxígeno desempeñan un papel fundamental en su desarrollo (Hlordzi, *et al.*, 2020).

Estas bacterias Gram positivas desempeñan un papel fundamental en la reducción tanto del carbono orgánico particulado como del disuelto, se emplean en diversos tratamientos destinados a disminuir estos compuestos, llegando incluso a formar parte de las bacterias rizosféricas. Su actividad antimicrobiana les permite no solo contribuir a estos procesos, sino también mantenerse en condiciones de estrés de manera efectiva (Lopes, *et al.*, 2021).

La importancia de este género de bacterias en el proceso de biorremediación es innegable, ya que desempeña un papel fundamental al exhibir una destacada eficiencia en la transformación de la materia orgánica a CO<sub>2</sub>. En cuanto a biología, estos agentes pueden utilizar la materia orgánica como fuente de carbono para su desarrollo, a la vez que ejercen un control sobre ella. La eficacia de estos microorganismos en la mejora de los suelos se atribuye a su habilidad de producir enzimas, entre las que se incluyen la amilasa, lipasa y celulasa. Estas enzimas desempeñan un papel crucial al facilitar la biodegradación de los desechos orgánicos (James, *et al.*, 2021).

### **1.9. Bacterias patógenas *Vibrio spp.***

Los *Vibrios* son de los primeros géneros bacterianos en ser identificados y taxonómicamente descritos. Pertenecen a la familia *Vibrionaceae*, la cual se subdivide en diversos grupos de bacterias marinas heterótrofas. Estas bacterias, gramnegativas y oxidasa positivas, son mesófilas y suelen desplazarse gracias a un único flagelo polar. Una de sus características distintivas es su amplio rango de tolerancia a la salinidad que va de 5 a 35 mg/l, variando según la especie. En ciertos casos, en presencia de un elevado contenido de nutrientes orgánicos o cationes divalentes, estos pueden suplir las necesidades de sodio que requiere este género bacteriano (Leyton & Riquelme, 2008).

Las bacterias de esta familia son la causa de la vibriosis en los cultivos acuáticos. Es relevante destacar que no todas las cepas de *Vibrio* afectan a los organismos de cultivo, pero los peneidos son particularmente susceptibles, experimentando impactos patogénicos en diversas etapas, desde larvas hasta el periodo de engorde. En algunos países, la vibriosis ha provocado daños significativos en estos cultivos, resultando en considerables pérdidas económicas. Por lo tanto, es esencial mantener un estricto control de la carga bacteriana de los patógenos para preservar la salud de los cultivos y mitigar las repercusiones económicas adversas (Cuéllar, 2013).

#### **1.10. Bioestimulación en Suelos Acuícolas.**

Actualmente hay escasos trabajos investigativos relacionados con la bioestimulación en suelos acuícolas ya que la mayoría de trabajos de esta índole son relacionados con el tratamiento de aguas residuales y biorremediación de derramamientos de petróleo mediante procesos e bioestimulación es por ende con la ayuda de estos trabajos investigativos podemos definir lo siguiente:

La bioestimulación ayuda a incentivar la actividad natural de los microorganismos bacterianos presentes en los suelos acuícolas mediante la aplicación de nutrientes y oxígeno u algún otro aceptor de electrones (Gómez, *et al.*, 2009). También se define a la bioestimulación como la incorporación de micro y macronutrientes para así estimular el crecimiento bacteriano de los fondos acuícolas y aumentar su población (López, *et al.*, 2016).

A diferencia de la bioaumentación, que implica la adición externa de cultivos microbianos para facilitar la degradación de compuestos no deseados, la bioestimulación consiste en la inyección de nutrientes con el fin de acelerar el crecimiento de la población microbiana nativa. Ambos métodos son ampliamente considerados en los procesos de biorremediación in situ a nivel mundial (Tyagi, *et al.*, 2010).

##### **1.10.1. Mecanismos de acción de la bioestimulación**

La bioestimulación abarca distintos ámbitos de aplicación, y en el contexto acuícola específicamente, su objetivo es potenciar la proliferación de las bacterias autóctonas del entorno para incrementar su biomasa. Esto se logra mediante el uso de aditivos formulados para satisfacer sus necesidades nutricionales. Se sugiere que, para tener una mejor efectividad en procesos de bioestimulación, se acompañen de un adecuado sistema de aireación (Cárdenas, *et al.*, 2017).

La bioestimulación es una estrategia que implica el suministro de fuentes de N, P y C, acompañado de una adecuada concentración de oxígeno disuelto en el medio. Su objetivo es

estimular la actividad de todos los microorganismos autónomos presentes tanto en el suelo como en la columna de agua. Estos compuestos complementarios pueden ser introducidos en el sistema de forma líquida, gaseosa o mediante inyecciones. Otros factores cruciales para el proceso de bioestimulación son el pH y la temperatura, ya que ejercen una notable influencia en los procesos metabólicos de los organismos bacterianos (Tegene & Tenkegna, 2020).

#### **1.10.1.1. Importancia de los nutrientes para la bioestimulación.**

La importancia de los nutrientes para los microorganismos radica en su papel fundamental en la proliferación y masificación de estos organismos. La disponibilidad adecuada de nutrientes es esencial para mantener un equilibrio que, a su vez, facilitará la degradación de la materia orgánica. En este contexto, una mayor disponibilidad de nutrientes no solo favorecerá la reproducción bacteriana, sino que también mejorará la tasa de biodegradación del sedimento en los cultivos de organismos acuáticos (Colette, *et al.*, 2023).

#### **1.10.1.2. Nutrientes/Minerales. Carbono**

La bioestimulación involucra la activación de varios macronutrientes esenciales, entre los cuales se encuentra el nitrógeno, responsable de la producción de diversos componentes celulares como aminoácidos, enzimas y proteínas, asimismo, el fósforo desempeña un papel crucial en la formación de compuestos energéticos, además de contribuir a la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos, por otro lado, el carbono mantiene una participación constante en los procesos de degradación, proporcionando la energía necesaria para los microorganismos (Zambrano, 2018).

Las bacterias requieren de macro y micronutrientes específicos para facilitar su interacción y lograr alcanzar una estabilidad química. Es crucial suministrarles elementos como C, H, O, P, K, Mg, N, S, Co, Zn, Cu y Mo. Estos nutrientes pueden encontrarse de manera orgánica o inorgánica en el entorno natural en el que se desarrollan, o bien, ser proporcionados a través de fertilizantes comerciales para compensar su escasez en el medio acuático. Por ende, es esencial conocer a fondo la composición de la zona y los nutrientes disponibles para seleccionar el fertilizante comercial más adecuado (Caycedo, *et al.*, 2021).

Las comunidades microbianas requieren de fuentes de carbono para llevar a cabo diversas actividades entre ellas se encuentran procesos metabólicos, su crecimiento, etc. Por ello, es crucial que existen diversas fuentes de carbono, entre las cuales la más destacada es la melaza la cual es la fuente de carbono con mayor uso en el campo acuícola por su bajo costo y su buen nivel de

efectividad, por ende, es muy importante tener en cuenta la calidad de su elaboración y el método de almacenamiento, para que conserve de mejor manera sus propiedades (Zafra, *et al.*, 2022).

### ***1.10.2. Beneficios de la bioestimulación***

Una alternativa ampliamente utilizada en los procesos de biorremediación es la bioestimulación. Entre los beneficios que ofrece este método se destaca el aprovechamiento de las comunidades microbianas locales, potenciando así sus efectos biorremediadores. Además, al evitar la incorporación de microorganismos genéticamente alterados, se previene cualquier desequilibrio en el medio. La bioestimulación no solo representa una opción económicamente más viable, sino también menos costosa en comparación con otros métodos empleados en la biorremediación (Caballero, 2022).

La bioestimulación, como método menos invasor en los procesos de biorremediación, presenta otro beneficio importante al no representar ningún riesgo para seres humanos, animales o la flora presente en el entorno. Este enfoque simplemente potencia las capacidades naturales del medio, permitiendo contrarrestar los contaminantes presentes en la materia orgánica mediante la utilización de minerales y carbono, ya sea de forma endógena o exógena (Rivera, *et al.*, 2018).

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Ubicación del experimento

El presente trabajo de titulación se realizó en el Laboratorio de Maricultura ubicado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias, cuya dirección es P35P+CCW, E583, El Cambio, con las siguientes coordenadas 3°17'27.8"S 79°54'51.3"W

*Figura 1. Ubicación del laboratorio de maricultura en la Facultad de Ciencias Agropecuarias.*



*Fuente: Google Earth (2024)*

### 2.2. Materiales y reactivos.

#### 2.2.1. Materiales

- Micropipeta (100 y 1000  $\mu$ l)
- Asa de Digralsky
- Cajas Petri
- Espátula
- Varilla de vidrio
- Mechero de alcohol
- Pera de succión
- Balón aforado de 100 ml
- Bureta de 25 ml
- Tubos de ensayo de 15 ml
- Vaso de precipitación (250 y 50 ml)
- Pipeta (10 y 5 ml)
- Erlenmeyer de 250 ml

#### 2.2.2. Equipos

- Cámara de extracción
- Balanza
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave

- Incubadora
- Cocineta eléctrica
- Blower
- Tubos 1”
- Manguera de ¼ pulg.
- Multiparámetro.
- Termómetro digital.
- Oxigenómetro.
- Bandejas plásticas
- Pala
- Saquillos
- Tanque de 250L

### **2.2.3. Insumos de laboratorio**

- Agar TCBS
- HiCrome™ Bacillus Agar Base
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Agua destilada
- Alcohol industrial

### **2.2.4. Reactivos**

- Dicromato de potasio.
- Ácido Fosfórico.
- Ácido sulfúrico.
- Indicador difenilamina.
- SiCa (SiO<sub>2</sub>\_82,30%, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>\_2.64%, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>\_1.12%, CaO\_8.37%, Na<sub>2</sub>O\_1.18%, TiO<sub>2</sub>\_0.21% y P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>\_0.75%).
- Melaza.

### **2.2.5. Insumo biológico**

- Fondo acuícola de baja salinidad de piscina camaronera.

## **2.3. Diseño experimental**

Para el presente trabajo se utilizó un diseño completamente al azar cuyo objetivo fue presentar la mayor homogeneidad entre el material que se usó y el entorno experimental donde el factor manipulado fue el floc bacteriano nativo. Este se distribuyó en 4 tratamientos (tabla 3), con 3 repeticiones cada uno, obteniendo doce unidades experimentales (bandejas de plástico) con capacidad de 15 litros y medidas de 42,5 × 33 × 21,3 cm (largo x ancho x alto), cubiertas con un sedimento de 10 cm y 10 cm de columna de agua de 2 mg/l de salinidad de donde se obtuvieron

las muestras de suelo. Por último, se le agregó aireación constante para proporcionar condiciones aeróbicas.

**Tabla 2.** Croquis del experimento establecido.

Tratamientos			
<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T3</b>	<b>T2</b>
<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T0</b>	<b>T3</b>
<b>T1</b>	<b>T0</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>

### 2.3.1. Modelo matemático (diseño completamente al azar)

Modelo estadístico lineal para un diseño completamente al azar:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Donde:

- $Y_{ij}$  = Variable respuesta de la ij-esima unidad experimental
- $\mu$  = Efecto de la media general
- $T_i$  = Efecto del i-esimo tratamiento
- $E_{ij}$  = Efecto del error experimental asociado a la i-esima unidad experimental

### 2.3.2. Caracterización de los tratamientos

Los productos que se utilizaron para los tratamientos fueron: T0 no llevó ningún bioestimulante; para el T1 se usó silicio de calcio con una composición de SiO<sub>2</sub> 82,30%, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 2.64%, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 1.12%, CaO 8.37%, Na<sub>2</sub>O 1.18%, TiO<sub>2</sub> 0.21% y P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 0.75%, para el T2 se usó melaza de caña de azúcar 100% natural; y para el T3 se usó la mezcla del T1 y T2. Los tratamientos fueron colocados en intervalos de 6 días.

Los tratamientos en la tabla 3 indicaron las dosis que se emplearon para los 14 L y estuvieron relacionados con trabajos investigativos similares. Para el T1 se tomó como referencia el trabajo de Beltrán, *et al.* (1998), donde se emplearon micronutrientes para realizar una bioestimulación del floc nativo en suelos con hidrocarburos. Para el T2, se tomó como referencia

un trabajo realizado por Sanclemente, *et al.* (2011), donde se usó melaza para potenciar microorganismos bacterianos.

**Tabla 3.** *Tratamientos usados en la bioestimulación.*

<b>Tratamiento</b>	<b>Dosis</b>	<b>Volumen (L)</b>
<b>T0</b>	0	14
<b>T1</b>	7g/L	14
<b>T2</b>	84ml/L	14
<b>T3</b>	7g+84ml/L	14

*Autores: Rodrigo Ramírez y Kevin Ramírez (2024)*

## **2.4. Variables a medir**

Las variables que se midieron son:

### **2.4.1. Variables dependientes.**

- Numero de colonias de *Bacillus* (UFC/gramos de suelo): Variable cuantitativa y se medió cada 3 días por diluciones sucesivas junto a plaqueo usando Agar Cromogénico para *Bacillus*.
- Numero de colonias de *Vibrio sp* (UFC/gramos de suelo): Variable cuantitativa y se medió cada 3 días por diluciones sucesivas junto a plaqueo usando Agar Tcbs.
- Materia orgánica presente: Variable cuantitativa se medió a través del método de Walkley & Black.

### **2.4.2. Variables intervinientes aleatorias.**

- Lectura de pH: Variable cuantitativa fue medida de manera diaria con multiparámetros.
- Lectura de temperatura: Variable cuantitativa fue medida de manera diaria con un termómetro digital.
- Lectura de Oxígeno disuelto: Variable cuantitativa fue medida cada 3 días con un oxigenómetro.

## **2.5. Manejo del experimento.**

### **2.5.1. Toma de la muestra.**

Las muestras de suelo empleadas en el experimento fueron tomadas 1 día después haber finalizado la corrida en una piscina de 4 ha en la camaronera “San Patricio” (32ha), ubicada en el cantón Santa Rosa en el sector “Sal si puedes” en las coordenadas 3°25'07.1"S 79°58'59.5"W. Las

muestras se tomaron lo más cercano a la compuerta de salida en un solo punto, en donde se extrajo 110 kg de sedimento a una profundidad de 10 cm, luego fueron almacenados en saquillos con baldes y transportados al lugar del experimento.

### **2.5.2. Preparación de las unidades experimentales.**

Las muestras de fondo fueron llevadas al Laboratorio de Maricultura, la cantidad de 110kg de sedimento fueron homogenizadas en baldes de 20 L, luego se colocó una capa de 10cm de altura de sedimento por unidad experimental, posteriormente se analizó la carga de *Bacillus*, *Vibrio* y materia orgánica inicial del experimento (descrito en el punto 2.6.)

### **2.5.3. Aplicación de tratamientos y toma de parámetros**

La aplicación consistió en la suministración de insumos acuícolas, en donde los distintos tratamientos fueron homogenizados con 50ml de agua de su respectiva bandeja para luego ser aplicado en el fondo, una vez realizado esto se dio inicio a los 28 días que duró el experimento en donde cada 6 días se procedió a suministrar los diferentes tratamientos, el tratamiento 0 fue el testigo y no se le suministro ningún insumo acuícola. De manera diaria se monitoreo el pH, temperatura y cada 3 días el oxígeno disuelto presente en la columna de agua, se menciona que al inicio y al final del experimento se midió el consumo de oxígeno del sedimento. Durante el tiempo de duración del experimento se mantuvo una columna de agua de 5cm la cual fue traída del sector camaronero en donde se extrajeron las muestras de sedimento, también se indica que todos los tratamientos mantuvieron una aireación constante.

## **2.6. Metodología empleada para medir las variables y recolección de datos.**

### **2.6.1. Método para análisis de *Bacillus* y *Vibrio* presentes en el sedimento.**

#### **2.6.1.1. Recolección y preparación muestra de la parte lábil.**

Se recolectó una cantidad de 5 g de sedimento de la parte lábil por triplicado cada tratamiento, luego se homogenizo en una sola muestra, posteriormente se llevaron al laboratorio de Sanidad Vegetal, y las muestras fueron repartidas para análisis de materia orgánica y conteo de microorganismos bacterianos.

#### **2.6.1.2. Método de siembra y conteo en placa para *Bacillus*.**

Un gramo de la muestra de sedimento homogenizada se llevó a baño de maría a una temperatura de 80 °C durante 15 minutos para eliminar bacterias no deseadas, una vez finalizado las muestras de sedimento fueron llevadas a la cámara de flujo laminar para realizar diluciones seriadas en los tubos de ensayo, las cuales fueron aumentando en función del número de colonias

presentes hasta llegar a una dilución 1/14 con solución salina al 1%, una vez realizado esto se usó un asa de Dygraski para sembrar 100µl de cada dilución en una placa Petri la cual contenía el HiCrome™ Bacillus Agar Base .

Una vez realizado la siembra en la placa se procedió a poner en una incubadora a 30 °C por un periodo de 24 horas, cumplido el periodo de incubación se contabilizó las unidades formadoras de colonias UFC por gramo de suelo obtenido.

Para la preparación del HiCrome™ Bacillus Agar Base se siguió las indicaciones del fabricante con el código M1651.

#### **2.6.1.3.Método de siembra y conteo en placa para *Vibrio*.**

A partir de las muestras homogenizadas se tomó un gramo de dicho sedimento para realizar disoluciones seriadas 1/100 en los tubos de ensayo con solución salina 1%, una vez realizado esto se usó un asa de Dygraski para sembrar 100µl de cada dilución en una placa Petri la cual contenía el Agar TCBS .

Una vez realizado la siembra en la placa se procedió a poner en una incubadora a 30 °C por un periodo de 24 horas, cumplido el periodo de incubación se contabilizo las unidades formadoras de colonias UFC por gramo de suelo obtenido.

Para la preparación del TCBS AGAR se siguió las indicaciones del fabricante con el código ISO 21872.

### **2.6.2. Método de análisis de materia orgánica de la parte lábil del sedimento.**

#### **2.6.2.1. Secado y tamizado de la muestra.**

Se recolecto 15g de sedimento lábil de los diferentes tratamientos y se distribuyeron en bandejas de aluminio, las cuales fueron puestas a secar por un periodo de 3 días en el Laboratorio de Suelos a una temperatura de 65 °C posteriormente secada la muestra fue triturada y tamizada en un tamiz No.50.

#### **2.6.2.2.Método de Walkley & Black para análisis de Materia Orgánica (MO).**

El método de Walkley & Black fue llevado a cabo en el Laboratorio de Suelos, empleando el protocolo que utilizó Barrezueta, *et al.* (2020) colocado en los anexos.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 3.1. Análisis de los parámetros fisicoquímicos del ensayo.

Durante la realización del ensayo se registró los parámetros de temperatura, pH y oxígeno de la columna de agua, que tiene una intervención en la bioestimulación del floc bacteriano del suelo, siendo el promedio de temperatura  $27,39\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , un pH de  $7,25 \pm 1,5$  y oxígeno de  $5,07\text{ mg/l} \pm 0,2$ . Además, se midió el consumo de oxígeno promedio del sedimento de  $2,3\text{ mg/l}$ .

#### 3.2. Análisis de los aditivos que bioestimulan la producción de bacterias en suelos acuícolas de baja salinidad.

Después de un periodo de 28 días, se pudo determinar que los 3 tratamientos conformados por los insumos acuícolas SiCa, Melaza y SiCa + Melaza bioestimularon el floc nativo presente en el suelo acuícola de baja salinidad, en donde el tratamiento 3 se obtuvo que las bacterias del género *Bacillus* pasaron de una concentración de  $1,07 \times 10^5$  UFC/g a  $1,85 \times 10^{17}$  lo cual es similar con lo mencionado por Beltrán, *et al.* (1998), en donde ellos obtuvieron después de haber preparado un medio de cultivo con similares micronutrientes y fuente carbono, una bioestimulación del *Bacillus thuringiensis* en donde se vio un incremento de biomasa, de  $0.1\text{ mg/l}$  a  $4.83\text{ mg/l}$ . Hay varias fuentes que sirven para la bioestimulación como lo menciona, Wang, *et al.* (2022) donde observaron que al estimular *Bacillus spp.* con diferentes fuentes de carbono, como poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato y melaza, no hubo una diferencia significativa en la diversidad y abundancia bacteriana. Sin embargo, sí se registraron mejoras en el rendimiento de las bacterias en distintos procesos fisicoquímicos.

#### 3.3. Análisis de la carga de *Bacillus* (UFC/g) después de la bioestimulación.

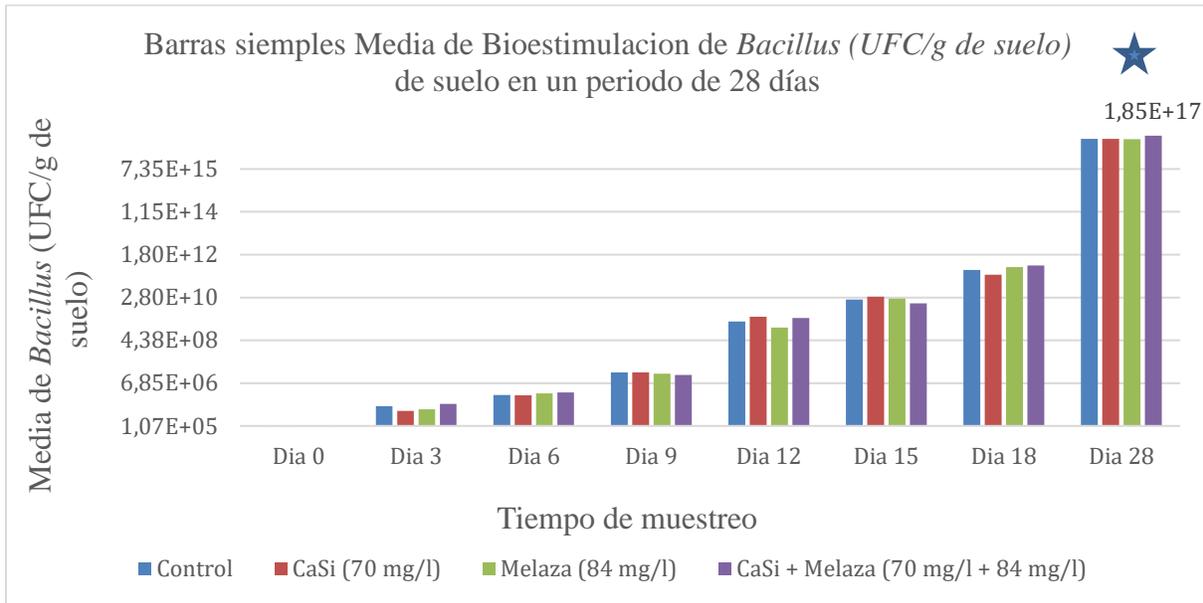
La carga de *Bacillus spp.* con la que se inició el experimento era de  $1,07 \times 10^5$  UFC/g. Con respecto al incremento de la carga de *Bacillus spp.* obtenida después de la bioestimulación se utilizó para su análisis el ANOVA de un factor entre grupos en donde la tabla 4 indica que en los días 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 28 existe una diferencia significativa entre los tratamientos ya que p-valor es menor a alfa establecido de 0,05 (Tabla 4).

**Tabla 4.** ANOVA de un factor entre grupos de crecimiento de colonias de *Bacillus spp.*

ANOVA						
UFC/g de suelo de <i>Bacillus</i>						
Momento de muestreo (cada tercer día)		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Dia 0	Entre grupos	0,000	3	0,000	0,000	1,000
	Dentro de grupos	10133333333	20	506666666,7		
	Total	10133333333	23			
Dia 3	Entre grupos	7,20717E+11	3	2,40239E+11	5,487	,006
	Dentro de grupos	8,75733E+11	20	43786666667		
	Total	1,59645E+12	23			
Dia 6	Entre grupos	1,88E+12	3	6,26667E+11	55,720	,000
	Dentro de grupos	2,24933E+11	20	11246666667		
	Total	2,10493E+12	23			
Dia 9	Entre grupos	7,70267E+13	3	2,56756E+13	6,794	,002
	Dentro de grupos	7,55867E+13	20	3,77933E+12		
	Total	1,52613E+14	23			
Dia 12	Entre grupos	2,80572E+19	3	9,3524E+18	94,980	,000
	Dentro de grupos	1,96933E+18	20	9,84667E+16		
	Total	3,00265E+19	23			
Dia 15	Entre grupos	6,3372E+20	3	2,1124E+20	49,868	,000
	Dentro de grupos	8,472E+19	20	4,236E+18		
	Total	7,1844E+20	23			
Dia 18	Entre grupos	4,80157E+23	3	1,60052E+23	156,617	,000
	Dentro de grupos	2,04387E+22	20	1,02193E+21		
	Total	5,00595E+23	23			
Dia 28	Entre grupos	1,11218E+34	3	3,70728E+33	39,778	,000
	Dentro de grupos	1,864E+33	20	9,32E+31		
	Total	1,29858E+34	23			

Se evidencio en la prueba post hoc de Tukey que el día 28 en el tratamiento 3 conformado por SiCa + Melaza tuvo una diferencia significativa frente al tratamiento control, tratamiento 1 y tratamiento 2 en donde este de aquí tuvo un incremento de  $1,07 \times 10^5$  UFC/g a  $1,85 \times 10^{17}$  UFC/g lo cual es similar a los descrito por Gómez, *et al.*, (2009) donde ellos después de un proceso de bioestimulación en suelos con presencia de hidrocarburos se puedo evidenciar que las cargas de *Bacillus spp.* pasaron de  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^{10}$  UFC/g de suelo. (Figura 2).

**Figura 2.** Crecimiento de colonias de *Bacillus spp* (UFC/g de suelo)



Al igual que la investigación de Lopes, *et al.* (2020) donde se llevó a cabo un proceso de biorremediación con *Bacillus spp.*, se determinó que una concentración mínima de  $2.41 \times 10^6$  UFC/g por hectárea es necesaria para lograr una reducción efectiva de la materia orgánica. Esto resultó en la disminución de contaminantes biológicos y la acumulación de compuestos nitrogenados. Lo que indica que la bioestimulación podría ser efectiva para la reducción de materia orgánica.

### 3.4. Análisis de la carga de *Vibrio* (UFC/g) después de la bioestimulación

La carga de *Vibrio* con la que se inició el experimento era de  $2 \times 10^4$  UFC/g. Con respecto al incremento de la carga de *Vibrio* obtenida después de la bioestimulación se utilizó para su análisis el ANOVA de un factor entre grupos en donde la tabla 5 indica que en los días 3, 6, 9 y 15 existe una diferencia significativa entre los tratamientos ya que p-valor es menor a alfa establecido de 0,05 (Tabla 5).

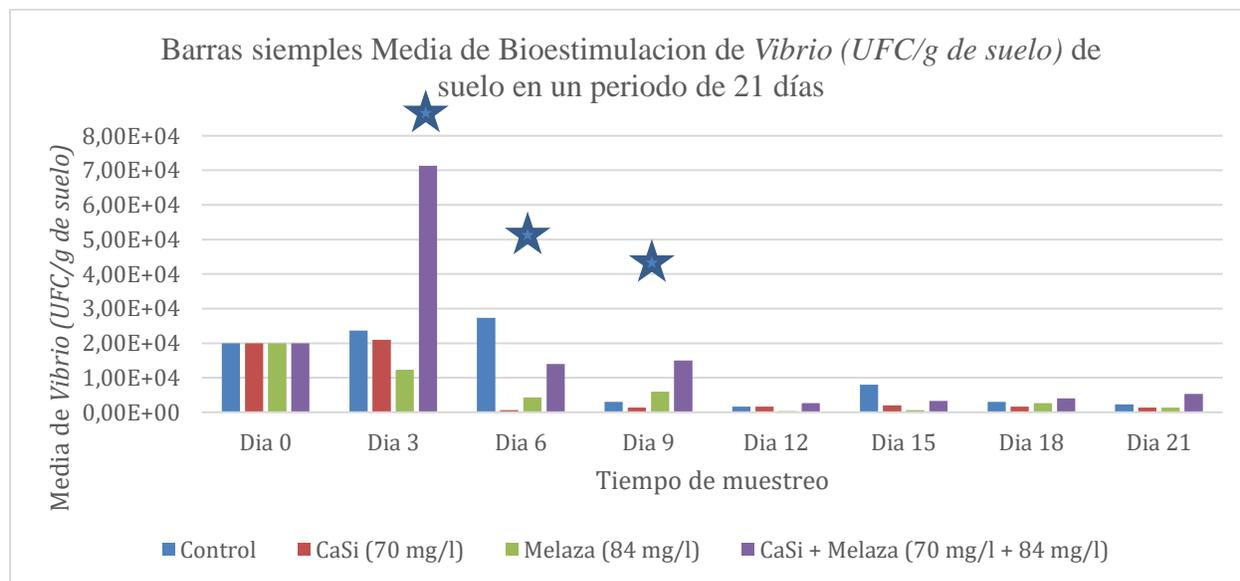
**Tabla 5. ANOVA de un factor entre grupos en los días 3, 6, 9 y 15 de la carga de *Vibrios sp.***

ANOVA						
UFC/g de suelo de <i>Vibrios</i>						
Momento de muestreo (cada tercer día)		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Dia 0	Entre grupos	0,00E+00	3,00E+00	0,00E+00	0,000	1,000
	Dentro de grupos	8,00E+08	8,00E+00	1,00E+08		
	Total	8,00E+08	1,10E+01			
Dia 3	Entre grupos	6,37E+09	3,00E+00	2,12E+09	81,704	,000
	Dentro de grupos	2,08E+08	8,00E+00	2,60E+07		
	Total	6,58E+09	1,10E+01			
Dia 6	Entre grupos	1,28E+09	3,00E+00	4,26E+08	65,483	,000
	Dentro de grupos	5,20E+07	8,00E+00	6,50E+06		
	Total	1,33E+09	1,10E+01			
Dia 9	Entre grupos	3,34E+08	3,00E+00	1,11E+08	12,257	,002
	Dentro de grupos	7,27E+07	8,00E+00	9,08E+06		
	Total	4,07E+08	1,10E+01			
Dia 12	Entre grupos	8,25E+06	3,00E+00	2,75E+06	1,500	,287
	Dentro de grupos	1,47E+07	8,00E+00	1,83E+06		
	Total	2,29E+07	1,10E+01			
Dia 15	Entre grupos	9,17E+07	3,00E+00	3,06E+07	5,392	,025
	Dentro de grupos	4,53E+07	8,00E+00	5,67E+06		
	Total	1,37E+08	1,10E+01			
Dia 18	Entre grupos	8,33E+06	3,00E+00	2,78E+06	,513	,685
	Dentro de grupos	4,33E+07	8,00E+00	5,42E+06		
	Total	5,17E+07	1,10E+01			
Dia 21	Entre grupos	3,23E+07	3,00E+00	1,08E+07	1,330	,331
	Dentro de grupos	6,47E+07	8,00E+00	8,08E+06		
	Total	9,69E+07	1,10E+01			

Se evidenció en la prueba post hoc de Tukey que en el día 3, 6 y 9 de bioestimulación el tratamiento 3 conformado por SiCa + Melaza tuvo una diferencia significativa frente a todos los

tratamiento en donde se obtuvo un ligero incremento en la concentración de *Vibrio* el cual paso de  $2 \times 10^4$  a  $7,13 \times 10^4$  UFC/g de suelo, lo cual se le puede atribuir a la implementación de micronutrientes y fuentes de carbono, en el día 3 y 6 se pudo observar en el tratamiento control un ligero incremento en la carga de *Vibrio* que paso de  $2 \times 10^4$  a  $2,73 \times 10^4$  UFC/g de suelo, lo cual se le puede atribuir a la variación de temperatura y presencia de oxígeno que hubo durante el experimento , luego a partir del día 12 hasta el 21 en el tratamiento 3, se logró observar una reducción en su carga ya que paso a ser  $5,33 \times 10^3$  UFC/g (Figura 3), en donde con base a estos datos obtenidos, se observa que, al igual que en el estudio de Wang, *et al.* (2006) se logró una reducción significativa en la carga de *Vibri*os, que disminuyó de  $1.16 \times 10^5$  a  $3.65 \times 10^3$  UFC/g, este resultado coincide con el incremento en la presencia de *Bacillus spp.* en los tratamientos. La proliferación de estos microorganismos parece haber reducido la disponibilidad de nutrientes en el entorno, lo que a su vez limita el florecimiento de patógenos.

**Figura 3.** Crecimiento de colonias de *Vibri*os sp. (UFC/g de suelo)



### 3.5. Análisis del porcentaje de materia presente en la parte lábil del suelo.

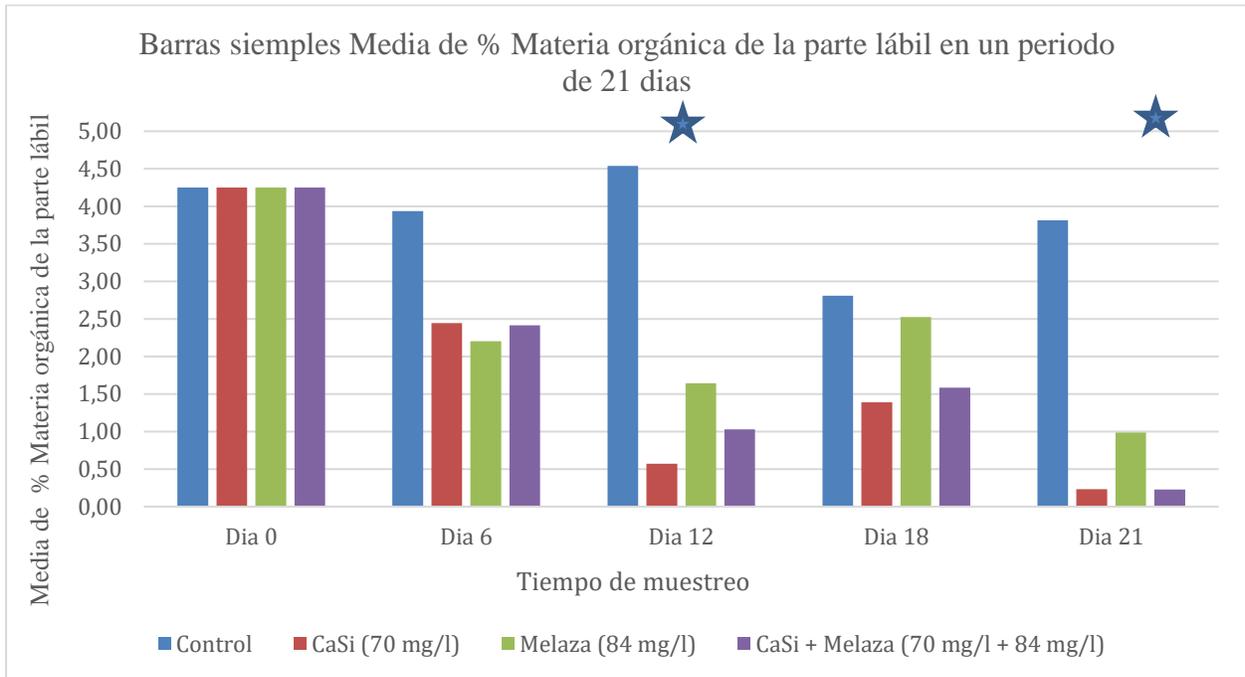
El porcentaje de materia orgánica en el sedimento con la que se inició el experimento era 4,25 %. Con respecto al porcentaje de materia orgánica presente en la parte lábil obtenida después de la bioestimulación se utilizó para su análisis el ANOVA de un factor entre grupos en donde la tabla 6 indica que luego de 21 todos los tratamientos tienen diferencia significativa ya que p-valor es menor a alfa establecido de 0,05 (Tabla 6).

**Tabla 6.** ANOVA de un factor entre grupos de la materia orgánica medido cada 6 días.

ANOVA						
MO del suelo						
Momento de muestreo (cada seis días)		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Dia 0	Entre grupos	,000	3	,000	,000	1,000
	Dentro de grupos	13,222	8	1,653		
	Total	13,222	11			
Dia 6	Entre grupos	5,737	3	1,912	4,216	,046
	Dentro de grupos	3,628	8	,454		
	Total	9,365	11			
Dia 12	Entre grupos	28,579	3	9,526	10,287	,004
	Dentro de grupos	7,409	8	,926		
	Total	35,988	11			
Dia 18	Entre grupos	4,365	3	1,455	4,861	,033
	Dentro de grupos	2,395	8	,299		
	Total	6,760	11			
Dia 21	Entre grupos	26,112	3	8,704	52,613	,000
	Dentro de grupos	1,323	8	,165		
	Total	27,435	11			

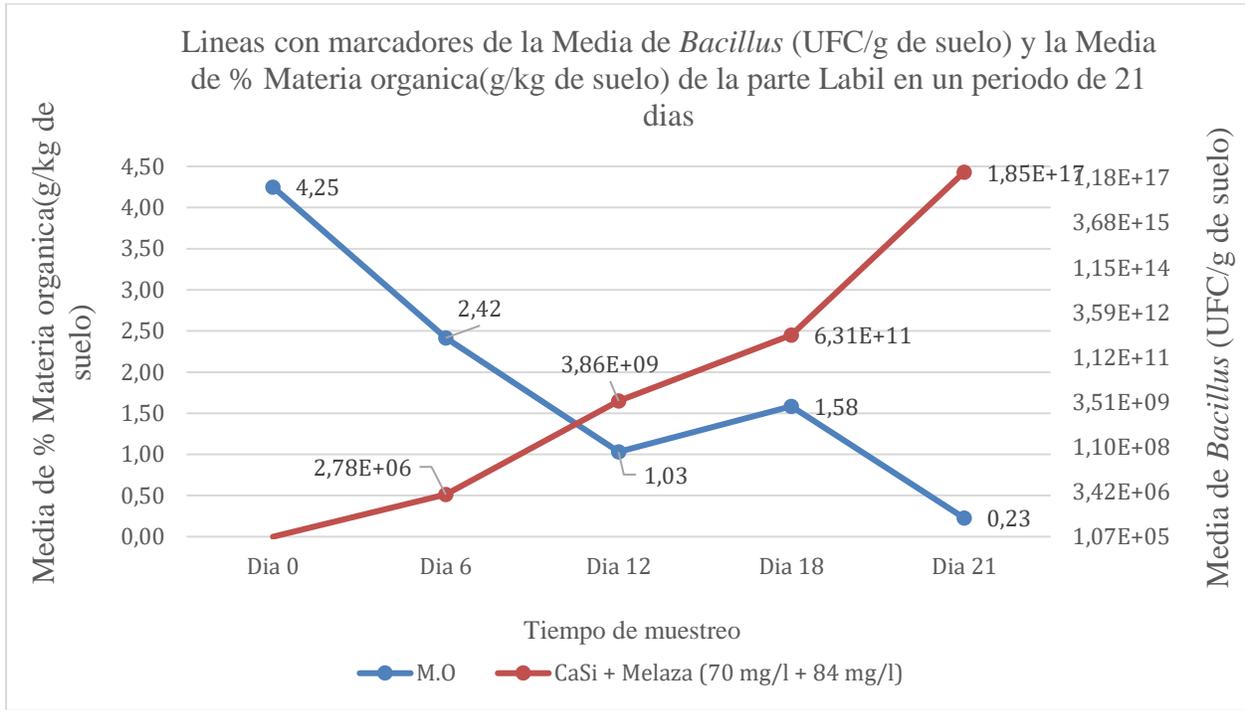
En la prueba post hoc de Tukey indica que a partir del día 12 y 21 de bioestimulación el tratamiento 3 conformado por SiCa + Melaza tuvo una diferencia significativa frente al tratamiento control, en donde este de aquí tuvo una disminución de materia orgánica de 4,25% a 0,23%. Esto se debió a la mayor presencia de microorganismos *Bacillus spp.*, similar a lo reportado por Inca & Salazar (2024), quienes lograron una reducción del 4.31% al 3.03% (Figura 4).

**Figura 4.** Degradación de materia orgánica en los 21 días de tratamiento.



Cabe destacar que el aumento de *Bacillus spp.* se logró con la aplicación de nutrientes y fuentes de carbono adicionales, lo cual sugiere una mejora en el metabolismo de los microorganismos, en la investigación realizada por Zambrano (2021), se constató que la mayor variedad de *Bacillus spp.* en el análisis microbiológico contribuyó a una significativa reducción de la carga de materia orgánica en la laguna de producción, llevándola a ser inferior al 2.2% (Figura 5). Este hallazgo sugiere que la diversidad de *Bacillus spp.* desempeña un papel importante en la eficiencia de la biorremediación, mejorando la calidad del suelo y del agua en sistemas acuícolas. En este estudio la presencia de concentraciones elevadas de *Bacillus spp.* puede aumentar la degradación de compuestos orgánicos complejos, optimizando así el proceso de biorremediación.

**Figura 5** Crecimiento de colonias de *Bacillus* spp., respecto a la degradación de materia orgánica.



#### IV. CONCLUSIONES

Podemos concluir que, al aplicar los insumos acuícolas como el SiCa y la melaza que son micronutrientes y fuente de carbono respectivamente, se logra bioestimular los *Bacillus* nativos presentes en los suelos acuícolas de baja salinidad, aumentando su carga lo que indica que puede ayudar a mejorar la calidad del suelo. Asimismo, en el número de colonias presentes y después de una caracterización se determinó la presencia de cuatro colonias: *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Bacillus megaterium*.

En cuanto a la concentración de *Vibrio*, se observa una reducción en su carga presente en el suelo. Este decrecimiento puede atribuirse a que el incremento de las colonias de *Bacillus* obtenidas después de la bioestimulación ayudaron en su control evitando así una carga excesiva de este género bacteriano.

Considerando los resultados obtenidos en cuanto a la materia orgánica, se denota una gran reducción, ya que se inició con 4,25% y se redujo a 0,23%. Esto indica que el incremento de *Bacillus* obtenidas después del proceso de bioestimulación, empleando los micronutrientes y la fuente de carbono, tienen grandes capacidades reductoras de materia orgánica.

De cara a futuros trabajos investigativos, este estudio presenta las bases de cómo la bioestimulación puede ser igual o más efectiva que la bioaumentación, aprovechando los microorganismos nativos del medio, que ya están adaptados a ese entorno. Esto asegura una buena efectividad en la degradación de materia orgánica y en el control de bacterias patógenas como el *Vibrio*.

## V. RECOMENDACIONES

- Se recomienda que futuros experimentos en los se utilice bioestimulación se incluyan organismos ya sean estos peces o camarones, para así evaluar su efectividad en el control y degradación de materia orgánica durante el cultivo de estas especies.
- Se sugiere realizar un análisis de los nutrientes presentes en el medio ya que se según eso se emplearía los insumos adecuados para la zona y así obtener una bioestimulación efectiva.
- Se podría realizar aislamiento de las bacterias obtenidas después de la bioestimulación para darle diversos usos según sea su campo de acción, para evitar así la compra de productos comerciales.
- Para una buena bioestimulación se recomienda obtener una aireación constante.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, A., Pucci, G., Morales, M., & Pucci, O. (2010). *Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de la Patagonia Argentina*. SciELO: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562010000100007](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562010000100007)
- Aguirre, D., Maridueña, M., & Ching, C. (2019). *Métodos de producción en el cultivo intensivo de camarón blanco (litopenaeus vannamei) en baja salinidad, una opción para familias emprendedoras*. Dialnet. doi:<https://doi.org/10.47189/rcct.v19i23.256>
- Ape, F., Manini, E., Quero, G., Luna, G., Sarà, G., Vecchio, P., . . . Mirto, S. (2019). *Biostimulation of in situ microbial degradation processes in organically-enriched sediments mitigates the impact of aquaculture*. ScienceDirect. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.178>
- Arcos, Y. (2013). *Microbiología de lodos activados*. Dialnet. doi:<https://doi.org/10.17533/udea.hm.21093>
- 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. doi:<https://doi.org/10.14409/fa.v19i2.9747>
- Beltrán, L., Berdugo, C., Zamora, A., Buitrago, G., & Moreno, N. (1998). *Estrategia para el diseño de un medio de cultivo para la fermentación con bacillus*. Dialnet. doi:<http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote>
- Boyd, C. (2002). *Aquaculture Pond Bottom Soil Quality Management*. Retrieved from ResearchGate:

[https://www.researchgate.net/publication/242592208\\_Aquaculture\\_Pond\\_Bottom\\_Soil\\_Quality\\_Management](https://www.researchgate.net/publication/242592208_Aquaculture_Pond_Bottom_Soil_Quality_Management)

Boyd, C. (2020). *Descomposición de materia orgánica en sistemas acuícolas - Responsible Seafood Advocate*. Global Seafood Alliance:

<https://www.globalseafood.org/advocate/descomposicion-de-materia-organica-en-sistemas-acuicolas/>

Buschman, A. (2001). *Impacto ambiental de la acuicultura*. Centro Tecnológico del Mar. <https://cetmar.org/DOCUMENTACION/dyp/ImpactoChileacuicultura.pdf>

Caballero, F. (2022). *Biorremediación: un proceso eficaz para la descontaminación de ecosistemas*. Revista Neuronum.

<https://eduneuro.com/revista/index.php/revistaneuronum/article/view/404>

Cárdenas, P., Cabello, R., Valdiviezo, L., & Munive, R. (2017). *Bioestimulación de bacterias autóctonas con adición de enmiendas en la degradación de cadenas hidrocarbonadas de suelos contaminados en la Refinería de petróleo Conchan en Lima-Perú, 2017*. Dialnet. doi:<https://doi.org/10.24054/01204211.v2.n2.2017.2879>

Carranza, E. (2020). *Evaluación de la tasa de consumo de oxígeno del *Penaeus vannamei* con relación a la salinidad, temperatura y peso corporal*. ResearchGate. doi:<http://dx.doi.org/10.5377/rct.v13i25.10412>

Caycedo, L., Corrales, L., & Trujillo, D. (2021). *Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química*. SciELO. doi:<https://doi.org/10.22490/24629448.5293>

- Colette, M., Guentas, L., Patrona, L., & Ansquer, D. (2023). *Dynamic of active microbial diversity in rhizosphere sediments of halophytes used for bioremediation of earthen shrimp ponds*. Environmental Microbiome . doi:<https://doi.org/10.1186/s40793-023-00512-x>
- Cuéllar, J. (2013). *Vibriosis*. The Center for Food Security & Public Health. <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/vibriosis-in-shrimp-es.pdf>
- Food and Agriculture Organization. (1993). *Nutricion y alimentacion de peces y camarones cultivados manual de capacacitacion*. FAO. <https://www.fao.org/3/AB492S/AB492S16.htm>
- Food and Agriculture Organization. (1998). *Métodos sencillos para la acuicultura - Suelo*. FAO. [https://www.fao.org/fishery/docs/CDrom/FAO\\_Training/FAO\\_Training/General/x6706s/Index.htm](https://www.fao.org/fishery/docs/CDrom/FAO_Training/FAO_Training/General/x6706s/Index.htm)
- Gómez, W., Gaviria, J., & Cardona, S. (2009). *Evaluación De La Bioestimulación Frente A La Atenuación Natural Y La Bioalimentación En Un Suelo Contaminado Con Una Mezcla De Gasolina - Diesel*. Dialnet: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7619820>
- González, F. (19 de January de 2020). *La inversión en la acuicultura*. «Terreno. PisciculturaGlobal»: <https://www.pisciculturaglobal.com/la-inversion-en-la-acuicultura-terreno/>
- 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*. ScienceDirect. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100503>

- Inca, P., & Salazar, D. (2024). *Biosurfactante producido por Bacillus Spp. aislados de suelo camaronero y su efecto sobre la biorremediación de fondos de piscinas acuícolas*. Repositorio UNEMI. <https://repositorio.unemi.edu.ec/bitstream/123456789/7277/1/INCA%20GUALACIO-%20SALAZAR%20ZAMBRANO.pdf>
- James, G., Das, B., Jose, S., & Rejish, V. (2021). *Bacillus as an aquaculture friendly microbe / Request PDF*. ResearchGate. doi:<https://link.springer.com/article/10.1007/s10499-020-00630-0>
- Kamilya, D., & Devi, W. (2022). *Bacillus Probiotics and Bioremediation: An Aquaculture Perspective / Request PDF*. ResearchGate. doi:[http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-85465-2\\_15](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-85465-2_15)
- Leyton, Y., & Riquelme, C. (2008). *Vibrios en los sistemas marinos costeros*. SciELO. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572008000300004>
- Lopes, G., Soligo, T., Yamashita, d., Martins, M., Loss, A., & Pedreira, J. (2021). *La biorremediación y sus beneficios a la producción acuícola y a los ambientes de cultivo*. Panorama Acuícola: <https://panoramaacuicola.com/2021/09/12/la-biorremediacion-y-sus-beneficios-a-la-produccion-acuicola-y-a-los-ambientes-de-cultivo/>
- Lopes, G., Soligo, T., Yamashita, E., Laterça, M., Loss, A., & Pedreira, J. (2020). *Biological strategy to improve decomposition of organic matter in tilapia pond*. SciELO. doi:<https://doi.org/10.1590/S2179-975X8419>
- López, E., Cisneros, S., & Ochoa, J. (2016). *Procesos de bioestimulación para la remediación de suelos agrícolas contaminados con tebuconazol y  $\lambda$ -cialotrina*. LÓPEZ, Erick†,

CISNEROS, Salvador, OCHOA, Jessica. ECORFAN®:

[https://www.ecorfan.org/bolivia/researchjournals/Simulacion\\_y\\_Laboratorio/vol3num8/Rvista\\_de\\_Simulacion\\_y\\_Laboratorio\\_V3\\_N8\\_1.pdf](https://www.ecorfan.org/bolivia/researchjournals/Simulacion_y_Laboratorio/vol3num8/Rvista_de_Simulacion_y_Laboratorio_V3_N8_1.pdf)

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*. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.775794>

Pérez, J. (2008). *Materia orgánica - Qué es, definición y concepto*. <https://definicion.de/materia-organica/>

Pine, H., Boyd, C., Roy, L., & Davis, D. (2012). *Influencia del tipo de suelo sobre el crecimiento del camarón en aguas de baja salinidad*. *ResearchGate*. doi:<http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.15326.02881>

Rivera, P., Rivera, J., Andrade, E., Heyer, L., Garza, F., & Castro, B. (2018). *Bioestimulación y biorremediación de recortes de perforación contaminados con hidrocarburos*. *SciELO*. doi:<https://doi.org/10.20937/rica.2018.34.02.06>

Ron, E., Tamayo, M., Plua del Valle, F., & Vera, K. (2020). *Técnicas eficientes para el monitoreo y evaluación de biorremediación*. *Panorama Acuícola Magazine*, 25(3),88-91. [https://issuu.com/designpublications/docs/panorama\\_acuicola\\_25-3\\_marzo\\_abril\\_2020\\_digital](https://issuu.com/designpublications/docs/panorama_acuicola_25-3_marzo_abril_2020_digital)

Sancllemente, O., García, M., & Valencia, F. (2011). *Efecto del uso de melaza y microorganismos eficientes sobre la tasa de descomposición de la hoja de caña (Saccharum officinarum)*. *Dialnet*. doi:<http://dx.doi.org/10.22490/21456453.920>

- Schipper, L. (2013). *Soil organic matter — Science Learning Hub*. Science Learning Hub:  
<https://www.sciencelearn.org.nz/videos/1248-soil-organic-matter>
- Schveitzer, R., Fonseca, G., Orteney, N., Temistocles, F., Fabiano, F., Thompson, C., & Bueno, G. (2020). *The role of sedimentation in the structuring of microbial communities in biofloc-dominated aquaculture tanks*. ScienceDirect.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734493>
- Tegene, B., & Tenkegna, T. (2020). *Fulltext / Mode of Action, Mechanism and Role of Microbes in Bioremediation Service for Environmental Pollution Management*. Scientific Research and Community. doi:[https://doi.org/10.47363/JBBR/2020\(2\)116](https://doi.org/10.47363/JBBR/2020(2)116)
- Toledo, A., Castillo, N., Carrillo, O., & Arenal, A. (2018). *Probióticos: una realidad en el cultivo de camarones. Artículo de revisión*. SciELO:  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2224-79202018000200009](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-79202018000200009)
- Tom, A., Jayakumar, J., Biju, M., Somarajan, J., & Ibrahim, M. (2021). *Aquaculture wastewater treatment technologies and their sustainability: A review*. ScienceDirect.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.nexus.2021.100022>
- Tyagi, M., da Fonseca, M., & de Carvalho, C. (2010). *Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes*. SpringerLink.  
doi:<https://doi.org/10.1007/s10532-010-9394-4>
- Villarreal, M., Villa, E., Cira, L., Estrada, M., Parra, F., & Santos, S. (2018). *El género Bacillus como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola*. Repositorio Universidad Jorge Tadeo Lozano. doi:<https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>

- Wang, J., Zhou, W., Huang, S., Wu, X., Zhou, P., Geng, Y., . . . Li, D. (2023). *Promoting effect and mechanism of residual feed organic matter on the formation of cyanobacterial blooms in aquaculture waters*. ScienceDirect. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.138068>
- Wang, M., Liu, Y., Luo, K., Li, T., Liu, Q., & Tian, X. (2022). *Effects of Bacillus pumilus BP-171 and Carbon Sources on the Growth Performance of Shrimp, Water Quality and Bacterial Community in Penaeus vannamei Culture System*. Water 2022, 14(24), 4037. MDPI. doi:<https://doi.org/10.3390/w14244037>
- Wang, Y., Zha, A., & Xu, Z. (2006). *Effects of probiotics on Penaeus vannamei pond sediments*. Chinese Journal of Applied Ecology 17(9):1765-7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17147196/>
- Zafra, A., Díaz, M., Luján, L., Dávila, F., & Vela, K. (2022). *Alimento vivo producido por el Biofloc en la crianza de Oreochromis aureus*. SciELO. doi:<http://doi.org/10.22497/arnaldoa.292.29104>
- Zambrano, I. (2021). *Microbiota bacteriana en fondo de laguna camaronera del humedal La Segura*. Repositorio ESPAM. <https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/1431/1/TTMA22D.pdf>
- Zambrano, M. (2018). *Comparación de un proceso de bioestimulación y la combinación de bioestimulación-bioaumentación para la degradación de boscalid, bifentrina y fenvalerato en suelo*. Repositorio UGTO. <http://repositorio.ugto.mx/bitstream/20.500.12059/1453/1/171017.pdf>

## VII. ANEXOS.

**Anexo 1.** Obtención de suelo acuícola de baja salinidad.



**Anexo 2.** Preparación de unidades experimentales.



**Anexo 3.** Pasaje de insumos para los tratamientos.



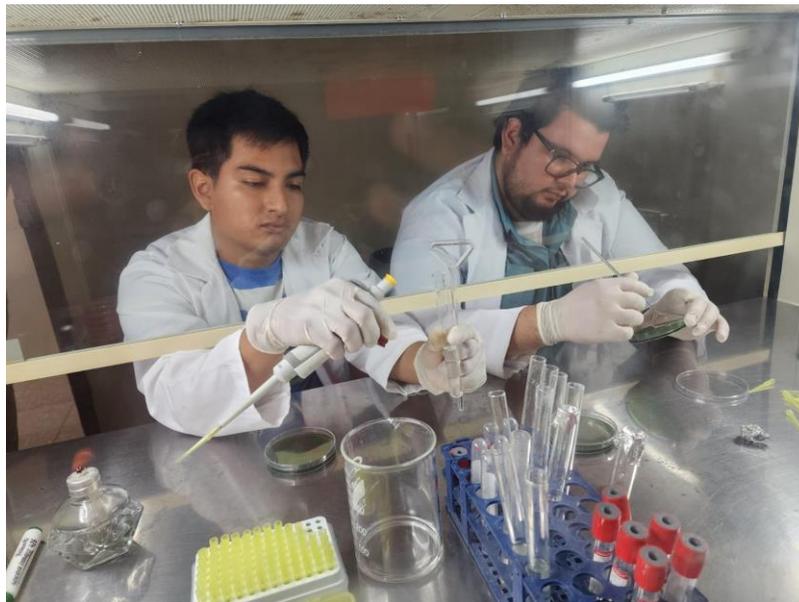
**Anexo 4.** Aplicación de tratamientos.



**Anexo 5.** Medición de parámetros físico-químicos.



**Anexo 6.** Siembra en placa



**Anexo 7.** Conteo de colonias de *Bacillus* spp *Bacillus* spp y *Vibrios* sp.



**Anexo 8.** Tamizado de muestras de suelo.



**Anexo 9.** Fase de digestión del suelo mediante ácido sulfúrico + dicromato de potasio.



**Anexo 10.** Fase de titulación mediante solución de sulfato ferroso amoniacal.



### 7.1. Método de Walkley & Black

El método de Walkley & Black fue llevado a cabo en el Laboratorio de Suelos, empleando la metodología que utilizó Barrezueta, et al. (2020)

1. Pesar 1 g de muestra de suelo seco tamizado a 300  $\mu\text{m}$ .
2. Ubicar la muestra pesada en un balón aforado de 100 ml.
3. Medir exactamente con una pipeta 10 ml de dicromato de potasio 1 N y agregarlo sobre la muestra.
4. Medir en un vaso graduado 10 ml de ácido sulfúrico concentrado y agregarlo cuidadosamente sobre la muestra, a través de las paredes del balón.
5. Agitar el balón y dejar en digestión durante 15 minutos o hasta el día siguiente.
6. Aforar el balón con agua destilada y dejar enfriar. Reestablecer exactamente el nivel del aforo cuando se haya enfriado la solución.
7. Extraer 20 ml de solución y colocarlo en un Erlenmeyer de 250 ml
8. Agregar en el Erlenmeyer 3 ml de ácido fosfórico al 85% y seis gotas de difenilamina ((C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>NH)
9. Titular con sulfato ferroso amoniacal 0,2 N hasta viraje a color verde claro.
10. Calcular el porcentaje (%) de CO mediante la siguiente ecuación:  
$$\% \text{ CO} = (\text{ml dicromato} - \text{ml sulfato}) \times 0.4$$