

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**MAESTRIA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA  
MOLECULAR**



**Caracterización molecular de bacterias nitrificantes  
heterotróficas aisladas de sedimentos de estanques en un cultivo  
RAS-BIOFLOC de *Litopenaeus vannamei* a baja salinidad**

**TESIS**

**Para optar el grado académico de Maestro en Ciencias con  
mención en Biotecnología Molecular**

**Autor: Jorge Isaac Borja Caicedo**

**Tumbes, 2024**

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

## ESCUELA DE POSGRADO

### MAESTRIA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR



### Caracterización molecular de bacterias nitrificantes heterotróficas aisladas de sedimentos de estanques en un cultivo RAS-BIOFLOC de *Litopenaeus vannamei* a baja salinidad

Tesis aprobada en forma y estilo por:

Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila (presidente)

Mg. Paul Ricardo Noblecilla Retamozo (secretario)

Ph. D. Benoit Mathieu Diringier (vocal)

Tumbes, 2024

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**MAESTRIA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA  
MOLECULAR**



**Caracterización molecular de bacterias nitrificantes  
heterotróficas aisladas de sedimentos de estanques en un cultivo  
RAS-BIOFLOC de *Litopenaeus vannamei* a baja salinidad**

**Los suscritos declaramos que la tesis es original en su contenido  
y forma:**

Br. Jorge Isaac Borja Caicedo (autor)

Jorge Borja

Ph.D. Vira Cedeño Escobar (asesora)

**Tumbes, 2024**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES  
Licenciada  
Resolución del Consejo Directivo N° 155-2019-SUNEDUCO  
**ESCUELA DE POSGRADO**  
Tumbes – Perú

Año del Bicentenario, de la consolidación de nuestra independencia, y de la conmemoración de las Heroicas Batallas de Junín y Ayacucho

**ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS**

En Tumbes, a los veintiséis días del mes de enero del dos mil veinticuatro, siendo las 11 horas y treinta minutos, en la modalidad virtual (link, <https://meet.google.com/npf-qext-qvd>) se reunieron el jurado calificador de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes designado con 154-2022/UNTUMBES-EPG-D (25 de marzo de 2022), Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila (presidente), Mtro. Paul Ricardo Noblecilla Retamozo (secretario), y el Ph.D. Benoit Mathieu Diringer (vocal), se procedió a evaluar, calificar y deliberar la sustentación de tesis titulada: **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS NITRIFICANTES HETEROTRÓFICAS AISLADAS DE SEDIMENTOS DE ESTANQUES EN UN CULTIVO RAS-BIOFLOC DE *Litopenaeus vannamei* A BAJA SALINIDAD**, para optar el grado académico de **MAESTRO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**, presentado por el:

**Maestrando: JORGE ISAAC BORJA CAICEDO**

Concluida la sustentación y absueltas las preguntas, por parte la sustentante y después de la deliberación el jurado según el artículo N° 65 del Reglamento de Tesis para Pregrado y Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes, declara (al): **Maestrando JORGE ISAAC BORJA CAICEDO**, aprobada con calificativo de **MUY BUENA**

En consecuencia, queda apta, para continuar con los trámites correspondientes a la obtención del grado académico de Maestro en Ciencias con mención en Biotecnología Molecular, de conformidad con lo estipulado en la Ley Universitaria N° 30220, el TUO del estatuto, Reglamento General, Reglamento General de Grados, Titulos y Reglamento de Tesis de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las doce horas y quince minutos, del mismo día, se dio por concluida la ceremonia académica, procediendo a firmar el acta en presencia de Público asistente.

Tumbes, 26 de enero de 2024

**Dr. DAVID EDILBERTO SALDARRIAGA YACILA**  
DNI N° 00320699  
ORCID N° 0000-0001-8870-2020  
Presidente

**Mtro. PAUL RICARDO NOBLECILLA RETAMOZO**  
DNI N° 00113722  
ORCID N° 0000-0003-1901-7462  
Secretario

**Ph.D. BENOIT MATHIEU DIRINGER**  
C.E. N° 000727051  
ORCID N° 0000-0001-6129-1751  
Vocal

**INFORME TURNITIN**

Caracterización molecular de  
bacterias nitrificantes  
heterotróficas aisladas de  
sedimentos de estanques en  
un cultivo RAS-BIOFLOC de  
*Litopenaeus vannamei* a baja  
salinidad

por Jorge Isaac BORJA CAICEDO

---

**Fecha de entrega:** 30-nov-2023 10:42a.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 2243133706

**Nombre del archivo:** Tesis\_Maestria\_Borja\_Caicedo\_Jorge\_Isaac.doc (16.3M)

**Total de palabras:** 13234

**Total de caracteres:** 74086



---

Ph.D. Virna Cedeño Escobar  
Asesora del Proyecto de Tesis

# Caracterización molecular de bacterias nitrificantes heterotróficas aisladas de sedimentos de estanques en un cultivo RAS-BIOFLOC de *Litopenaeus vannamei* a baja salinidad

## INFORME DE ORIGINALIDAD

<b>16%</b>	<b>11%</b>	<b>3%</b>	<b>9%</b>
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

<b>1</b>	<b>Submitted to Universidad Nacional de Tumbes</b> Trabajo del estudiante	<b>6%</b>
<b>2</b>	<b>repositorio.untumbes.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>2%</b>
<b>3</b>	<b>dk.um.si</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>4</b>	<b>hdl.handle.net</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>5</b>	<b>patents.google.com</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>6</b>	<b>Submitted to Universidad Francisco de Paula Santander</b> Trabajo del estudiante	<b>&lt;1%</b>
<b>7</b>	<b>epdf.pub</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>



Ph.D. Virna Cedeño Escobar  
Asesora del Proyecto de Tesis

8	<a href="http://www.scielo.org.mx">www.scielo.org.mx</a> Fuente de Internet	<1 %
9	<a href="http://microbiologyjournal.org">microbiologyjournal.org</a> Fuente de Internet	<1 %
10	<a href="http://repositoriodigital.ipn.mx">repositoriodigital.ipn.mx</a> Fuente de Internet	<1 %
11	Javier Alfonso Claros Bedoya. "ESTUDIO DEL PROCESO DE NITRIFICACIÓN Y DESNITRIFICACIÓN VÍA NITRITO PARA EL TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE CORRIENTES DE AGUA RESIDUAL CON ALTA CARGA DE NITRÓGENO AMONIAICAL", Universitat Politecnica de Valencia, 2012 Publicación	<1 %
12	<a href="http://www.smf.org.mx">www.smf.org.mx</a> Fuente de Internet	<1 %
13	<a href="http://anestesiario.org">anestesiario.org</a> Fuente de Internet	<1 %
14	<a href="http://repositorio.xoc.uam.mx">repositorio.xoc.uam.mx</a> Fuente de Internet	<1 %
15	<a href="http://revistabiociencias.uan.edu.mx">revistabiociencias.uan.edu.mx</a> Fuente de Internet	<1 %
16	<a href="http://www.investigarmqr.com">www.investigarmqr.com</a> Fuente de Internet	<1 %



Ph.D. Virna Cedeño Escobar  
Asesora del Proyecto de Tesis

17	Submitted to Universidad Militar Nueva Granada Trabajo del estudiante	<1 %
18	ddd.uab.cat Fuente de Internet	<1 %
19	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
20	www.alltech.com Fuente de Internet	<1 %
21	www.dspace.uce.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
22	eprints.port.ac.uk Fuente de Internet	<1 %
23	1library.co Fuente de Internet	<1 %
24	Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León Trabajo del estudiante	<1 %
25	docta.ucm.es Fuente de Internet	<1 %
26	tesis.ipn.mx Fuente de Internet	<1 %
27	Andrés Miguel Zornoza Zornoza. "ESTUDIO DE LA DINÁMICA POBLACIONAL DE PROTISTAS, METAZOOS Y BACTERIAS"	<1 %



Ph.D. Virna Cedeño Escobar  
Asesora del Proyecto de Tesis

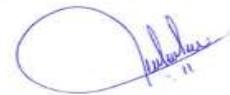
FILAMENTOSAS Y SU INTERPRETACIÓN  
ECOLÓGICA EN FANGOS ACTIVOS",  
Universitat Politecnica de Valencia, 2017

Publicación

---

28	<a href="http://cict.umcc.cu">cict.umcc.cu</a> Fuente de Internet	<1 %
29	<a href="http://iitca.uaemex.mx">iitca.uaemex.mx</a> Fuente de Internet	<1 %
30	<a href="http://repositorio.udec.cl">repositorio.udec.cl</a> Fuente de Internet	<1 %
31	<a href="http://vsip.info">vsip.info</a> Fuente de Internet	<1 %
32	<a href="http://www.researchgate.net">www.researchgate.net</a> Fuente de Internet	<1 %
33	<a href="http://www.unavarra.es">www.unavarra.es</a> Fuente de Internet	<1 %
34	<a href="http://repositorio.unapiquitos.edu.pe">repositorio.unapiquitos.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1 %
35	<a href="http://www.colibri.udelar.edu.uy">www.colibri.udelar.edu.uy</a> Fuente de Internet	<1 %

---



Ph.D. Virna Cedeño Escobar  
Asesora del Proyecto de Tesis

Excluir citas      Activo  
Excluir bibliografía      Activo

Excluir coincidencias      < 15 words

# ÍNDICE DE GENERAL

RESUMEN.....	XVI
ABSTRACT .....	XVII
CAPITULO I.....	18
1. INTRODUCCIÓN.....	18
2. REVISIÓN DE LITERATURA .....	20
2.1. Bases teóricas.....	20
2.1.1. Cultivo de <i>Litopenaeus vannamei</i> a baja salinidad .....	20
2.1.2. Sistema híbrido RAS-BIOFLOC .....	20
2.1.3. La nitrificación como parte del ciclo del nitrógeno.....	21
2.2. Antecedentes .....	23
2.2.1. Experiencias e investigaciones a nivel mundial.....	23
2.3. Definición de términos básicos.....	25
2.3.1. Bacterias nitrificantes autótrofas .....	25
2.3.2. Bacterias nitrificantes heterótrofas.....	26
2.3.3. Bacterias desnitrificantes .....	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
3.1. Tipo y diseño de investigación .....	27
3.2. Lugar y período de investigación .....	27
3.3. Preparación de medio selectivo para aislamiento de bacterias con actividades nitrificantes.....	28
3.4. Aislamiento de bacterias nitrificantes de sedimentos del cultivo RAS-BIOFLOC.....	29
3.4.1. Toma de muestra.....	29
3.4.2. Enriquecimiento con medio específico.....	29
3.4.3. Diluciones seriadas .....	29
3.4.4. Siembra en medio sólido .....	30
3.4.5. Obtención de cultivo axénico.....	30
3.5. Identificación de genes involucrados en procesos de nitrificación.....	30
3.5.1. Extracción de ADN .....	31
3.5.2. Amplificación por pcr de los genes <i>amoA</i> , <i>nxB</i> Y 16S ARNr .....	31
3.6. Selección de cepas bacterianas nitrificantes .....	32
3.6.1. Inoculación con bacterias nitrificantes heterótrofas .....	32
3.7. Caracterización molecular de los aislados bacterianos seleccionados .....	33
3.7.1. Análisis bioinformático .....	33
3.8. Evaluación <i>in vitro</i> del potencial nitrificante de aislados seleccionados.....	33

3.9.	Formulación de consorcios bacterianos .....	34
3.9.1.	Evaluación <i>in vivo</i> del consorcio bacteriano.....	34
3.9.2.	Análisis estadístico.....	35
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
4.1.	Aislamiento de cepas bacterianas nitrificantes.....	36
4.2.	IDentificación de genes implicados en procesos de nitrificación.....	37
4.3.	Selección de bacterias nitrificantes heterotróficas.....	39
4.4.	Caracterización molecular de los aislados bacterianos seleccionados.....	42
4.5.	Evaluación <i>in vitro</i> del potencial nitrificante de cepas seleccionadas.....	43
4.6.	Identificación de consorcio de los aislados bacterianos.....	47
4.6.1.	Evaluación <i>in vivo</i> del consorcio bacteriano.....	51
5.	CONCLUSIONES.....	54
6.	RECOMENDACIONES.....	55
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56
	ANEXOS .....	65

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Características morfológicas de los aislados bacterianos. Medio mineral nitrificante de amonio (MMNA) y de nitrito (MMNN).</i> .....	37
Tabla 2. <i>Identificación de genes específicos relacionados en los procesos de nitrificación en las cepas evaluadas.</i> .....	38
Tabla 3. <i>Evaluación de la capacidad nitrificante de bacterias de remoción de amonio.</i> ....	40
Tabla 4. <i>Evaluación de la capacidad nitrificante de bacterias de remoción de nitrito.</i> .....	41
Tabla 5. <i>Caracterización molecular y clasificación filogénica de ocho cepas bacterianas heterotróficas aisladas.</i> .....	43
Tabla 6. <i>Formulación de consorcios con aislados bacterianos.</i> .....	49
Tabla 7. <i>Prueba t para la igualdad de medias entre grupo experimental y control.</i> .....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de ubicación del área de ensayo, Manta - Ecuador.....	28
Figura 2. Características de nitrificación heterótrofa de las cepas seleccionadas con amonio ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) como única fuente de nitrógeno en condiciones aeróbicas.....	46
Figura 3. Características de nitrificación heterótrofa de las cepas seleccionadas con nitrito ( $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ) como única fuente de nitrógeno en condiciones aeróbicas. ....	47
Figura 4. Características de nitrificación de los consorcios bacterianos (CNH1- CNH15) con amonio ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) y nitrito ( $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ) como fuentes de nitrógeno .....	50
Figura 5. Evaluación In vivo del consorcio nitrificante CNH12.....	53

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Modulo escala sistema súper intensivo hibrido RAS – BIOFLOC a baja salinidad.....	65
Anexo 2. Preparación de medios de cultivo selectivo para aislamiento de bacterias nitrificantes heterotróficas. ....	66
Anexo 3. Aislamiento bacterias nitrificantes heterotróficas. ....	66
Anexo 4. Extracción de ADN de los aislados bacterianos nitrificantes.....	67
Anexo 5. Evaluación <i>In vivo</i> del consorcio bacteriano. ....	67
Anexo 6. Detección de genes funcionales en los aislados bacterianos. ....	68
Anexo 7. Alineamiento de secuencias del gen ARNr 16S de los aislados nitrificantes mediante el programa BIOEDIT.....	68
Anexo 8. Comparación de secuencias obtenidas en la base de datos NCBI mediante la herramienta BLAST.....	69
Anexo 9. Análisis filogenético de cepas bacterianas aisladas.....	70
Anexo 10. Evaluación del potencial nitrificante de los aislados bacterianos. ....	71

## RESUMEN

La acuicultura intensiva conlleva a riesgos de cultivo principalmente la acumulación de amoníaco y nitrito altamente tóxicos para la población en crianza. La nitrificación heterotrófica ha tomado relevancia en los últimos años principalmente por sus altas tasas de remoción. El objetivo de este trabajo fue caracterizar molecularmente bacterias nitrificantes heterotróficas aisladas de sedimentos de un cultivo súper intensivo híbrido RAS-BIOFLOC de *L. vannamei* a baja salinidad. El aislamiento se realizó en medios específicos de nitrificación heterotrófica con amonio y nitrito a concentraciones de 10 mg/L. La PCR fue empleada para la amplificación de genes funcionales amoA, nxrB y el universal ARNr 16S el cual fue sometido a secuenciación de Sanger, los datos fueron analizados mediante Bioedit, Blast y Mega-X. Se logró el aislamiento de 21 cepas de las cuales CBM3, CBM12 y CBM16 mostraron capacidad de remoción de amonio con tasas de nitrificación de 1,95, 0,31 y 0,50 mg/L por hora, respectivamente. Mientras que la remoción de nitrito por CBM17, CBM18 y CBM21 fue de 0,63, 0,58 y 0,28 mg/L por hora, respectivamente. Las cepas CBM10 y CBM14 mostraron capacidad de nitrificación completa con tasas de remoción de amonio de 0,83 y 0,42 mg/L por hora y nitrito 1,25 y 0,83 mg/L por hora, respectivamente. Se comprobó mediante PCR la presencia de genes amoA y nxrB en los aislados. Las ocho cepas nitrificantes fueron identificadas como: *Acinetobacter harbinensis* (CBM3), *Pseudomonas baleárica* (CBM10), *P. stutzeri* (CBM12), *P. taiwanensis* (CBM14), *Enterobacter cloacae* (CBM16), *P. nitroreducens* (CBM17), *P. putida* (CBM18) y *Bacillus amyloliquefaciens* (CBM21). Se estableció un consorcio CNH12 conformado por CBM3, CBM10, CBM12, CBM14, CBM17 y CBM18 con tasa de nitrificación de amonio y nitrito de 3,3 y 2,5 mg/L por hora, respectivamente. Estos hallazgos sugieren que CNH12 tendría un uso potencial en la eliminación biológica de nitrógenos en sistemas acuícolas.

**PALABRAS CLAVES:** Bacterias nitrificantes heterotróficas, *Litopenaeus vannamei*, RAS-BIOFLOC, Sanger

## ABSTRACT

Intensive aquaculture entails farming risks, mainly the accumulation of ammonia and nitrite that are highly toxic to the reared population. Heterotrophic nitrification has become relevant in recent years mainly due to its high removal rates. The objective of this work was to molecularly characterize heterotrophic nitrifying bacteria isolated from sediments of a super-intensive hybrid RAS-BIOFLOC culture of *L. vannamei* at low salinity. The isolation was carried out in specific heterotrophic nitrification media with ammonium and nitrite at concentrations of 10 mg/L. PCR was used for the amplification of functional genes *amoA*, *nxrB* and the universal 16S rRNA, which was subjected to Sanger sequencing. The data were analyzed using Bioedit, Blast and Mega-X. The isolation of 21 strains was achieved, of which CBM3, CBM12 and CBM16 showed ammonium removal capacity with nitrification rates of 1.95, 0.31 and 0.50 mg/L per hour, respectively. While the nitrite removal by CBM17, CBM18 and CBM21 was 0.63, 0.58 and 0.28 mg/L per hour, respectively. Strains CBM10 and CBM14 showed complete nitrification capacity with ammonium removal rates of 0.83 and 0.42 mg/L per hour and nitrite 1.25 and 0.83 mg/L per hour, respectively. The presence of *amoA* and *nxrB* genes in the isolates was verified by PCR. The eight nitrifying strains were identified as: *Acinetobacter harbinensis* (CBM3), *Pseudomonas balearica* (CBM10), *P. stutzeri* (CBM12), *P. taiwanensis* (CBM14), *Enterobacter cloacae* (CBM16), *P. nitroreducens* (CBM17), *P. putida* (CBM18) and *Bacillus amyloliquefaciens* (CBM21). A CNH12 consortium was established consisting of CBM3, CBM10, CBM12, CBM14, CBM17 and CBM18 with ammonium and nitrite nitrification rates of 3.3 and 2.5 mg/L per hour, respectively. These findings suggest that CNH12 would have potential use in biological nitrogen removal in aquaculture systems.

**KEY WORDS:** Heterotrophic nitrifying bacteria, *Litopenaeus vannamei*, RAS-BIOFLOC, Sanger

## CAPITULO I

### INTRODUCCIÓN

El sistema de acuicultura súper intensiva híbrido RAS – BIOFLOC es una estrategia que combina el sistema de recirculación acuícola (RAS por sus siglas en ingles), con un sistema biofloc de cero descargas de agua donde es común encontrar altos niveles de materia orgánica y acumulación de compuestos nitrogenados tóxicos como amoníaco, nitrito y nitrato causando el deterioro de la calidad del agua y por ende de la salud de los animales cultivados. La eliminación biológica de estos compuestos es realizada mediante el uso de bacterias nitrificantes siendo ampliamente utilizadas para el tratamiento de aguas eutrofizadas en estos tipos de sistemas acuícolas cerrados.

La definición convencional de nitrificación incluye un proceso de dos etapas, inicialmente un grupo de bacterias oxidan el nitrógeno amoniacal total (NAT) el cual incluye  $\text{NH}_3\text{-N}$  (amoníaco) y  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  (amonio) como fuente de energía produciendo  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  (nitrito), este proceso es catalizado por dos enzimas la amonía monooxigenasa (AMO) e hidroxilamina oxidoreductasa (HAO) (Lehtovirta, 2018). En un segundo paso otro grupo de bacterias oxidan el  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  generando como producto final  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ , esta oxidación es catalizada por la enzima nitrito oxidoreductasa (NXR) (Daims *et al*, 2016). Para completar el proceso de nitrificación se requiere la participación de bacterias heterotróficas desnitrificantes las cuales en condiciones anóxicas realizan la reducción de nitrato a formas gaseosas de nitrógeno regresándolo al ambiente y eliminándolo del cuerpo de agua (Ambus y Zechmeister, 2007).

Debido a la diferencia en la fisiología de los grupos microbianos involucrados, estos procesos presentan algunas desventajas como bajas tasas de nitrificación debido al lento crecimiento de los nitrificantes autótrofos. Además, la diferencia en las condiciones de aireación para nitrificación y anóxicas para desnitrificación

provoca que estos dos procesos se produzcan por separado y demanda de mucho tiempo (Guisasola *et al*, 2007).

En los últimos años buscando alternativas a esta problemática se han llevado a cabo trabajos que involucran bacterias heterótrofas identificando varias especies capaces de realizar el proceso de nitrificación logrando detectar los genes funcionales codificantes de las enzimas AMO y NXR, además se han encontrado bacterias capaces de realizar simultáneamente la nitrificación y desnitrificación en condiciones aeróbicas. Este grupo bacteriano ha mostrado muchas ventajas sobre los procesos de oxidación autotrófica que incluye tasas de nitrificación más eficientes, proliferación microbiana rápida, nitrificación y desnitrificación simultáneas (NAT - NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N – NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N – N<sub>2</sub>-N) con *acumulaciones muy bajas o incluso nula de nitrito/nitrato* (Mendoza *et al*, 2019, Zhou *et al*, 2014 y Duan *et al*, 2022).

La identificación y caracterización de bacterias nitrificantes en muestras ambientales requieren el uso de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), secuenciación de ADN y herramientas bioinformáticas como BioEdit, Blast, Mega-X, etcétera debido a la variedad de especies y similitud morfológica entre cepas. Estas herramientas permiten analizar filogenéticamente genes marcadores funcionales de bacterias nitrificantes que codifican para enzimas claves involucradas en vías metabólicas específicas como AMO, HAO y NXR (Ramanathan *et al*, 2017).

El gen marcador funcional comúnmente utilizado en bacterias oxidadoras de amonio (BOA) es el gen *amoA*, generalmente se amplifica un fragmento de 491 pares de bases (Junier *et al*, 2010 y Rotthauwe *et al*, 1997). Para las bacterias oxidadoras de nitrito (BON) el gen *nxB* es el marcador funcional más utilizado y comúnmente se amplifica un fragmento de alrededor de 485 pares de bases (Pester *et al*, 2014).

En este contexto, el presente trabajo tuvo como objetivos aislar, caracterizar molecularmente y evaluar bacterias heterotróficas con actividades nitrificantes a partir de sedimentos de un cultivo RAS-BIOFLOC de *L. vannamei* a baja salinidad.

## **CAPITULO II**

### **REVISIÓN DE LITERATURA**

#### **2.1. Bases teóricas**

##### **2.1.1. Cultivo de *Litopenaeus vannamei* a baja salinidad**

El camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* es una especie eurihalina tropical que se ha cultivado en todo el mundo en sistemas extensivos, semi-intensivos, intensivos y en los últimos años en sistemas súper-intensivos (Suantika *et al*, 2018); con capacidad de vivir en aguas que poseen un amplio rango de concentraciones de sales con una salinidad óptima para su crecimiento y desarrollo de 20 a 25 ppt, pero se ha logrado cultivar en una amplia gama de salinidades entre 0,5 a 45 ppt (Chong-Robles *et al*, 2014).

Sin embargo, cuando los animales se enfrentan a estrés por salinidad se ven obligados a adaptaciones fisiológicas en relación al entorno cambiante mediante la osmorregulación para mantener la homeostasis iónica interna, que permite el funcionamiento normal de los procesos celulares y fisiológicos mediante el cambio de varias enzimas, estos cambios funcionales exigen una gran cantidad de energía por lo que el animal se encuentra más susceptible (Chong-Robles *et al*, 2014). La susceptibilidad del camarón especialmente a amoníaco y nitrito aumenta drásticamente en aguas de baja salinidad. En aguas con salinidades entre 2 y 4 ppt, tanto el amoníaco como el nitrito deben mantener por debajo de 1 mg/L, valores más altos pueden ocasionar la muerte del camarón (Samocha y Prangnell, 2019).

##### **2.1.2. Sistema híbrido RAS-BIOFLOC**

Generalmente estos son los dos tipos de sistemas cerrados más utilizados en la industria de la acuicultura donde el principio básico del sistema de recirculación acuícola (RAS por sus siglas en inglés) radica en el tratamiento del agua de cultivo a través de una serie de procesos consecutivos de filtraciones física/mecánica y unidades de biofiltración donde se utilizan bacterias nitrificantes

para la eliminación de amoníaco y nitrito. Sin embargo, aunque este sistema es altamente eficiente para el mantenimiento de la calidad del agua su costo operativo específicamente sus costos de electricidad hace que este sistema sea poco viable para su aplicación a nivel de finca.

Por otra parte, en el sistema BIOFLOC el agua de cultivo se mantiene mediante manipulación microbiana en la columna de agua del tanque; este consorcio microbiano consta estratégicamente de diversos microorganismos que pueden ser funcionales en el reciclaje de nutrientes contaminantes, para la purificación del agua, el control de patógenos y como fuente de suplementación alimenticia; dentro de este circuito microbiano se encuentran las bacterias nitrificantes las cuales juegan un rol crucial en la conversión de los residuos nitrogenados tóxicos dentro del cultivo (Crab *et al*, 2012, van Beijnen y Gregg Yan, 2019).

Aunque el costo operativo para mantener la calidad del agua en un sistema biofloc es relativamente bajo comparado con RAS, la capacidad de carga de materia orgánica en el sistema no es lo suficientemente tolerante como para soportar un largo período de cultivo súper intensivo de camarón sin recambios; es por ello, que la utilización de ambos sistemas utilizando una tecnología híbrida que permita complementar las ventajas de cada sistema es mucho más viable (Fleckenstein *et al*, 2018 y Suantika *et al*, 2018).

### **2.1.3. La nitrificación como parte del ciclo del nitrógeno**

La nitrificación es un proceso microbiano mediante el cual los compuestos nitrogenados amoniacales se oxidan secuencialmente a nitrito y nitrato; principalmente mediante dos grupos de bacterias nitrificantes quimiolitotróficas y en un tercer paso otro grupo de bacterias heterotróficas conocidas como desnitrificantes son responsables de convertir los nitratos acumulados por el proceso de nitrificación en nitrógenos gaseoso eliminándolos de esta forma del agua de cultivo. Este proceso conlleva un largo periodo de tiempo debido a la baja tasa de crecimiento de las bacterias quimiolitotróficas y a que el proceso de nitrificación y desnitrificación son llevados a cabo en condiciones diferentes. (Lehtovirta, 2018, Ambus y Zechmeister, 2007).

El proceso de nitrificación puede ser también llevado a cabo por bacterias heterotróficas que reclutan en sus genomas los genes para las enzimas claves responsables de este proceso AMO, HOA y NXR (Daims *et al*, 2016). La nitrificación heterótrofa muestra tasas de nitrificación altamente eficientes, proliferación microbiana rápida, nitrificación y desnitrificación simultáneas acumulando concentraciones muy bajas de nitrito y nitrato dentro del tanque de cultivo (Zhou *et al*, 2014 y Duan *et al*, 2022).

Este grupo microbiano son un pequeño clado taxonómico en el medio ambiente y se encuentran en los lugares donde están presentes cantidades considerables de amonio y nitrito. Dentro del grupo de bacterias nitrificantes heterotróficas se han reportado una gran diversidad de géneros como *Thiosphaera*, *Paracoccus*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*; etcétera (Duan *et al*, 2022).

#### **a) Enzimas claves en la nitrificación**

La oxidación microbiana del amoníaco a nitrito es una parte crítica del ciclo biogeoquímico global del nitrógeno y el primer paso en la nitrificación; este proceso puede ser llevado a cabo por bacterias oxidantes de amoníaco autotróficas (BOA), bacterias nitrificantes heterotróficas (BNH), arqueas oxidantes de amoníaco (AOA) y bacterias comammox. Todos estos microorganismos pueden llevar a cabo este proceso gracias a que cuentan en sus genomas con las enzimas amoniaco monooxigenasa (AMO) e hidroxilamina oxidorreductasa (HAO).

El nitrito producido en la primera etapa de la nitrificación puede ser oxidado a nitrato mediante las bacterias oxidantes de nitrito autotróficas (BON), bacterias nitrificantes heterotróficas (BNH) y bacterias comammox. Debido a que cuentan en su genoma con el gen NXR responsable de la expresión de la enzima clave nitrito oxidorreductasa (Daims *et al*, 2016).

#### **b) Amoniac monooxigenasa (AMO)**

Los microorganismos oxidantes del amoniaco obtienen energía metabólica mediante la oxidación preliminar de amoniaco/amonio a hidroxilamina; este paso enzimático vital es llevado a cabo por la enzima amoniaco monooxigenasa (AMO); el operón AMO consta de al menos tres genes,

amoA, amoB y amoC; de estos el gen amoA (codifica la subunidad que contiene el sitio activo de la enzima) es generalmente el gen marcador funcional más utilizado para el estudio de microorganismos oxidantes de amoníaco y ha sido indispensable para la identificación de este tipo de microorganismos y comprender sus mecanismos biológicos (Norton *et al*, 2002 y Pjevac *et al*, 2017).

### **c) Hidroxilamina oxidorreductasa**

La enzima hidroxilamina oxidorreductasa (HAO) es la responsable de catalizar la conversión de hidroxilamina a nitrito. Generalmente se conoce que el amoníaco/amonio se oxida a hidroxilamina por la enzima amoníaco monooxigenasa (AMO) unida a la membrana y posteriormente la hidroxilamina se oxida a nitrito mediante la acción de la enzima periplásmica hidroxilamina oxidorreductasa (Hirota *et al*, 2006).

### **d) Nitrito oxidorreductasa (NXR)**

La enzima nitrito oxidorreductasa (NXR) es la responsable de catalizar la conversión de nitrito a nitrato en todos los microorganismos oxidantes de nitrito. NXR, es un complejo enzimático esencial de las membranas de las bacterias oxidantes de nitritos (BON), es una molibdo proteína de hierro y azufre unida a la membrana plasmática; compuesta por tres subunidades, nxrA, nxrB y nxrC (Holmes *et al*, 2019). De los cuales los genes nxrA y especialmente el gen nxrB son potentes marcadores funcionales y filogenéticos para detectar e identificar BON (Daims *et al*, 2016).

## **2.2. Antecedentes**

### **2.2.1. Experiencias e investigaciones a nivel mundial**

Previos autores han estudiado la comunidad bacteriana nitrificante presente en sistemas RAS-Biofloc demostrando el papel importante que juegan estos microorganismos en la disminución de los compuestos nitrogenados tóxicos amoníaco y nitrito para este sistema, sin embargo, estos estudios se han enfocado en bacterias nitrificantes autotróficas, a la fecha no existe un reporte que indique el papel de las bacterias nitrificantes heterotróficas dentro del sistema

RAS-Biofloc, las cuales han demostrado presentar tasas de remoción más eficientes que los autotróficos en otros sistemas lo cual abre la puerta a esta investigación.

Autores como Xu *et al* (2020) estudiaron las **características de la eliminación de amoníaco y las comunidades microbianas nitrificantes en un cultivo RAS-Biofloc intensivo de *L. vannamei***. En este estudio, la eliminación de amoníaco para la producción intensiva de camarón se realizó mediante la combinación de biofloc suspendido y biopelícula adherida ex situ. Se observó un retraso a corto plazo en el establecimiento de la nitrificación autotrófica, con ligeros aumentos en las concentraciones de NAT y NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N, necesitando de dos a tres semanas para crecer en cantidades suficientes y hacer frente al aumento de amoníaco. Encontraron que los géneros nitrificantes de arqueas *Nitrosopumilus*, *Nitrosopelagicus* y bacterianos *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* fueron los más abundantes, ellos argumentan que el agua eutrófica en el tanque de cultivo fue más favorable para el rápido crecimiento de los heterótrofos, restringiendo así el enriquecimiento de microorganismos nitrificantes de crecimiento lento y dominados por autótrofos en el biofloc.

Hastuti *et al* (2019), llevaron a cabo la **Identificación y caracterización de bacterias nitrificantes en sistemas de recirculación (RAS) en un cultivo de cangrejo de lodo (*Scylla serrata*) mediante secuenciación de 16S ARNr**, las bacterias nitrificantes fueron aisladas de una muestra de agua previamente cultivada en medio específico haciendo uso de diluciones seriadas (10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-5</sup>). El ADN genómico fue amplificado por PCR para lo cual utilizaron el par de cebadores de ARNr 16S 63F y 1387R, las secuencias obtenidas mediante secuenciación fueron sometidas a BLAST-N en NCBI y Mega 6, logrando el aislamiento de cinco cepas nitrificantes heterótrofas identificadas y caracterizadas como: *Pantoea* sp., *P. calida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Halomonas* sp. y *Salinicola salaries*. Este trabajo demostró la gran utilidad de las herramientas moleculares para llevar a cabo estudios relacionados con filogenia y evaluaciones de bacterias nitrificantes.

De igual forma **Shu *et al* (2022)**, estudiaron **las características de eliminación de nitrógeno y posible aplicación de bacterias heterótrofas nitrificantes-**

**aeróbicas desnitrificantes *Pseudomonas mendocina* S16 y *Enterobacter cloacae* DS'5 aisladas de estanques de aguas de acuicultura.** Dos cepas nitrificantes bioseguras fueron aisladas de estanques de acuicultura de agua dulce y mostraron capacidades significativas de nitrificación heterótrofa y desnitrificación aeróbica. Con eficiencias de eliminación de nitrógeno de S16 y DS'5 igual a 66,59 – 97,97% y 72,27 – 96,44%, respectivamente. La amplificación por PCR demostró la presencia de los genes de desnitrificación (nap + nar) en ambas cepas. Las eficiencias de eliminación de nitrógeno de las dos cepas en sistemas de cultivo de inmovilización fueron 79,80 – 98,58% (S16) y 60,80 – 98,40% (DS'5). Este estudio indicó el gran potencial de aplicación de bacterias nitrificantes heterotróficas en el tratamiento de aguas residuales de acuicultura.

Zhou *et al* (2014) realizaron el **aislamiento y caracterización de una nueva bacteria heterótrofa nitrificante y aeróbica desnitrificante *Pseudomonas stutzeri* KTB para la biorremediación de aguas residuales;** logrando el aislamiento de una cepa bacteriana con capacidad de realizar nitrificación y desnitrificación simultáneas por sí misma, fue identificada como *Pseudomonas stutzeri* mediante secuenciación del gen ARNr 16S. Esta cepa fue evaluada en presencia de nitrato, nitrito y amonio mostrando una tasa de nitrificación de 0,239, 0,362 y 0,361 mg/L por hora, respectivamente. Con sus resultados demostraron que esta cepa fue capaz de llevar a cabo una ruta completa de nitrificación y desnitrificación por lo que esta cepa podría ser una gran candidata para la eliminación biológica de compuestos de nitrógeno de agua de acuicultura.

## **2.3. Definición de términos básicos**

### **2.3.1. Bacterias nitrificantes autotrófas**

“Los nitrificadores autótrofos reducen el carbono inorgánico para formar carbono orgánico en la masa celular, producen y liberan productos microbianos solubles (SMP) en solución a partir del metabolismo del sustrato (generalmente con crecimiento de biomasa) y biomasa en descomposición” (Kindaichi *et al*, 2004, 2). Estas bacterias “Utilizan las enzimas amoníaco monooxigenasa (AMO) e hidroxilamina deshidrogenasa (HAO) para la oxidación del amoníaco y nitrito oxidorreductasa (NXR) para la oxidación de nitrito” (Daims *et al*, 2016, 7).

### **2.3.2. Bacterias nitrificantes heterótrofas**

“Los nitrificadores heterótrofos necesitan compuestos orgánicos como fuente de energía, a diferencia de los nitrificadores quimiolitotróficos. La mayoría de las vías potenciales para la producción de nitritos/nitratos por parte de heterótrofos pueden considerarse metabolismo secundario. Sólo se sabe que la nitrificación y la desnitrificación simultánea por parte de algunas bacterias heterótrofas tienen relación con el metabolismo energético. Algunas bacterias heterótrofas que oxidan el amoníaco tienen amoníaco monooxigenasa (AMO), pero también hay bacterias heterótrofas que oxidan el amoníaco sin AMO” (Martikainen, 2022).

### **2.3.3. Bacterias desnitrificantes**

La desnitrificación heterótrofa convierte el nitrato generado por la nitrificación autótrofa en gas nitrógeno. “Las bacterias desnitrificantes anaeróbicas utilizan una fuente de carbono orgánico como donante de electrones para reducir el nitrato y transformar el nitrito en gas nitrógeno” (Li *et al.*, 2023, 2). La desnitrificación completa es la reducción secuencial de  $\text{NO}_3^-$ -N a  $\text{NO}_2^-$ -N, NO-N,  $\text{N}_2\text{O}$ -N y finalmente a  $\text{N}_2$ . “Cuatro enzimas, a saber, nitrato reductasa (NaR), nitrito reductasa (NIR), óxido nítrico reductasa (NOR) y óxido nitroso reductasa (NOS), participan en la reducción de  $\text{NO}_3^-$ -N”. (Wu *et al.*, 2020, 15).

## **CAPITULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Tipo y diseño de investigación**

Este estudio de acuerdo al fin que se persigue fue de tipo descriptivo con un enfoque de investigación aplicado.

#### **3.2. Lugar y período de investigación**

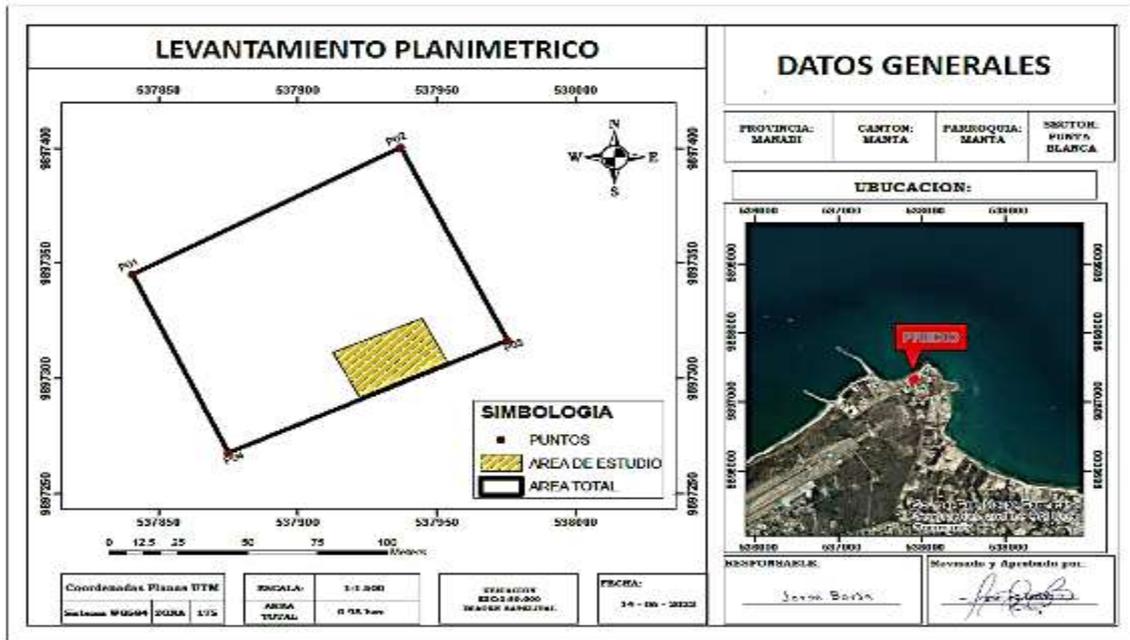
Esta investigación se llevó a cabo en un periodo de 120 días en el Centro De Biotecnología Acuícola Sostenible (CBAS) ubicado en Manta-Ecuador (Anexo 1).

##### **a) Coordenadas geográficas en el sistema UTM (Figura 1):**

- P01: 537 956,574 m E, 9 897 384.814 m N
- P02: 537 975,504 m E, 9 897 315,486 m N
- P03: 537 876,143 m E, 9 897 275,45 m N
- P04: 537 858,079 m E, 9 897 329,369 m N

Figura 1.

Mapa de ubicación del área de ensayo Manta Ecuador.



### 3.3. Preparación de medio selectivo para aislamiento de bacterias con actividades nitrificantes

Se formularon medios específicos para el crecimiento de bacterias nitrificantes heterotróficas oxidadoras de amonio y nitrito en base a lo reportado por Fujitani *et al*, 2015 y Spieck *et al*, 2020, modificados en este trabajo con los siguientes componentes (Anexo 2):

#### **a) Medio mineral de nitrificación de amonio (mmna)**

50 mg/L de Sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), 50 mg/L de Sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 150 mg/L de Fosfato dipotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 0,0338 mg/L de Sulfato de manganeso monohidratado ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), 0,0494 mg/L de Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), 0,0431 mg/L de Sulfato de zinc heptahidratado ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 0,0371 mg/L de Molibdato de sodio dihidratado ( $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 0,973 mg/L de Sulfato de hierro heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ), 0,025 mg/L de Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), 37,8 mM de Glicerol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ) como fuente de carbono orgánica, pH igual a 7,83 (Fujitani *et al*, 2015).

#### **b) Medio mineral de nitrificación de nitrito (MMNN)**

40 mg/L de Nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ), 10 mg/L de Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ), 40 mg/L de Sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 120 mg/L de Fosfato dipotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 0,0338 mg/L de sulfato de manganeso monohidratado  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,0494 mg/L de Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), 0,0431 mg/L de Sulfato de zinc heptahidratado ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 0,0371 mg/L de Molibdato de sodio dihidratado ( $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 0,973 mg/L de Sulfato de hierro heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ), 0,025 mg/L de Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), 37,8 Mm de Glicerol  $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ , pH igual a 8 (Spieck *et al*, 2020).

### **3.4. Aislamiento de bacterias nitrificantes de sedimentos del cultivo RAS-BIOFLOC**

#### **3.4.1. Toma de muestra**

Se tomaron muestras de 50 ml de sedimentos de diferentes puntos del sistema de cultivo de camarón RAS-BIOFLOC a baja salinidad entre ellos los biofiltros y sedimentadores debido a sus altas cargas de amonio y nitritos (Anexo 3A).

#### **3.4.2. Enriquecimiento con medio específico**

Se dividió cada muestra a 25 ml en dos tubos falcón esterilizados y se aforo a 50 ml cada tubo con medios líquidos específicos MMNA y MMNN, finalmente se dejó incubar a temperatura ambiente en agitación por siete días (Anexo 3B).

#### **3.4.3. Diluciones seriadas**

De los sedimentos enriquecidos se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-5}$  donde se adiciono 9 ml de medio selectivo en 5 tubos falcon de 15 ml esterilizados y debidamente rotulados ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ) para cada muestra. Luego se tomó 1 ml de la muestra enriquecida y se agregó al tubo falcon  $10^{-1}$ , se homogenizo y posteriormente se transfirió 1 ml al tubo  $10^{-2}$  así secuencialmente hasta alcanzar la dilución  $10^{-5}$ .

#### **3.4.4. Siembra en medio solido**

Para la siembra en medio solido se agregó el 2% de bacto agar al volumen de medio liquido selectivo requerido (MMNA y MMNN). Luego se esterilizo mediante autoclave a 15 psi por 15 min y se depositó en cajas Petri con una relación de 10 ml por placa y se dejó por 24 horas a temperatura ambiente antes de ser utilizado para descartar contaminación. Se eligieron las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  tomando un volumen de 100  $\mu$ l de cada una y se inoculó en la placa con medio sólido mediante el método de extensión utilizando esparcidores de acero microbiológicos esterilizados, se incubó a temperatura ambiente por 48 horas (Anexo 3C).

#### **3.4.5. Obtención de cultivo axénico**

Para la selección de cepas puras se eligieron colonias con morfologías diferentes de acuerdo con los criterios de tamaño, consistencia, pigmentación y forma. Las colonias seleccionadas fueron Inoculadas en medio agar selectivo mediante el método de agotamiento por estrías dejando incubar por 24 horas. Seguido se seleccionaron colonias individuales y se repitió el proceso para garantizar la obtención del cultivo puro; para ello se tomaron colonias separadas y sembraron por estrías en una segunda placa.

Las colonias separadas se inocularon en medio liquido especifico (MMNA y MMNN) y se dejó incubar en agitación a temperatura ambiente por 7 días. Transcurrido este tiempo se comprobó la pureza del cultivo mediante tinción gram. Finalmente, Tres réplicas por cada cepa fueron crio preservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  en Caldo Soja Trypticaseína (TSB) con DMSO al 10%. Una réplica del cultivo puro se mantuvo en el laboratorio mediante resiembras sucesivas (renovación de medio) para posteriores estudios (Anexo 3D).

### **3.5. Identificación de genes involucrados en procesos de nitrificación.**

### **3.5.1. Extracción de ADN**

Para la extracción del ADN genómico se utilizó el método CTAB X2 modificado. Inicialmente los cultivos bacterianos fueron centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos hasta alcanzar muestras de 100 mg. Seguido se agregó 695 µl de Buffer CTAB 2X pre calentado a 60 °C más 1,5 µl de β-mercaptoetanol (≥99%) y 3,5 µl de proteinasa K (20 mg/ml) inmediatamente se incubó en un termobloque a 60 °C por 1 hora mezclando e invirtiendo suavemente el microtubo cada 10 min. Se agregó 700 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se mezcló suavemente por inversión durante 2 minutos paso seguido se centrifugó a 13000 rpm por 10 min.

Se recuperó el sobrenadante a un nuevo microtubo y se agregaron 2/3 del volumen recuperado de isopropanol. Se mezcló suavemente por inversión y se dejó incubando a -20 °C por 2 horas. Luego se centrifugo a 13000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante. Se añadió 400 µl de etanol frío al 75%. Nuevamente se centrifugo a 13000 rpm por 5 min, se descartó todo el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente por 10 min. Se resuspendió el pellet en 50 µl de Buffer T.E pH 8.0 pre calentado a 60 °C, se añadió 1 µl de RNase (10mg/ml) y se incubó por 15 min a 65 °C. Finalmente se almacenó a -20 °C (Anexo 4) (Rogers y Bendich,1994).

### **3.5.2. Amplificación por pcr de los genes amoA, nxrB Y 16S ARNr**

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo en un tampón de amplificación con un volumen total de 25 µl; conteniendo 9,5 µl de agua ultra pura, 12,5 µl de GoTaq Green Master mix REF.M7123 (taq polimerasa; tris TRIS HCL; MgCl<sub>2</sub>; dNTPs; Taq polimerasa), 1 µl de cada cebador y 1 µl de ADN en suspensión. Para la amplificación del gen 16S ARNr se utilizó el juego de cebadores universales 27F\* (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) - 1492R\* (ACGGCTACCTTGTTACGACTT) y de los genes funcionales amoA y nxrB con los juegos de cebadores amoA-1F (GGGGTTTCTACTGGTGGT) - amoA-2R (CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC) (K= G ó T, S= G ó C) y nxrB-F (TACATGTGGTGGAAACA) – nxrB-R (CGGTTCTGGTCRATCA); respectivamente.

El proceso de amplificación del gen 16S constó de una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, luego con 35 ciclos de amplificación, con una

desnaturalización a 95 °C durante 30 s, seguido de 58 °C por 30 s para la hibridación de cebadores y 1 min a 72 °C para la elongación, con una extensión final a 72 °C durante 5 min (Weisburg *et al.*, 1991).

Mientras que para la amplificación de los genes funcionales se llevaron a cabo las siguientes condiciones: amoA; 94 °C durante 4 min para la desnaturalización inicial, 35 ciclos con una temperatura de 94 °C durante 30 s para la desnaturalización, 56 °C durante 40 s para la hibridación y 72 °C por 40 S para elongación, con una extensión final a 72 °C por 4 min (Rotthauwe *et al.*, 1997) y nxrB; 94 °C durante 4 min para la desnaturalización inicial, luego 35 ciclos con una temperatura de 94 °C durante 30 s para la desnaturalización, 48.5 °C durante 40 s para la hibridación y 72 °C por 40 S para elongación, con una extensión final a 72°C por 5 min. La calidad de los productos de PCR fueron verificados mediante migración por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Pester *et al.*, 2014).

### **3.6. Selección de cepas bacterianas nitrificantes**

Para evaluar la capacidad de remoción de amonio y nitrito las cepas aisladas fueron puestas en un medio de nitrificación heterotrófico (HNM por sus siglas en inglés) descrito por Huang *et al.*, 2017, modificado en esta investigación, el cual consistió de los siguientes componentes (g/L): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.00, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,30, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,05, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,01, MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O 0,01. Se utilizó glicerol como fuente de carbono a una concentración final de 0,1 ml/L. Las fuentes de nitrógeno NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> y NaNO<sub>2</sub> se añadieron al medio HNM alcanzando concentraciones finales de 10 mg/L de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N (HNM-1) y NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N (HNM-2). Los consumos de amonio y nitrito fueron evaluados cada 12 horas. Las cepas que mostraron capacidad de utilización de estos compuestos nitrogenados fueron seleccionadas para pruebas posteriores.

#### **3.6.1. Inoculación con bacterias nitrificantes heterotróficas**

Para la inoculación de las bacterias nitrificantes se manejó una relación 1:10 (uno de inóculo bacteriano y nueve de medio selectivo), se centrifugaron los cultivos bacterianos aislados a 5000 rpm por 1 minuto para concentrar las células bacterianas para ello se utilizó la microcentrifuga Fisher Scientific Marathon 16Km. Paso seguido se reguló la concentración bacteriana llevando cada una de

las cepas a una densidad óptica igual a 1 haciendo uso de un espectrofotómetro de microplaca Thermo Scientific™ Multiskan FC para medición de OD utilizando el filtro de 620 nm. En un tubo falcón esterilizado se tomó un volumen de 36 ml de medio y se inocularon con 4 ml del cultivo bacteriano con OD de 1 dejando 3 réplicas por cada cepa. Finalmente se realizaron mediciones del consumo de nitrógenos cada 12 horas mediante el método colorimétrico utilizando kit api.

### **3.7. Caracterización molecular de los aislados bacterianos seleccionados**

Los fragmentos de ADN del gen ARNr 16S, obtenidos mediante amplificación por PCR fueron enviados a secuenciar al laboratorio psomagen mediante la tecnología de secuenciación por Sanger.

#### **3.7.1. Análisis bioinformático**

Las secuencias nucleotídicas del gen ARNr 16S fueron analizadas y tratadas haciendo uso del programa BIOEDIT 7.2.5 donde se llevó a cabo la edición, manipulación y análisis de secuencias de ácidos nucleicos. Las secuencias forward y reverse fueron alineadas para obtener secuencias consenso. Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos NCBI utilizando la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST). Las reconstrucciones filogenéticas se realizaron en MEGA 5.05 utilizando el método de unión de vecinos (NJ) con 1000 réplicas de correa de arranque y el modelo de máxima verosimilitud compuesta.

### **3.8. Evaluación *in vitro* del potencial nitrificante de aislados seleccionados.**

Las cepas seleccionadas que demostraron presencia de los genes funcionales, utilización de amonio y/o nitrito fueron puestas en los medios de nitrificación HNM-1 y HNM-2 a concentraciones de 10 mg/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{NaNO}_2$  siguiendo el protocolo utilizado para la selección de cepas nitrificantes, los consumos de amonio y nitrito fueron medidos en lapsos de tiempo más cortos con intervalos de 4 horas. La tasa de nitrificación heterótrofa de cada cepa se determinó mediante la siguiente fórmula:

- a) Tasa de nitrificación (mg/L x h) = (C1 -Cn)/ t.
- C1 = concentración inicial.
  - Cn = concentración final.
  - t = período de incubación. (Mendoza *et al.*, 2019).

### **3.9. Formulación de consorcios bacterianos**

Se realizaron pruebas para establecer consorcios entre las bacterias nitrificantes; en este paso las cepas aisladas que mostraron consumo de amonio y nitrito fueron puestas en cocultivos tomando en cuenta la combinación de cepas nitrificantes de amonio y nitrito. Se evaluó el potencial nitrificante de los consorcios y se seleccionó el consorcio más eficiente.

#### **3.9.1. Evaluación *in vivo* del consorcio bacteriano**

Inicialmente se realizó la estimulación de formación de biofilm donde el consorcio bacteriano nitrificante concentrado a  $1 \times 10^8$  fue puesto en baldes plásticos (20 L) con una relación 1:10, conteniendo catorce litros de medio específico nitrificante con concentraciones de 40 mg/L de amonio y 10 mg/L de nitrito, se inoculó un litro del consorcio nitrificante alcanzando un volumen final de 15 L, adicionalmente dos recortes de red de polietileno de 15 cm x 30 cm con pliegues de 3 capas se colocaron en cada balde para estimular la formación de biofilm, los baldes fueron puestos en aireación con un oxígeno disuelto de 4 mg/L por 20 días, luego se procedió al ensayo *In vivo* el cual fue diseñado con 2 tratamientos y 5 repeticiones (Anexo 5).

En el tratamiento 1 se pusieron 4 camarones juveniles con peso promedio de 3,5 g en un balde con 10 L de agua de baja salinidad (4 ppt) y se adicionó la red con el biofilm maduro, los animales fueron mantenidos con aireación continua y se realizó recambios del 60% con agua estéril solo cuando se encontró presencia de amonio, mientras que el tratamiento 2 fue considerado el grupo control al cual se le establecieron las mismas condiciones, pero no se adicionó el biofilm bacteriano. Se registró la supervivencia de los camarones en cada grupo durante 30 días (Shu *et al.*, 2022). Los parámetros de temperatura, oxígeno disuelto, pH, nitrógeno amoniacal total, nitrito y nitrato fueron medidos cada 24 horas.

### **3.9.2. Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de los datos experimentales se llevó a cabo las comparaciones de las medias del grupo experimental con la aplicación del consorcio nitrificante seleccionado y el grupo control mediante una prueba t-Student de muestras independientes haciendo uso del programa estadístico IBM SPSS, versión 25 con un nivel de significancia estadística de 0,05% para todas las comparaciones.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Aislamiento de cepas bacterianas nitrificantes

El proceso de aislamiento de las bacterias nitrificantes en los medios de cultivo selectivos para los grupos de remoción de amonio (MMNA) y nitrito (MMNN) permitió visualizar una alta diversidad bacteriana nitrificante heterotrófica asociada a los sedimentos con altas cargas de amonio (10 mg/L) y nitrito (6 mg/L) del cultivo RAS-BIOFLOC a baja salinidad. Los morfotipos coloniales permitieron el aislamiento de veintiuna cepas bacterianas capaces de crecer en los medios específicos de las cuales doce bacterias crecieron en medio de amonio y nueve en medios de nitrito (Tabla 1).

Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Yang *et al.*, (2016) quienes obtuvieron el aislamiento de veinte cepas bacterianas nitrificantes heterotróficas a partir de muestras de sedimento de un reactor mediante enriquecimiento con medio específico heterotrófico donde seleccionaron tres cepas que mostraron mayor eficiencia de eliminación de nitrógeno.

Los medios MMNA y MMNN han sido reportados para el aislamiento de bacterias nitrificantes, así como *Nitrosomonas* y *Nitrolancea* (Fujitani *et al.*, 2015 y Spieck *et al.*, 2020). Sin embargo, en este estudio se reemplazó la fuente de carbono inorgánica por glicerol obteniendo así el aislamiento de las bacterias nitrificantes heterotróficas capaces de crecer en estas condiciones utilizando amonio y nitrito como fuente de energía. Las otras cepas que mostraron crecimiento en los medios específicos fueron conservadas para posteriores investigaciones.

**Tabla 1.**

*Características morfológicas de los aislados bacterianos. Medio mineral nitrificante de amonio (MMNA) y de nitrito (MMNN).*

<b>CÓDIGO</b>	<b>MMNA</b>	<b>MMNN</b>
CBM1	+	
CBM2	+	
CBM3	+	
CBM4		+
CBM5	+	
CBM6		+
CBM7	+	
CBM8	+	
CBM9		+
CBM10	+	+
CBM11		+
CBM12	+	
CBM13	+	
CBM14	+	+
CBM15		+
CBM16	+	
CBM17		+
CBM18		+
CBM19	+	
CBM20		+
CBM21		+

#### **4.2. Identificación de genes implicados en procesos de nitrificación**

Los genes *amoA* y *nxB* fueron evaluados en los aislados seleccionados mediante PCR convencional. El gen *amoA* se encontró en las cepas CBM3, CBM12 y CBM16 obteniendo un fragmento de 452 pb (Anexo 6A). Mientras que en las cepas CBM17, CBM18 y CBM21 se encontró el gen *nxB* obteniendo un fragmento de 485 pb (Anexo 6B). Los aislados bacterianos CBM10 y CBM14 mostraron presencia de ambos genes lo cual las ubica como bacterias heterotróficas capaces de realizar el proceso de nitrificación completa (Tabla 2). Siendo similar a lo encontrado por *Zhang et al.*, (2016) quienes lograron la amplificación del gen *amoA* en la cepa nitrificante heterotrófica *Acinetobacter* sp. y *Mendoza et al*, 2019 quienes encontraron el gen *nxB* en *Pseudomonas* y *Bacillus* lo cual explica la capacidad nitrificante heterotrófica de las cepas seleccionadas en este trabajo.

Estos resultados demuestran que solo las cepas CBM3, CBM12, CBM16, CBM17, CBM18, CBM21, CBM10 y CBM14 poseen los genes funcionales responsables de codificar la amoní monooxigenasa (AMO) y nitrito oxidoreductasa (NXR), que son las dos enzimas claves durante el proceso de nitrificación (Holmes *et al*, 2019 y Lehtovirta, 2018). El gen *amoA* codifica la subunidad A, junto con *amoC* y *amoB* forman el operón AMO de la enzima amoniaco monooxigenasa presente en todas las bacterias oxidadoras de amonio estudiadas como *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, etc (Mendoza *et al*, 2019, Krishnani, 2010 y Zhang *et al*, 2016). El gen *nxB* codifica la subunidad B de la enzima nitrito óxido reductasa el cual se utiliza como marcador funcional y filogenético de especies nitrito oxidantes (Pester *et al*, 2014).

**Tabla 2.**

*Identificación de genes específicos relacionados en los procesos de nitrificación en las cepas evaluadas.*

Cepas	Genes de nitrificación	
	<i>amoA</i>	<i>nxB</i>
CBM3	+	-
CBM10	+	+
CBM12	+	-
CBM14	+	+
CBM16	+	-
CBM17	-	+
CBM18	-	+
CBM21	-	+

#### **4.3. Selección de bacterias nitrificantes heterotróficas.**

Las veintiuna cepas aisladas fueron también sometidas a ensayos *In vitro* para verificar su capacidad de utilización de amonio y nitrito considerando que todas pudieron crecer en los medios de aislamiento. En este proceso las cepas fueron puestas en medios líquidos selectivos NMH1 y NMH2 a concentraciones de 10 mg/L de amonio y nitrito, respectivamente. Cada 12 horas se verificó la capacidad de utilización de amonio y nitrito de los aislados bacterianos. Tres cepas correspondientes a CBM3, CBM12 y CBM16 mostraron capacidad de utilización de amonio (Cuadro 3). CBM17, CBM18 y CBM21 fueron capaces de remover nitrito (Cuadro 4). Las cepas CBM10 y CBM14 tuvieron la capacidad de remover eficientemente ambas fuentes de nitrógenos (Cuadros 3 y 4). Lo encontrado en esta evaluación tuvo relación con lo visto en la detección de genes funcionales.

Estos resultados son similares a lo encontrado por Mendoza *et al.*, (2017) quienes reportaron el aislamiento de nueve cepas nitrificantes heterotróficas en los medios específicos NMH1 y NMH2 de las cuales solo cuatro cepas (SM4, SM5, BM6 y EBA-P) fueron capaces de realizar nitrificación heterotrófica. Además, mediante PCR convencional y proteómica corroboraron la presencia de los genes *nxB* y *amoA* en estas cepas. Lo cual tiene relación con lo encontrado en la presente investigación donde únicamente los aislados que mostraron presencia de los genes funcionales pudieron remover nitrógenos.

**Tabla 3.***Evaluación de la capacidad nitrificante de bacterias de remoción de amonio.*

Bacteria	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N Inicial	BOA (12 h)			BOA (24h)			BOA (36h)		
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> - N	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> - N	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - N	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> - N	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> - N	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - N	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> - N	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> - N	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - -N
CBM1	10 mg/L	10	0	0	10	0	0	10	0	0
CBM2	10 mg/L	10	0	0	10	0	0	10	0	0
CBM3	10 mg/L	0	4	0	0	4	0	0	4	0
CBM4	10 mg/L	10	0	0	10	0	0	10	0	0
CBM5	10 mg/L	10	0	0	10	0	0	10	0	0
CBM6	10 mg/L	10	0	0	10	0	0	10	0	0
CBM7	10 mg/L	10	0	0	10	0	0	10	0	0
CBM8	10 mg/L	10	0	0	10	0	0	10	0	0
CBM9	10 mg/L	10	0	0	10	0	0	10	0	0
CBM10	10 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CBM11	10 mg/L	10	0	0	10	0	0	10	0	0
CBM12	10 mg/L	6	3	0	3	4	0	0	6	0
CBM13	10 mg/L	10	0	0	10	0	0	10	0	0
CBM14	10 mg/L	8	1	4	0	0	0	0	0	0
CBM15	10 mg/L	10	0	0	10	0	0	10	0	0
CBM16	10 mg/L	4	4	0	0	6	0	0	4	0
CBM17	10 mg/L	10	0	0	10	0	0	10	0	0
CBM18	10 mg/L	10	0	0	10	0	0	10	0	0
CBM19	10 mg/L	10	0	0	10	0	0	10	0	0
CBM20	10 mg/L	10	0	0	10	0	0	10	0	0
CBM21	10 mg/L	10	0	0	10	0	0	10	0	0
CONTROL	10 mg/L	10	0	0	10	0	0	10	0	0

**Tabla 4.***Evaluación de la capacidad nitrificante de bacterias de remoción de nitrito.*

Bacteria	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N NICIO	BON (12 h)			BON (24 h)			BON (36h)		
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> - N	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> - N	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - N	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> - N	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> - N	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - N	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> - N	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> - N	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - N
CBM1	10 mg/L	0	10	0	0	10	0	0	10	0
CBM2	10 mg/L	0	10	0	0	10	0	0	10	0
CBM3	10 mg/L	0	10	0	0	10	0	0	10	0
CBM4	10 mg/L	0	10	0	0	10	0	0	10	0
CBM5	10 mg/L	0	10	0	0	10	0	0	10	0
CBM6	10 mg/L	0	10	0	0	10	0	0	10	0
CBM7	10 mg/L	0	10	0	0	10	0	0	10	0
CBM8	10 mg/L	0	10	0	0	10	0	0	10	0
CBM9	10 mg/L	0	10	0	0	10	0	0	10	0
CBM10	10 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CBM11	10 mg/L	0	10	0	0	10	0	0	10	0
CBM12	10 mg/L	0	10	0	0	10	0	0	10	0
CBM13	10 mg/L	0	10	0	0	10	0	0	10	0
CBM14	10 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CBM15	10 mg/L	0	10	0	0	10	0	0	10	0
CBM16	10 mg/L	0	10	0	0	10	0	0	10	0
CBM17	10 mg/L	0	2	20	0	0	40	0	0	40
CBM18	10 mg/L	0	0,5	20	0	0	40	0	0	40
CBM19	10 mg/L	0	10	0	0	10	0	0	10	0
CBM20	10 mg/L	0	10	0	0	10	0	0	10	0
CBM21	10 mg/L	0	6	40	0	3	40	0	0	40
CONTROL	10 mg/L	0	10	0	0	10	0	0	10	0

#### 4.4. Caracterización molecular de los aislados bacterianos seleccionados

Las ocho cepas bacterianas seleccionadas que mostraron nitrificación y presencia de los genes *amoA* y *nxB* fueron caracterizadas taxonómicamente, la secuencia completa (1500 pb) del gen ARNr 16S de los aislados nitrificantes fueron enviados a secuenciar y las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos de NCBI. La búsqueda de homología de las secuencias mostró altas similitudes con *Pseudomonas baleárica* 99,25% (CBM10), *P. stutzeri* 99,68% (CBM12), *P. taiwanensis* 97,41% (CBM14), *P. nitroreducens* 99,68% (CBM17), *P. putida* 99,89% (CBM18), *Acinetobacter harbinensis* 97,33% (CBM3), *Enterobacter cloacae* 99,58% (CBM16), y *Bacillus amyloliquefaciens* 93,41% (CBM21) (Cuadro. 5) (Anexos 7, 8 y 9).

Estos resultados son similares con lo reportado por Shu *et al.*, (2022) quienes llevaron a cabo el aislamiento de bacterias nitrificantes heterotróficas a partir de aguas residuales de cultivos de peces de agua dulce en sistemas RAS. Encontrando que la mayor cantidad de bacterias nitrificantes heterotróficas correspondían a *Pseudomonas* spp. (38 cepas), *Acinetobacter* spp. (24) y de *Enterobacter* spp. (4) la similitud encontrada entre estos autores y el presente estudio podría deberse a la relación de las condiciones de cultivo y los bajos niveles de salinidad (4 ppt) utilizado en el sistema RAS-Biofloc en este trabajo.

Por otra parte, *Bacillus* spp. se usa comúnmente como probióticos en acuicultura, pero pocos reportes se han centrado en la capacidad de nitrificación de este género. Mendoza *et al.*, (2019) trabajaron en la evaluación de *Bacillus* spp. logrando el aislamiento de cuatro cepas con capacidad de nitrificación heterótrofa a partir de agua de acuicultura. Zhang *et al.*, (2022) lograron el aislamiento de doce cepas de *Bacillus* spp. de sedimentos de estanques de camarón, seis cepas mostraron capacidad de eliminación de nitrógeno dentro de las cuales están *B. subtilis*, *B. albus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. velezensis* esto tiene similitud con lo encontrado en este trabajo donde *B. amyloliquefaciens* fue aislada de sedimentos de un sistema RAS-BIOFLOC de *L. vannamei* además mostrando capacidad de oxidación de nitrito (CBM21).

**Tabla 5.**

*Caracterización molecular y clasificación filogenética de ocho cepas bacterianas heterotróficas aisladas.*

<b>Cepa</b>	<b>Identificación molecular 16S</b>	<b>N° accesión</b>	<b>Similitud (%)</b>
CBM3	<i>Acinetobacter harbinensis</i>	KC843488.1	97,33
CBM10	<i>Pseudomonas balearica</i>	NR_025972.1	99,25
CBM12	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	MT027239.1	99,68
CBM14	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	NR_116172.1	97,41
CBM16	<i>Enterobacter cloacae</i>	NR_028912.1	99,58
CBM17	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	LN995712.1	99,68
CBM18	<i>Pseudomonas putida</i>	KM435272.1	99,89
CBM21	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	KC894960.1	93,41

#### **4.5. Evaluación *in vitro* del potencial nitrificante de cepas seleccionadas.**

Los aislados nitrificantes fueron evaluados *In vitro* para conocer su tasa de nitrificación, para ello fueron puestas en medios de cultivos específicos con  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  y  $\text{NaNO}_2$  a concentraciones de 10 mg/L, los consumos de NAT,  $\text{NO}_2^-$ -N y  $\text{NO}_3^-$ -N se midieron cada 4 horas (Anexo 10). Los resultados revelaron que las cepas CBM3, CBM12 y CBM16 mostraron capacidad de oxidación de amonio (Figura. 2) y las cepas CBM17, CBM18, CBM21 tuvieron capacidad de remoción de nitritos (Figura. 3) mientras las cepas CBM10 y CBM14 tuvieron la capacidad de remover eficientemente los nitrógenos por completo (Figura. 2 y 3).

La cepa más eficiente para la remoción de amonio fue CBM3 (*Acinetobacter* sp.) alcanzando una tasa de nitrificación de 1,25 mg/L por hora, capaz de remover 10 mg/L de  $\text{NH}_4^+$ -N en 8 horas. *Acinetobacter* spp. ha sido encontrada por poseer altos niveles de remoción de amonio Zhang *et al* (2016), reporto que *Acinetobacter* sp. SFA 10 aislada a partir de un río fue capaz de remover amonio y tuvo una tasa de remoción de 2,05 mg/L por hora. Además, también encontró presencia del gen AMO responsable de la oxidación de amonio; lo cual tiene

similitud con la tasa de remoción y presencia del gen AMO observado en la cepa CBM3 en este estudio.

Las cepas CBM16 (*Enterobacter cloacae*) y CBM12 (*Pseudomonas stutzeri*) por su parte mostraron tasas de remoción de amonio de 0,50 y 0,31 mg/L por hora logrando remover 10 mg/L de  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  en 20 y 32 horas, respectivamente. Padhi *et al* (2017) y Zhou *et al* (2014) reportaron en sus trabajos que las cepas *Enterobacter cloacae* (CF-S27) y *Pseudomonas stutzeri* (KTB) mostraron capacidad de nitrificación y desnitrificación aeróbica revelando tasas de nitrificación de amonio de CF-S27 igual a 11 mg/L por hora mucho más alta en comparación con la cepa CBM16 (0,5 mg/L) mientras KTB mostró una tasa de 0,24 mg/L por hora lo cual es similar a lo encontrado con la cepa CBM12 (0,31 mg/L). Además, la capacidad de nitrificación y desnitrificación aeróbica reportada por estos autores difiere con lo encontrado en este trabajo donde las cepas CBM16 y CBM12 mostraron capacidad de remoción únicamente de amonio, esta diferencia podría deberse a que en estas cepas solo se encontró presencia del gen amoA.

Por su parte las cepas CBM17 (*Pseudomonas nitroreducens*), CBM18 (*Pseudomonas putida*) y CBM21 (*Bacillus amyloliquefaciens*) exhibieron tasas de remoción de  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  de 0,63, 0,58 y 0,28 mg/L por hora, logrando remover los 10 mg/L en 16, 20 y 36 horas, respectivamente, además mostraron incapacidad de utilización de amonio y nitrato. Estas tres cepas han sido encontradas en previas investigaciones como bacterias de nitrificación y desnitrificación aeróbica (Jie y Daping, 2008; Zhang *et al*, 2019 y Hui *et al*, 2018) lo cual difiere con lo encontrado en este trabajo donde se observó presencia solo del gen nxrB y capacidad utilización solo de nitrito como fuente de nitrógeno en las cepas mencionadas siendo clasificadas como bacterias de oxidación de nitrito.

Las cepas CBM10 (*Pseudomonas baleárica*) y CBM14 (*Pseudomonas taiwanensis*) tuvieron la capacidad de consumir por completo los 10 mg/L de amonio en 12 y 24 horas y nitrito en 8 y 12 h, respectivamente. Con tasas de nitrificación de amonio, nitrito y nitrato por CBM10 de 0,83, 1,25 y 1 mg/L por hora y CBM14 de 0,42, 0,83 y 0,5 mg/L por hora; respectivamente, con una baja

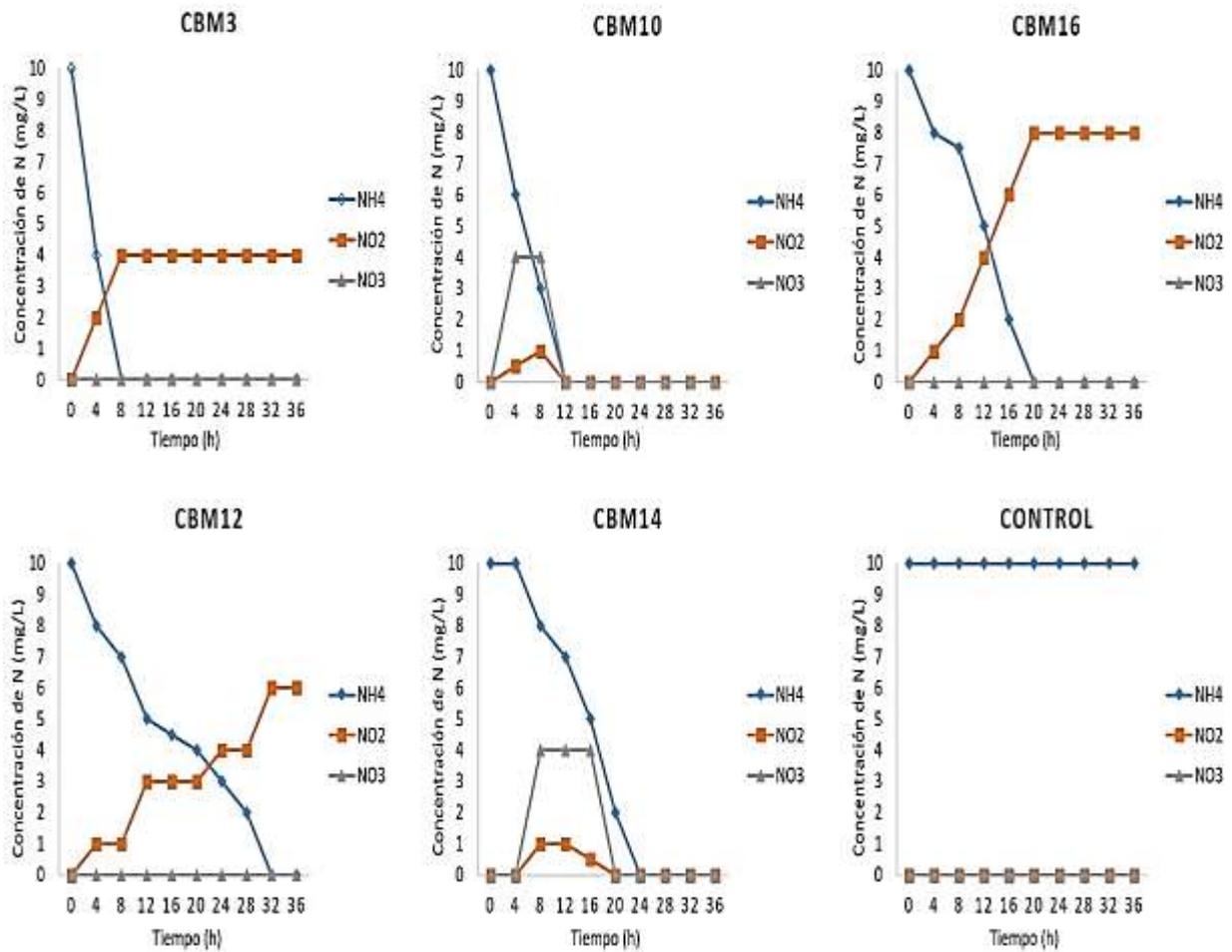
acumulación de nitrato (4 mg/L) durante el proceso. Corroborando así la capacidad de estas dos cepas de nitrificación y desnitrificación aeróbica.

Autores como Ruan *et al.*, (2020) y Zhang *et al.*, (2022) reportaron a *Pseudomonas baleárica* (RAD-17) y *Pseudomonas taiwanensis* (EN-F2) como cepas de nitrificación heterótrofa/desnitrificación aeróbica (HN/AD), con tasas de remoción de  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  y  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  de RAD-17 igual a 1,56, 6,33 y 6,22 y EN-F2 igual a 0,42, 0,83 y 0,5 mg/L por hora, respectivamente. Lo cual muestra diferencias con lo visto en las cepas CBM10 y CBM14 que a pesar de que mostraron capacidad de HN/AD sus tasas de nitrificación fueron mucho más bajas, estas diferencias podrían estar relacionadas con los niveles de salinidad de las condiciones de evaluación.

La salinidad influye directamente en los procesos biológicos de las bacterias, reduciendo el crecimiento y la tasa de oxidación del nitrógeno por parte de los nitrificantes (Quartaroli *et al.*, 2017 y Silva *et al.*, 2018). Carneiro *et al.*, (2019) reportaron que el mejor desempeño de *Pseudomonas baleárica* se da a una salinidad de 30 ppt lo cual difiere del nivel salinidad (4 ppt) de evaluación de las cepas CBM10 y CBM14.

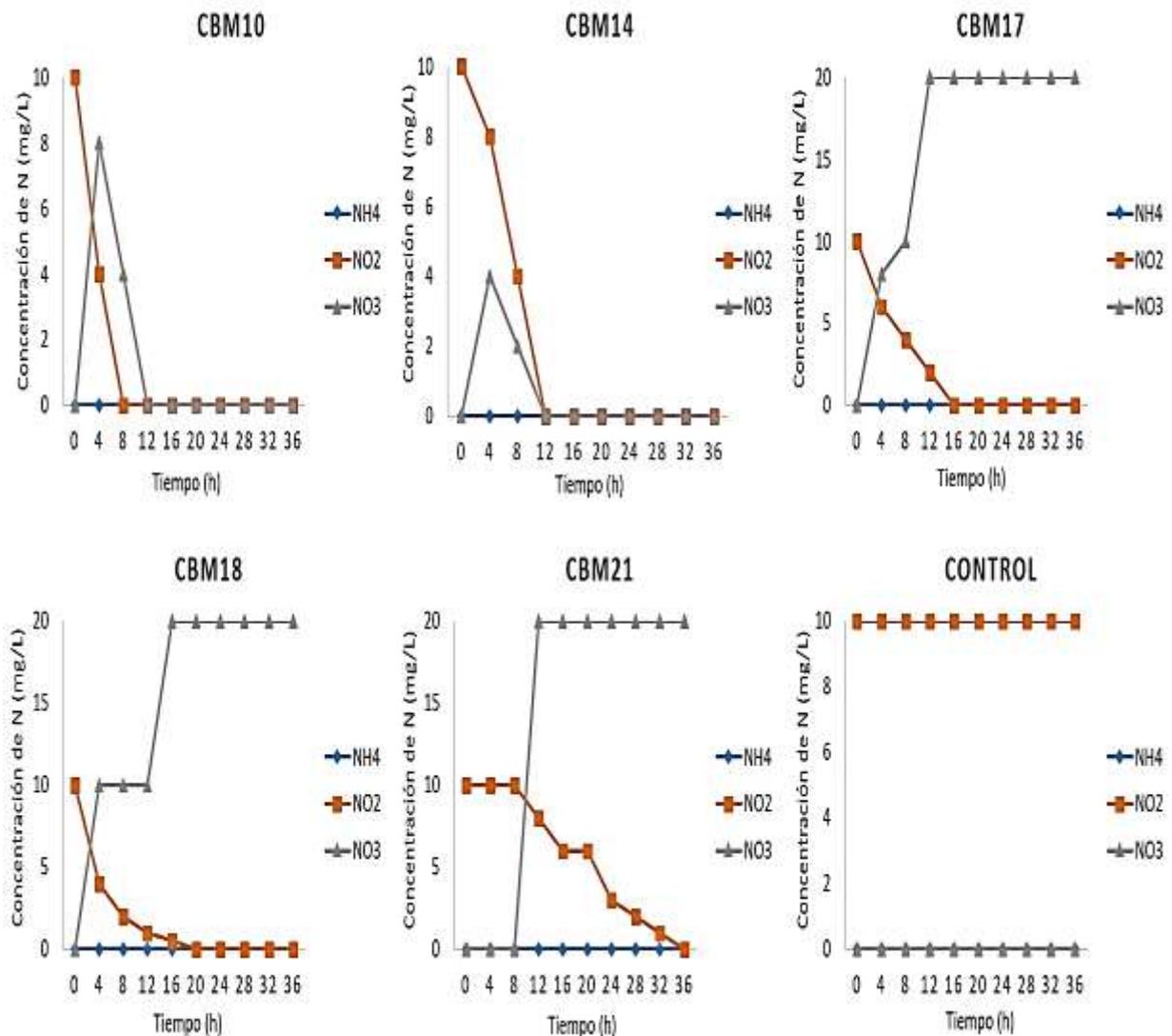
**Figura 2.**

*Características de nitrificación heterótrofa de las cepas seleccionadas con amonio ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) como única fuente de nitrógeno en condiciones aeróbicas.*



**Figura 3.**

*Características de nitrificación heterótrofa de las cepas seleccionadas con nitrito ( $\text{NO}_2^-$ -N) como única fuente de nitrógeno en condiciones aeróbicas.*



#### 4.6. Identificación de consorcio de los aislados bacterianos

Para la formulación de consorcios se establecieron cuatro grupos de acuerdo a los niveles de eficiencia de remoción de nitrógeno (alta, media, baja y oxidación completa), se agruparon CBM3 y CBM17 como cepas de alta remoción, CBM16 y CBM18 cepas de remoción media, CBM12 y CBM21 cepas de baja remoción, CBM10 y CBM14 de remoción completa. En base a esto se hicieron combinaciones y se establecieron 15 consorcios bacterianos (Cuadro 6).

Se encontró que el consorcio CNH12 mostró la tasa remoción más alta de  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  y  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ , el cual estuvo conformado por 6 cepas bacterianas conteniendo las dos cepas de remoción completa (CBM10 y CBM14) más las cepas de alta (CBM3, CBM17) y media remoción (CBM12, CBM18). Este consorcio tuvo la capacidad de remover 40 mg/L de amonio, 10 mg/L de nitrito y el nitrato acumulado durante el proceso en un periodo de 24 horas con una tasa de remoción de 3,3, 2,5 y 1 mg/L por hora, respectivamente. Otros consorcios como el 3 y 10 mostraron buenos resultados alcanzando tasas de remoción de 2 mg/L por hora mientras los consorcios 7, 8, 9, 13, 14 y 15 mostraron una muy baja remoción de nitrógeno a pesar de contar con cepas que mostraron buen potencial cuando fueron evaluadas individualmente (Figura 4).

Estos resultados tienen similitud con lo reportado por Yang, 2017 quien estimuló la proliferación de un consorcio nitrificante heterótrofo y desnitrificante aeróbico presente naturalmente en muestras de aguas residuales de baja salinidad mediante enriquecimiento selectivo con sulfato de amonio como fuentes de nitrógeno encontrando que un consorcio microbiano denominado FG-06 exhibió una alta tasa de nitrificación heterótrofa y desnitrificación aeróbica de  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  y  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  con tasas de eliminación de 7,33, 6,53 y 4,53 mg/L por hora, respectivamente.

El consorcio FG-06 estaba conformado en un 54,37% por *Acinetobacter* spp. y un 26,52% por *Pseudomonas* spp., al igual que el mejor consorcio nitrificante encontrado en este estudio, sin embargo, el consorcio FG-06 mostro mayor tasa de nitrificación que el consorcio CNH12 lo cual podría deberse a que en este consorcio las proporciones bacterianas corresponden a *Acinetobacter* sp. (16,6%) y *Pseudomonas* (86,33%). Lo cual hace hipotetizar que la presencia de *Acinetobacter* spp. en mayor proporción pudo ser el factor diferencial entre la

eficiencia nitrificante del consorcio FG-06 y el consorcio CNH12 concluyendo que la presencia de *Acinetobacter* spp. en mayor proporción podría mejorar la eficiencia de un consorcio bacteriano nitrificante heterotrófico.

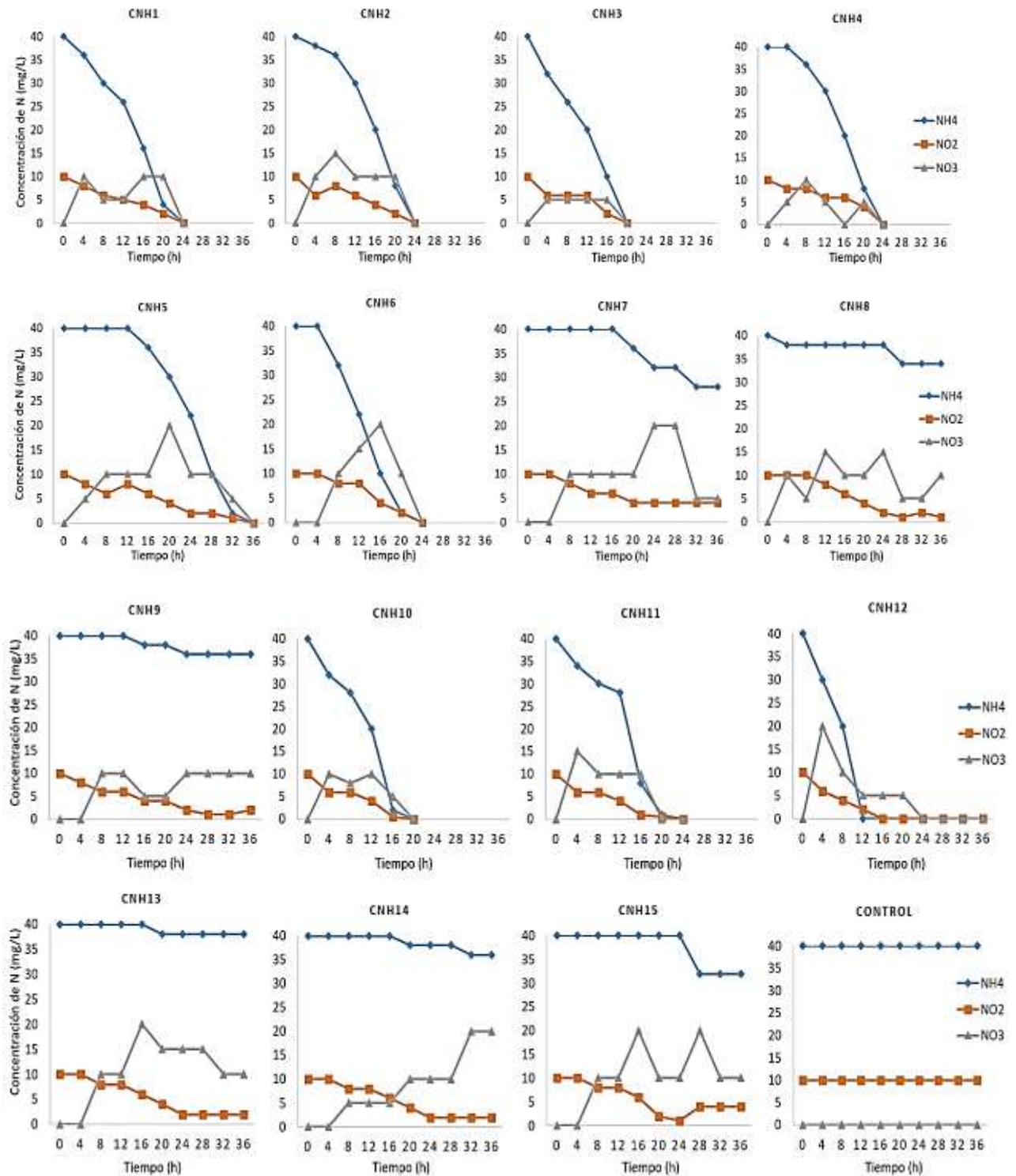
**Tabla 6.**

*Formulación de consorcios con aislados bacterianos.*

<b>CONSORCIO</b>	<b>CÓDIGO BACTERIAS</b>
1	CBM10, CBM3 Y CBM17.
2	CBM14, CBM3 Y CBM17.
3	CBM10, CBM14, CBM3 Y CBM17.
4	CBM10, CBM12, CBM18.
5	CBM14, CBM12, CBM18.
6	CBM10, CBM14, CBM12, CBM18.
7	CBM10, CBM16, CBM21.
8	CBM14, CBM16, CBM21.
9	CBM10, CBM14, CBM16, CBM21.
10	CBM10, CBM3, CBM17, CBM12, CBM18.
11	CBM14, CBM3, CBM17, CBM12, CBM18.
12	CBM10, CBM14, CBM3, CBM17, CBM12, CBM18.
13	CBM10, CBM3, CBM17, CBM12, CBM18, CBM16, CBM21.
14	CBM14, CBM3, CBM17, CBM12, CBM18, CBM16, CBM21.
15	CBM10, CBM14, CBM3, CBM17, CBM12, CBM18, CBM16, CBM21.

**Figura 4.**

*Características de nitrificación de los consorcios bacterianos (CNH1- CNH15) con amonio ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) y nitrito ( $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ) como fuentes de nitrógeno en condiciones aeróbicas.*



#### 4.6.1. Evaluación *in vivo* del consorcio bacteriano

El consorcio bacteriano (CNH12) fue cultivado con medio específico nitrificante y una malla de polietileno para estimular la formación de biofilm lo cual se obtuvo después de 20 días de inoculación (Figura 5A). A continuación, se procedió a la evaluación *in vivo* durante un mes, donde cuatro camarones juveniles de 3,5 g fueron cultivados en agua de baja salinidad (4 ppt) y se adiciono la malla de polietileno con el biofilm nitrificante maduro. Los parámetros físico-químicos se mantuvieron dentro de los rangos recomendados para el cultivo de camarón tanto en el grupo experimental como en el control (Figura 5B) siendo la temperatura  $28,5 \pm 0,62$  y  $27,5 \pm 0,3,82$ , pH  $7,63 \pm 0,28$  y  $7,64 \pm 0,26$  y oxígeno disuelto  $6,32 \pm 0,47$  y  $6,3 \pm 0,61$ , respectivamente.

La Figura 5C muestra las mediciones diarias de los compuestos nitrogenados del grupo experimental y el control, se observa que el grupo experimental mantuvo los niveles de  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$  y  $\text{NO}_3\text{-N}$  en 0 mg/L durante los 30 días de cultivo mientras que el grupo control mostró acumulación de nitrógeno amoniacal total que oscilaba entre 0,10 y 0,75 mg/L ( $0,37 \pm 0,21$ ), no se encontró acumulación de nitrito y nitrato durante la prueba. Se realizaron recambios del 60% del agua cada tres días al grupo control para evitar la acumulación excesiva de amoníaco mientras que al grupo tratamiento solo se le repuso el agua de evaporación y se reguló los niveles de floculación entre 10 y 15 mg/L para evitar asfixia de los camarones como se recomienda para el sistema RAS-BIOFLOC (Suantika *et al*, 2018).

Los camarones fueron monitoreados diariamente para verificar la supervivencia en el grupo experimental ( $3,6 \pm 0,6$ ) como en el control ( $2,8 \pm 0,5$ ). Después de treinta días se encontró que el grupo experimental presento supervivencia del 90% mientras que en el grupo control fue del 70% (Figura 5D). La razón por la que la mortalidad fue más alta en el grupo control que en el grupo experimental podría deberse a las acumulaciones de amoníaco alcanzando 0,75 mg/L durante los periodos sin recambios y la susceptibilidad del camarón al amoníaco en baja salinidad. En aguas con bajas salinidades el amoníaco como el nitrito aumentan su toxicidad sobre *L. vannamei* (Samocho y Prangnell, 2019).

Estos resultados demostraron que el consorcio nitrificante CNH12 no presenta toxicidad sobre los camarones, tiene una alta tasa de eliminación de los residuos nitrogenados ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  y  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ) y es adecuado para su aplicación en el tratamiento de aguas residuales de acuicultura o aplicación directa al tanque de cultivo. Estos hallazgos son comparables con los resultados informados por Dou *et al.*, (2021), quienes determinaron que las cepas de nitrificación heterotróficas *Pseudomonas fluorescens* NB14 y *Vibrio* sp. AB15 mostraron seguridad biológica y capacidad de eliminación de nitrógeno cuando estas fueron puestas en cultivo con *L. vannamei* durante veintidós días demostrando el beneficio de la aplicación de bacterias nitrificantes heterotróficas en cultivos de camarón.

Según los resultados de los análisis estadísticos, el consorcio CNH12 mostró diferencia significativa respecto al grupo control en los parámetros de supervivencia ( $p$ : 0,035) y consumo de amonio ( $p$ : 0) mientras que en los parámetros de temperatura ( $p$ : 0,14), pH ( $p$ : 0,21) y Oxígeno disuelto ( $p$ : 0,93), no se observó diferencia significativa (tabla 7). La distribución de probabilidad de la prueba  $t$  de Student permite comparar dos medias cuando las muestras son pequeñas y se desconoce la varianza poblacional lo cual es propio de este trabajo. Para la prueba  $t$  el nivel de confianza es  $p = 0,05$ , la diferencia es estadísticamente significativa siempre que este valor de  $p$  sea igual o inferior a 0,05 (Molina Arias *et al*, 2020).

**Tabla 7.**

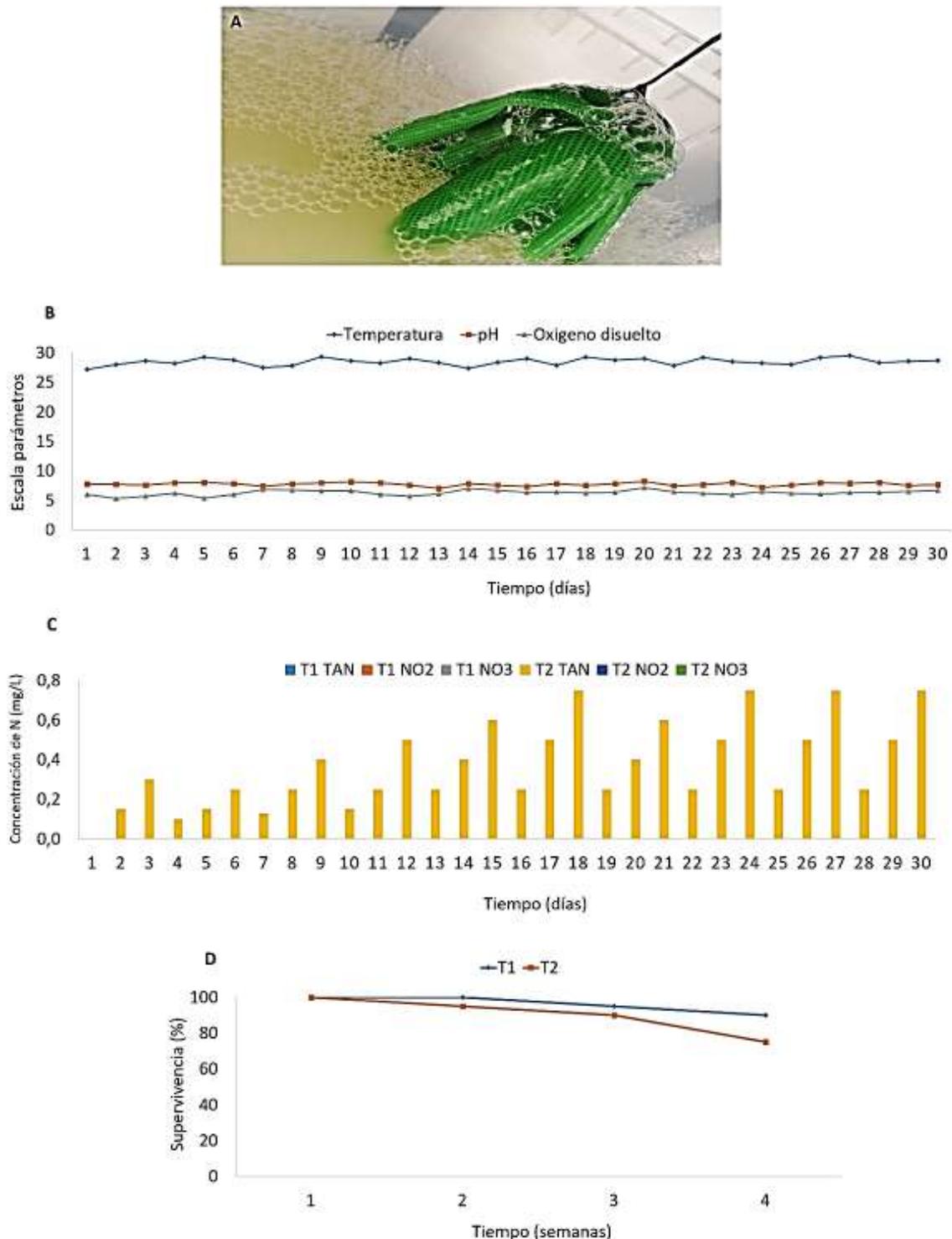
*Prueba t para la igualdad de medias entre grupo experimental y control.*

Variable		N	Media	Desviación	Valor P
Temperatura	CNH12	30	28,5	0,61	0,14
	Control	30	27,5	3,82	
pH	CNH12	30	7,73	0,28	0,21
	Control	30	7,64	0,26	
Oxígeno	CNH12	30	6,32	0,47	0,93
	Control	30	6,33	0,61	
Supervivencia	CNH12	5	3,6	0,55	0,035
	Control	5	2,8	0,45	
Amonio	CNH12	30	0	0	0
	Control	30	0,37	0,21	

Los valores con  $p < 0,05$  indican diferencias estadísticamente significativas.

**Figura 5.**

*Evaluación In vivo del consorcio nitrificante CNH12. (A) Maduración de biofilm con el consorcio bacteriano nitrificante. (B) medición de valores de parámetros de la calidad del agua, temperatura, pH y oxígeno disuelto. (C) Concentración de nitrógeno durante el tiempo experimental. (D) Efecto de la aplicación del consorcio nitrificante sobre la supervivencia de *L. vannamei*.*



## **CAPITULO V**

### **CONCLUSIONES**

1. Mediante medios de cultivo heterotróficos nitrificantes se logró el aislamiento de veintiuna cepas bacterianas a partir de sedimentos de un cultivo súper intensivo híbrido RAS-BIOFLOC de *L. vannamei*.
2. Mediante PCR de punto final fueron identificados los genes amoA y nxrB considerados marcadores de los procesos de remoción de amonio y nitrito, respectivamente, encontrando presencia del gen amoA en los aislados CBM3, CBM12, CBM16 y de nxrB en CBM17, CBM18 Y CBM21 mientras que en las cepas CBM10 y CBM14 se encontró los dos genes.
3. La evaluación In vitro corroboró que los únicos aislados bacterianos con capacidades de remoción de amonio y nitrito fueron los mismos en los que se detectaron los genes funcionales, CBM10 y CBM14 mostraron capacidad de remoción completa; CBM3, CBM16 y CBM12 pudieron utilizar únicamente amonio como fuente de energía mientras CBM17, CBM18 y CBM21 tuvieron capacidad de remoción de nitrito.
4. Se identificó mediante análisis de secuencias nucleotídicas del gen ARNr 16S ocho bacterias con capacidades nitrificantes clasificadas como: *Pseudomonas stutzeri*, *P. taiwanensis*, *Acinetobacter harbinensis*, *P. baleárica*, *P. nitroreducens* y *P. putida*.
5. A través del presente estudio fue posible establecer un consorcio de bacterias nitrificantes (CNH12) identificadas molecularmente y con potencial benéfico para biorremediación de amoníaco, nitrito y nitrato en acuicultura.

## **CAPITULO VI**

### **RECOMENDACIONES**

1. Ampliar los trabajos de evaluación del consorcio CNH12 evaluando la formación de biofilm.
2. Continuar en búsqueda de aislamiento de nuevas cepas nitrificantes heterotróficas haciendo énfasis en *Acinetobacter* spp. con miras a potenciar la eficiencia nitrificante del consorcio CNH12.
3. Explorar estudios que involucren evaluación y caracterización de las otras cepas que crecieron en los medios específicos ya que pueden contar con otras ventajas como capacidad de consumir fosfatos el cual es otro inconveniente en cultivos intensivos.

## CAPITULO VII

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abakari, G., Luo, G., & Kombat, E. O. (2020). *Dynamics of nitrogenous compounds and their control in biofloc technology (BFT) systems: A review. Aquaculture and Fisheries*, 6(5), 441–447.
- Ambus, P., & Zechmeister-Boltenstern, S. (2007). *Denitrification and N-cycling in forest ecosystems. In Biology of the Nitrogen Cycle* (pp. 343–358). Elsevier.
- Bregnballe, J. (2015). *A Guide to Recirculation Aquaculture*. Fao.Org. <https://www.fao.org/publications/card/es/c/7516ab04-7632-482a-99f7-7c853a0e0d6d/>
- Chong-Robles, J., Charmantier, G., Boulo, V., Lizárraga-Valdéz, J., Enríquez-Paredes, L. M., & Giffard-Mena, I. (2014). *Osmoregulation pattern and salinity tolerance of the white shrimp Litopenaeus vannamei (Boone, 1931) during post-embryonic development. Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 422–423, 261–267.
- Carneiro Fidélis Silva, L., Santiago Lima, H., Antônio de Oliveira Mendes, T., Sartoratto, A., de Paula Sousa, M., Suhett de Souza, R., Oliveira de Paula, S., Maia de Oliveira, V., & Canêdo da Silva, C. (2019). *Heterotrophic nitrifying/aerobic denitrifying bacteria: Ammonium removal under different physical-chemical conditions and molecular characterization. Journal of Environmental Management*, 248(109294), 109294. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109294>
- Claude E. Boyd, P. D. A. S. C. (2017, junio 12). *What happens to feed in aquaculture systems?* Globalseafood.org. <https://www.globalseafood.org/advocate/aquaculture-effluent/>

- Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P., & Verstraete, W. (2012). *Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges*. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 356–357, 351–356.
- Daims, H., Lücker, S., & Wagner, M. (2016). *A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria*. *Trends in Microbiology*, 24(9), 699–712.
- Dou, L., Chen, W., Pan, L., & Huang, F. (2021). *Characterization of Vibrio sp. strain AB15 and Pseudomonas fluorescens strain NB14 from the biofloc of shrimp culture ponds capable of high ammonia and nitrite removal efficiency*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 52(4), 843–858. <https://doi.org/10.1111/jwas.12789>
- Duan, S., Zhang, Y., & Zheng, S. (2022). *Heterotrophic nitrifying bacteria in wastewater biological nitrogen removal systems: A review*. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 52(13), 2302–2338. <https://doi.org/10.1080/10643389.2021.1877976>
- FAO Pesca *Penaeus vannamei*. (2009, April 7). Fao.Org. [https://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus\\_vannamei/es](https://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/es)
- Fleckenstein, L. J., Tierney, T. W., & Ray, A. J. (2018). *Comparing biofloc, clear-water, and hybrid recirculating nursery systems (Part II): Tilapia (Oreochromis niloticus) production and water quality dynamics*. *Aquaculture Engineering*, 82, 80–85.
- Fujitani, H., Kumagai, A., Ushiki, N., Momiuchi, K., & Tsuneda, S. (2015). *Selective isolation of ammonia-oxidizing bacteria from autotrophic nitrifying granules by applying cell-sorting and sub-culturing of microcolonies*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1159.
- Guisasola, A., Petzet, S., Baeza, J. A., Carrera, J., & Lafuente, J. (2007). *Inorganic carbon limitations on nitrification: experimental assessment and*

- modelling. *Water Research*, 41(2), 277–286.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.10.030>
- Han, S., Wang, B., Wang, M., Liu, Q., Zhao, W., & Wang, L. (2017). *Effects of ammonia and nitrite accumulation on the survival and growth performance of white shrimp Litopenaeus vannamei*. <https://doi.org/10.25431/1824-307X/ISJ.V14I1.221-232>
- Hastuti, Y. P., Rusmana, I., Nirmala, K., Affandi, R., & Tridesianti, S. (2019). *Short Communication: Identification and characterization of nitrifying bacteria in mud crab (Scylla serrata) recirculation aquaculture system by 16S rRNA sequencing*. *Biodiversitas: Journal of Biological Diversity*, 20(5).  
<https://doi.org/10.13057/biodiv/d200524>
- He, T., Xie, D., Ni, J., Li, Z., & Li, Z. (2020). *Nitrous oxide produced directly from ammonium, nitrate and nitrite during nitrification and denitrification*. *Journal of Hazardous Materials*, 388(122114), 122114.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122114>
- Hirota, R., Kuroda, A., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H., & Kato, J. (2006). *Transcriptional analysis of the multicopy hao gene coding for hydroxylamine oxidoreductase in Nitrosomonas sp. strain ENI-11*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(8), 1875–1881.
- Holmes, D. E., Dang, Y., & Smith, J. A. (2019). *Nitrogen cycling during wastewater treatment*. *Advances in Applied Microbiology*, 106, 113–192.
- Huang, F., Pan, L., Lv, N., & Tang, X. (2017). *Characterization of novel Bacillus strain N31 from mariculture water capable of halophilic heterotrophic nitrification–aerobic denitrification*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124(5), 564–571.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.06.008>
- Hui, C., Guo, X., Sun, P., Khan, R. A., Zhang, Q., Liang, Y., & Zhao, Y.-H. (2018). *Removal of nitrite from aqueous solution by Bacillus amyloliquefaciens*

*biofilm adsorption*. *Bioresource Technology*, 248, 146–152.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.176>

Jie, H., & Daping, L. (2008). *Nitrite removal performance and community structure of nitrite-oxidizing and heterotrophic bacteria suffered with organic matter*. *Current Microbiology*, 57(4), 287–293. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9191-z>

Junier, P., Molina, V., Dorador, C., Hadas, O., Kim, O.-S., Junier, T., Witzel, J.-P., & Imhoff, J. F. (2010). *Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in the environment*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(3), 425–440.

Kindaichi, T., Ito, T., & Okabe, S. (2004). *Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography-fluorescence in situ hybridization*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1641–1650.  
<https://doi.org/10.1128/aem.70.3.1641-1650.2004>

Krishnani, K. K. (2010). *Detection and diversity of nitrifying and denitrifying functional genes in coastal aquaculture*. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 302(1–2), 57–70.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.01.024>

Lehtovirta-Morley, L. E. (2018). *Ammonia oxidation: Ecology, physiology, biochemistry and why they must all come together*. *FEMS Microbiology Letters*, 365(9). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny058>

Li, H., Duan, Y., Dong, H., & Zhang, J. (2023). *Encapsulation of denitrifying bacteria for potential recirculating aquaculture system denitrification*. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 573(739584), 739584.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739584>

Martikainen, P. J. (2022). *Heterotrophic nitrification – An eternal mystery in the nitrogen cycle*. *Soil Biology & Biochemistry*, 168(108611), 108611.  
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108611>

- Mendoza, L. F. D., Quimi Mujica, J. G., Risco Cunayque, J. M., Aroni Lucana, G. W., Intriago Angulo, J. J., De la Cruz, V. I. S., Escobar, V. A. C., & Matonnier, E. M. (2019). *Assessment of heterotrophic nitrification capacity in Bacillus spp. And its potential application in the removal of nitrogen from aquaculture water*. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 13(4), 1893–1908. <https://doi.org/10.22207/jpam.13.4.02>
- Molina Arias M, Ochoa Sangrador C, Ortega Páez E. (2020, diciembre 16). *Comparación de dos medias. Pruebas de la t de Student*. *Evidenciasenpediatria.es*.<https://evidenciasenpediatria.es/articulo/7699/comparacion-de-dos-medias-pruebas-de-la-t-de-student>
- Norton, J. M., Alzerreca, J. J., Suwa, Y., & Klotz, M. G. (2002). *Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria*. *Archives of Microbiology*, 177(2), 139–149.
- Padhi, S. K., Tripathy, S., Mohanty, S., & Maiti, N. K. (2017). *Aerobic and heterotrophic nitrogen removal by Enterobacter cloacae CF-S27 with efficient utilization of hydroxylamine*. *Bioresource Technology*, 232, 285–296. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.049>
- Pester, M., Maixner, F., Berry, D., Rattei, T., Koch, H., Lückner, S., Nowka, B., Richter, A., Spieck, E., Lebedeva, E., Loy, A., Wagner, M., & Daims, H. (2014). *nxB encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing Nitrospira: Functional and phylogenetic marker for Nitrospira*. *Environmental Microbiology*, 16(10), 3055–3071.
- Pjevac, P., Schauburger, C., Poghosyan, L., Herbold, C. W., van Kessel, M. A. H. J., Daebeler, A., Steinberger, M., Jetten, M. S. M., Lückner, S., Wagner, M., & Daims, H. (2017). *AmoA-targeted polymerase chain reaction primers for the specific detection and quantification of comammox Nitrospira in the environment*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1508.

- Prjibelski, A. D., Korobeynikov, A. I., & Lapidus, A. L. (2018). *Sequence Analysis*. In *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology* (pp. 292–322). Elsevier.
- Quartaroli, L., Silva, L. C. F., Silva, C. M., Lima, H. S., de Paula, S. O., de Oliveira, V. M., de Cássia S da Silva, M., Kasuya, M. C. M., de Sousa, M. P., Torres, A. P. R., Souza, R. S., Bassin, J. P., & da Silva, C. C. (2017). *Ammonium removal from high-salinity oilfield-produced water: assessing the microbial community dynamics at increasing salt concentrations*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(2), 859–870. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7902-0>
- Ramanathan, B., Boddicker, A. M., Roane, T. M., & Mosier, A. C. (2017). *Nitrifier gene abundance and diversity in sediments impacted by acid mine drainage*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2136.
- Rogers, S. O., & Bendich, A. J. (1994). *Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi*. En *Plant Molecular Biology Manual* (pp. 183–190). Springer Netherlands.
- Rotthauwe, J. H., Witzel, K. P., & Liesack, W. (1997). *The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4704–4712. <https://doi.org/10.1128/aem.63.12.4704-4712.1997>
- Ruan, Y., Taherzadeh, M. J., Kong, D., Lu, H., Zhao, H., Xu, X., Liu, Y., & Cai, L. (2020). *Nitrogen removal performance and metabolic pathways analysis of a novel aerobic denitrifying halotolerant Pseudomonas balearica strain RAD-17*. *Microorganisms*, 8, 72. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010072>
- Samocha, T. M., & Prangnell, D. I. (2019). *Water Quality Management*. In *Sustainable Biofloc Systems for Marine Shrimp* (pp. 133–151). Elsevier.

- Shu, H., Sun, H., Huang, W., Zhao, Y., Ma, Y., Chen, W., Sun, Y., Chen, X., Zhong, P., Yang, H., Wu, X., Huang, M., & Liao, S. (2022). *Nitrogen removal characteristics and potential application of the heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria Pseudomonas mendocina S16 and Enterobacter cloacae DS'5 isolated from aquaculture wastewater ponds*. *Bioresource Technology*, 345(126541), 126541. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126541>
- Silva, L. C. F., Lima, H. S., Sartoratto, A., Sousa, M. P. de, Torres, A. P. R., Souza, R. S. de, de Paula, S. O., Oliveira, V. M. de, & Silva, C. C. da. (2018). *Effect of salinity in heterotrophic nitrification/aerobic denitrification performed by acclimated microbiota from oil-produced water biological treatment system*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 130, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.03.009>
- Spieck, E., Sass, K., Keuter, S., Hirschmann, S., Spohn, M., Indenbirken, D., Kop, L. F. M., Lückner, S., & Giaveno, A. (2020). *Defining culture conditions for the hidden nitrite-oxidizing bacterium Nitrolancea*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1522.
- Suantika, G., Situmorang, M. L., Kurniawan, J. B., Pratiwi, S. A., Aditiawati, P., Astuti, D. I., Azizah, F. F. N., Djohan, Y. A., Zuhri, U., & Simatupang, T. M. (2018). *Development of a zero water discharge (ZWD)—Recirculating aquaculture system (RAS) hybrid system for super intensive white shrimp (Litopenaeus vannamei) culture under low salinity conditions and its industrial trial in commercial shrimp urban farming in Gresik, East Java, Indonesia*. *Aquaculture Engineering*, 82, 12–24.
- Su, Z., Li, Y., Pan, L., He, Z., Dou, L., Liu, L., & Zhang, M. (2021). *Nitrogen removal performance, quantitative detection and potential application of a novel aerobic denitrifying strain, Pseudomonas sp. GZWN4 isolated from aquaculture water*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44(6), 1237–1251. <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02523-9>

- Thi Dang, O., Hoang Le, D., Tung Le, L., & Hoang Chu, H. (2019). *The role of Pseudomonas in heterotrophic nitrification: A case study on shrimp ponds (Litopenaeus vannamei) in Soc Trang province*. *Microorganisms*, 7(6), 155. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060155>
- Trung Tran, T., Bott, N. J., Dai Lam, N., Trung Nguyen, N., Hoang Thi Dang, O., Hoang Le, D., Tung Le, L., & Hoang Chu, H. (2019). *The role of Pseudomonas in heterotrophic nitrification: A case study on shrimp ponds (Litopenaeus vannamei) in Soc Trang province*. *Microorganisms*, 7(6), 155. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060155>
- Tyagi, A. (2020). *Biological Databases*. Researchgate.Net. [https://www.researchgate.net/publication/344759763\\_Biological\\_Databases](https://www.researchgate.net/publication/344759763_Biological_Databases)
- van Beijnen and Gregg Yan, J. (2019, julio 29). *Ten easy steps towards biofloc production of shrimp or tilapia*. Thefishsite.com. <https://thefishsite.com/articles/ten-easy-steps-towards-biofloc-production-of-shrimp-or-tilapia>
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). *16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study*. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- Wu, L., Peng, L., Wei, W., Wang, D., & Ni, B.-J. (2020). *Nitrous oxide production from wastewater treatment: The potential as energy resource rather than potent greenhouse gas*. *Journal of Hazardous Materials*, 387(121694), 121694. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121694>
- Xu, W., Xu, Y., Su, H., Hu, X., Yang, K., Wen, G., & Cao, Y. (2020). *Characteristics of ammonia removal and nitrifying microbial communities in a hybrid biofloc-RAS for intensive Litopenaeus vannamei culture: A pilot-scale study*. *Water*, 12(11), 3000. <https://doi.org/10.3390/w12113000>

- Yang, L., Ren, Y.-X., Zhao, S.-Q., Liang, X., & Wang, J.-P. (2016). *Isolation and characterization of three heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria from a sequencing batch reactor*. *Annals of Microbiology*, 66(2), 737–747. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1161-7>
- Yang, Ya, Liu, Y., Yang, T., & Lv, Y. (2017). *Characterization of a microbial consortium capable of heterotrophic nitrifying under wide C/N range and its potential application in phenolic and coking wastewater*. *Biochemical Engineering Journal*, 120, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.12.008>
- Zhang, D. Y., Li, W. G., Gong, X. J., & Wang, P. (2016). *Ammonium removal from drinking water by Acinetobacter sp. SFA 10 at low temperature*. *Sustainable Development*.
- Zhang, M., He, T., Chen, M., & Wu, Q. (2022). *Ammonium and hydroxylamine can be preferentially removed during simultaneous nitrification and denitrification by Pseudomonas taiwanensis EN-F2*. *Bioresource Technology*, 350(126912), 126912. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126912>
- Zhang, N., Chen, H., Lyu, Y., & Wang, Y. (2019). *Nitrogen removal by a metal-resistant bacterium, Pseudomonas putida ZN1, capable of heterotrophic nitrification–aerobic denitrification*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology (Oxford, Oxfordshire: 1986)*, 94(4), 1165–1175. <https://doi.org/10.1002/jctb.5863>
- Zhou, M., Ye, H., & Zhao, X. (2014). *Isolation and characterization of a novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium Pseudomonas stutzeri KTB for bioremediation of wastewater*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering: BBE*, 19(2), 231–238. <https://doi.org/10.1007/s12257-013-0580-1>

## CAPITULO VII

### 5. ANEXOS

#### Anexo 1.

*Modulo escala sistema súper intensivo híbrido RAS – BIOFLOC a baja salinidad.*

*Laboratorio Centro De Biotecnología Acuícola Sostenible (CBAS).*



## Anexo 2.

*Preparación de medios de cultivo selectivo para aislamiento de bacterias nitrificantes heterotróficas.*



## Anexo 3.

*Aislamiento bacterias nitrificantes heterotróficas. (A) Toma de muestra, (B) enriquecimiento con medios selectivos, (C) Siembra en medio sólido, (D) Obtención de cultivo axénico.*



#### Anexo 4.

*Extracción de ADN de los aislados bacterianos nitrificantes.*



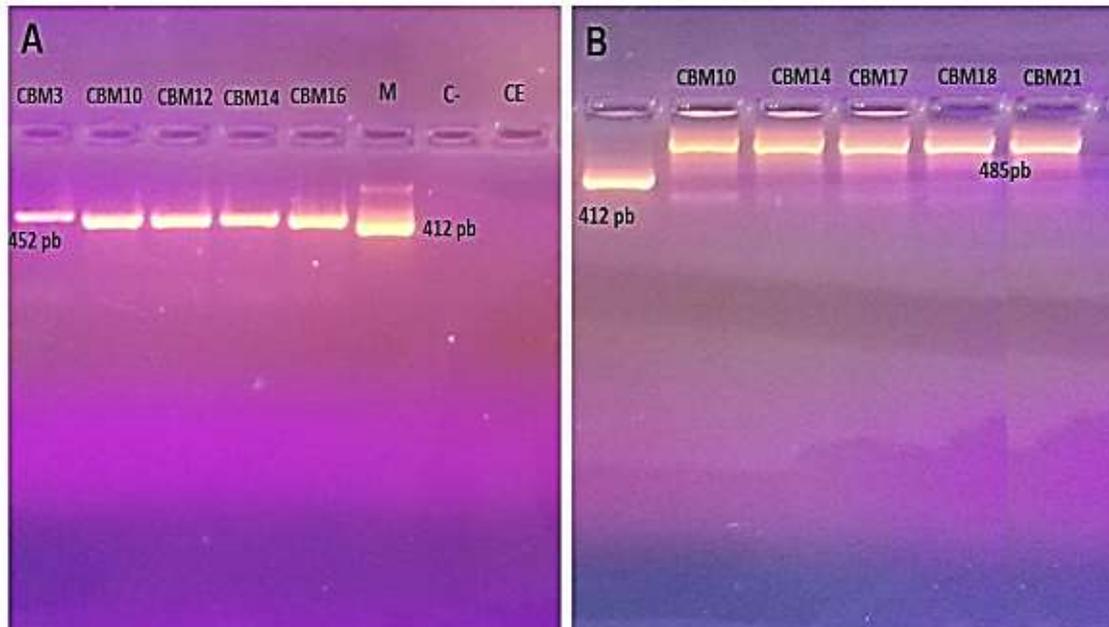
#### Anexo 5.

*Evaluación In vivo del consorcio bacteriano.*



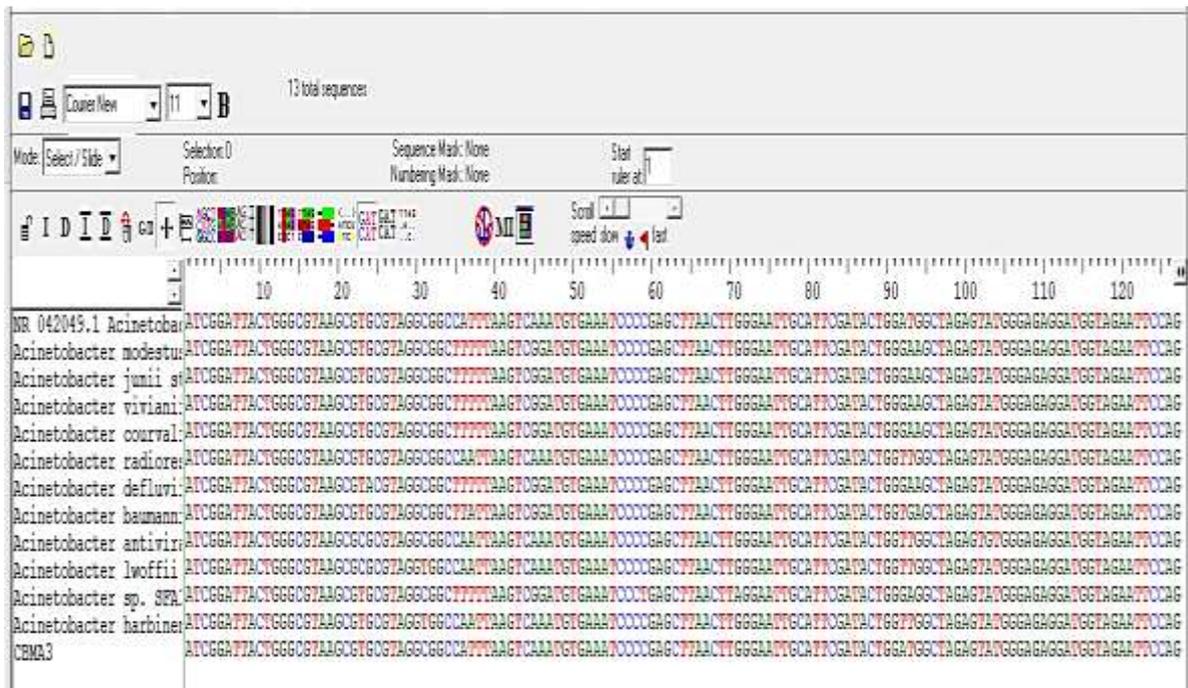
## Anexo 6.

Detección de genes funcionales en los aislados bacterianos. (A) Gen amonio monooxigenasa subunidad A, (B) Gen nitrito oxidoreductasa subunidad B.



## Anexo 7.

Alineamiento de secuencias del gen ARNr 16S de los aislados nitrificantes mediante el programa BIOEDIT.



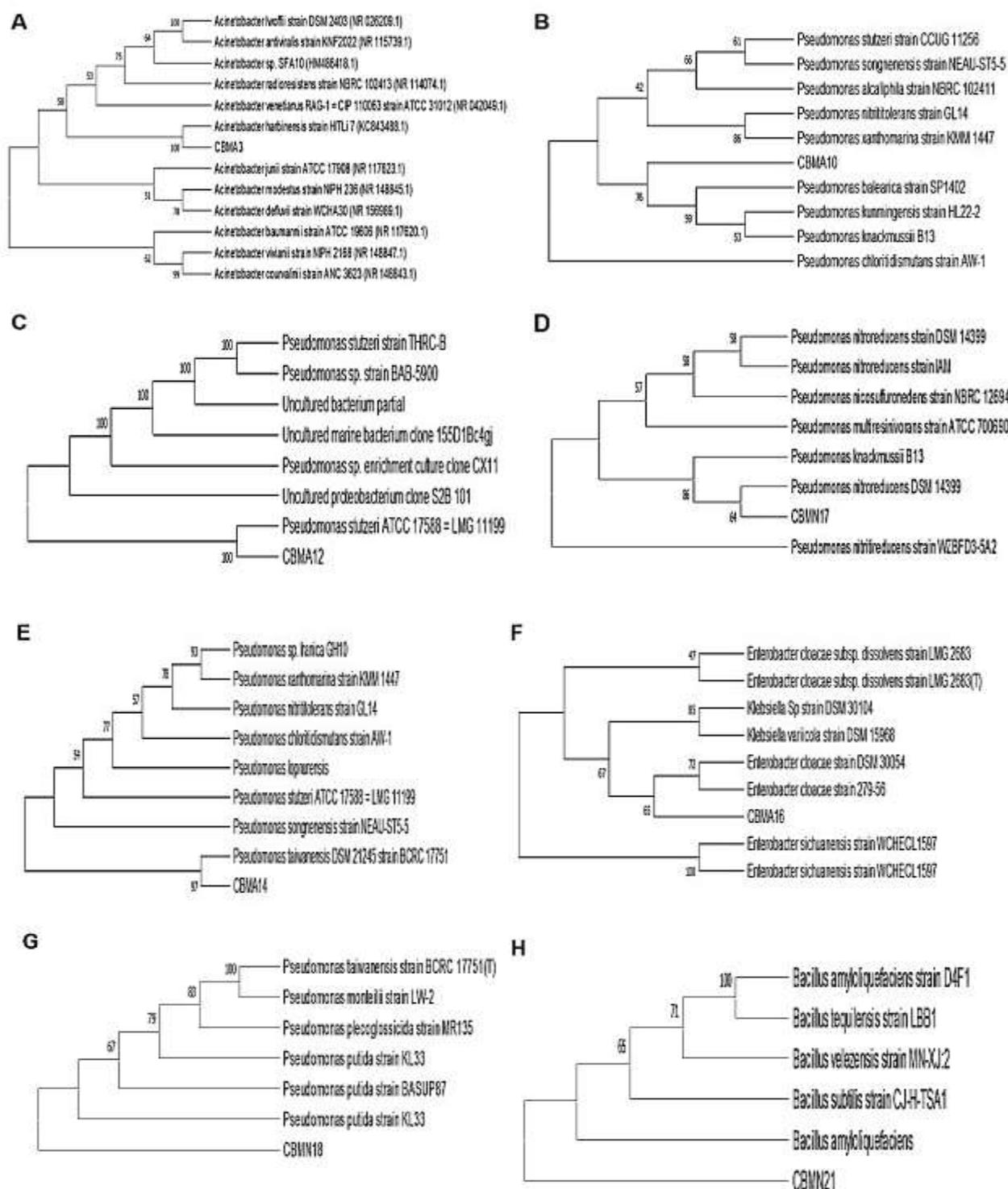
## Anexo 8.

Comparación de secuencias obtenidas en la base de datos NCBI mediante la herramienta BLAST.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter harbiniensis strain H111.7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Acinetobacter harbini...	1587	1587	77%	0.0	97.33%	1328	KC843468.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter lwoffii strain DSM 2403 16S ribosomal RNA, partial sequence	Acinetobacter lwoffii	1687	1587	78%	0.0	97.13%	1460	NR_026209.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baylyi strain B2 16S ribosomal RNA, partial sequence	Acinetobacter baylyi	1583	1583	76%	0.0	97.82%	1408	NR_115542.2
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter gyldenberghii strain RUH 422 16S ribosomal RNA, partial sequence	Acinetobacter gylden...	1581	1581	77%	0.0	97.22%	1456	NR_042025.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter johnsonii strain ATCC 17909 16S ribosomal RNA, partial sequence	Acinetobacter johnsonii	1580	1580	78%	0.0	97.02%	1466	NR_164627.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter johnsonii strain ATCC 17909 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Acinetobacter johnsonii	1580	1580	78%	0.0	97.02%	1529	MK184297.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter oryzae strain B23/T1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Acinetobacter oryzae	1580	1580	78%	0.0	97.02%	1499	MH971139.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter johnsonii partial 16S rRNA gene, strain HAMB1 1959	Acinetobacter johnsonii	1580	1580	78%	0.0	97.02%	1513	LT259949.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter niscicola strain LW15 16S ribosomal RNA, partial sequence	Acinetobacter niscicola	1580	1580	78%	0.0	97.02%	1501	NR_159919.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii strain DSM 30007 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Acinetobacter baum...	1580	1580	78%	0.0	97.02%	1517	KY952583.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter pragansis strain ANC 4149 16S ribosomal RNA, partial sequence	Acinetobacter prag...	1580	1580	78%	0.0	97.03%	1490	NR_152069.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter sp. NIPH 2171 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Acinetobacter variabilis	1580	1580	78%	0.0	97.03%	1500	KC763178.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter johnsonii strain ATCC 17909 16S ribosomal RNA, partial sequence	Acinetobacter johnsonii	1580	1580	78%	0.0	97.02%	1530	NR_117524.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter johnsonii strain FDAARGOS_910 chromosome, complete genome	Acinetobacter johnsonii	1580	11060	78%	0.0	97.02%	3598417	CP265566.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas fasciulus strain CIP 103679 16S ribosomal RNA, partial sequence	Pseudomonas fasciulus	1500	1500	78%	0.0	97.02%	1413	NR_104943.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter johnsonii strain DSM 6952 16S ribosomal RNA, partial sequence	Acinetobacter johnsonii	1576	1576	78%	0.0	96.81%	1460	NR_119114.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter cumulans strain WCHAe06092 chromosome, complete genome	Acinetobacter cumul...	1574	11021	78%	0.0	96.91%	3427709	CP235934.2
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter chengdeensis strain WCHAe060015 16S ribosomal RNA, partial sequence	Acinetobacter cheng...	1574	1574	78%	0.0	96.91%	1532	NR_174302.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter johnsonii strain CIP 64.6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Acinetobacter johnsonii	1574	1574	78%	0.0	96.92%	1499	MG846022.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter variabilis strain NIPH 2171 16S ribosomal RNA, partial sequence	Acinetobacter variabilis	1574	1574	78%	0.0	96.92%	1527	NR_124685.1

## **Anexo 9.**

*Análisis filogenético de cepas bacterianas aisladas. (A) CBM3, (B) CBM10, (C) CBM12, (D) CBM17, (E) CBM14, (F) CBM16, (G) CBM18, (H) CBM21.*



## Anexo 10.

*Evaluación del potencial nitrificante de los aislados bacterianos.*

