

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

**ESCUELA DE POSGRADO MAESTRÍA EN CIENCIAS
CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**



**Aplicación de tecnologías ómicas al estudio de las
comunidades microbianas nitrificantes y desnitrificantes para
la obtención de biofiltros sumergidos y su evaluación a nivel
experimental en el cultivo intensivo de *Litopenaeus vannamei*.**

TESIS

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

Autora: Luz Fernanda Dominguez Mendoza

Tumbes, 2020

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR



Aplicación de tecnologías ómicas al estudio de las comunidades microbianas nitrificantes y desnitrificantes para la obtención de biofiltros sumergidos y su evaluación a nivel experimental en el cultivo intensivo de *Litopenaeus vannamei*.

Tesis aprobada en forma y estilo por:

Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila (Presidente)_____

Mg. Ricardo Williams Saldoya Tinedo (Secretario)_____

PhD. Benoit Mathieu Diringer (Vocal)_____

Tumbes, 2020

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR



Aplicación de tecnologías ómicas al estudio de las comunidades microbianas nitrificantes y desnitrificantes para la obtención de biofiltros sumergidos y su evaluación a nivel experimental en el cultivo intensivo de *Litopenaeus vannamei*.

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

Br. Luz Fernanda Dominguez Mendoza (Autora)_____

PhD. Virna Alexia Cedeño Escobar (Asesora) _____

Tumbes, 2020

A Dios por todas las bendiciones recibidas.
A mis padres y hermanos por su infinito apoyo y motivación.

Agradecimiento

Al programa de Becas de post-grado del FONDECYT en coordinación con la Universidad Nacional de Tumbes y la empresa biotecnológica INCABIOTEC SAC.

A mi asesora de tesis Virna Alexia Cedeño Escobar Ph.D - Coordinadora Académica de la maestría en Biotecnología Molecular de la Universidad Nacional de Tumbes, por el apoyo incondicional en la realización de este trabajo de tesis y sobre todo por la confianza depositada.

Al Blgo. Juan Gerardo Quimi Mujica M.Sc., por la asesoría brindada durante el desarrollo de la tesis, siempre atendiendo mis dudas. Agradecimiento especial a Jordana Jineika Lopez Parra, Blga. Jenny Maribel Risco Cunayque M.Sc, Mblga. Verónica Inés Sernaqué de la Cruz, Blga. Dámaris Adelaida Ésquen Bayona, Ing. Carlos Emilio Flores Aguilar, Marcos Poicon Chiroque, Elver Adalberto Jimenéz Peña y Carlos Manuel Delgado Sandoval miembros del Grupo Crustáceos- CEBAP/Incabiotec SAC por todo el apoyo brindado sin el cual me hubiera sido difícil lograr cada objetivo.

A mis maestros Eric Louis Mialhe Matonnier Ph.D, Virna Alexia Cedeño Escobar Ph.D, Emmerik Motte Darricau Ph.D, Max Salvatierra Alor M.Sc, por sus enseñanzas y la motivación para seguir una carrera en la investigación científica. Al personal técnico de Incabiotec SAC; Tèc. Pedro Miguel Masías Ramírez, Tèc. Cesar Santos Chanta, Tèc.Yessica Alvarado Díaz y Tèc. Yessica Rivas Preciado por su paciencia y compromiso.

A la empresa Bilbosa S.A por permitirme realizar una pasantía en el tema de biorremediación aplicada a la acuicultura en coordinación con la empresa biotecnológica Concepto Azul S.A– Grupo Visión, en especial a Virna Alexia Cedeño Escobar Ph.D, Blgo. Jefferson Javier Intriago Angulo M.Sc, Ing. Gorky Vladimir Lajones Ruano y todos los miembros del proyecto quienes me apoyaron con sus ideas y consejos.

Al Blgo. Gino Aroni Lucana por todo su apoyo incondicional. Gracias...

A los revisores de ésta tesis, quienes atendieron mis dudas y me apoyaron con sus correcciones, sugerencias y comentarios.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
Licenciada
Resolución del Consejo Directivo N° 155-2019-SUNEDU/CD
ESCUELA DE POSGRADO
Tumbes - Perú

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

En Tumbes, a los veintiséis días del mes de febrero del año dos mil veinte, a las 08:00 horas, en EL AULA N-1 DE LA ESCUELA DE POSGRADO UNTUMBES, se reunieron los miembros del jurado designados con Resolución Directoral N° 021-2019/UNTUMBES-EPG-D; Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila - Presidente; Mg. Ricardo Williams Saldoya Tinedo - Secretario; Ph. D. Benoit Mathieu Diringier – Vocal y con Resolución Directoral N° 030-2020/UNTUMBES-EPG-D, se fijó la fecha de sustentación y defensa de la tesis: **Aplicación de tecnologías ómicas al estudio de las comunidades microbianas nitrificantes y desnitrificantes para la obtención de biofiltros sumergidos y su evaluación a nivel experimental en el cultivo intensivo de *Litopenaeus vannamei***, presentada por la estudiante del Programa de Maestría en Ciencias con mención en Biotecnología Molecular Br. Luz Fernanda Domínguez Mendoza, asesorada por el Ph. D Virna Alexia Cedeño Escobar.

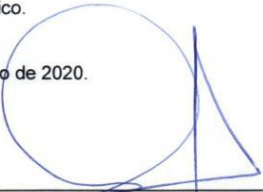
Concluida la exposición y sustentación, absueltas las preguntas y efectuadas las observaciones, lo declaran: SOBRESALIENTE, dando cumplimiento al Art. 29° del Reglamento de Investigación con fines de Graduación en la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las 08:40 horas, se dio por concluido el acto académico, y dando conformidad se procedió a firmar la presente acta en presencia del público.

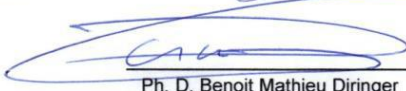
Tumbes, 26 de febrero de 2020.



Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila
Presidente



Mg. Ricardo Williams Saldoya Tinedo
Secretario



Ph. D. Benoit Mathieu Diringier
Vocal

C.c. Jurado de Proyecto de Tesis (3), Asesor (1), sustentante (1), UI (2)

RESUMEN:

La acumulación de nitrógeno (-N) es un problema grave en el cultivo intensivo de *Litopenaeus vannamei* ya que está asociado a eventos de mortalidad masiva. En el presente estudio, se evaluó el efecto del uso de biofiltros sumergidos sobre los niveles de -N y la supervivencia de langostino en un cultivo intensivo experimental durante 60 días sin sifoneos y sin recambios de agua. Los biofiltros fueron previamente enriquecidos; a) Usando un protocolo de enriquecimiento para la obtención de biofilm nitrificante o b) Usando un consorcio de bacterias heterotróficas nitrificantes caracterizadas a nivel molecular. Durante el enriquecimiento, se evaluó el efecto de la fuente de carbono en la eliminación biológica del nitrógeno. En el enriquecimiento con bicarbonato de sodio el nitrógeno amoniacal total (TAN) fue removido con una eficiencia de $96.04 \pm 1.16\%$ y el análisis metagenómico reveló que el perfil taxonómico estuvo dominado por el phylum *Proteobacteria* (51.37%) y *Bacteroidetes* (9.72%). Además, se observó un aumento de 0,41% a 2,80% en la abundancia relativa del phylum *Nitrospirae*. Para la obtención de bacterias heterotróficas nitrificantes se evaluó la capacidad de nitrificación heterotrófica de 8 cepas aisladas a partir de suelo de manglar, perifitón y biofiltros. Las cepas seleccionadas fueron *Bacillus megaterium*, *Bacillus haynesii*, *Bacillus wiedmannii* y *Bacillus tequilensis* en las cuales se identificaron mediante PCR regiones específicas de los genes *nxB*, *nirS* y *nirK* y mediante espectrometría de masas MALDI TOF TOF se identificaron enzimas claves en los procesos de nitrificación/desnitrificación reportándose por primera vez las enzimas tipo amoníaco monoxigenasa (AMO) y nitrito óxido reductasa (NXR) en el género *Bacillus*. En los tanques con biofiltros la calidad del agua fue óptima y los niveles de TAN y nitrito fueron más bajos respecto al control (sin biofiltro). La supervivencia en los tanques con biofiltros fueron de 96.67% y 98.33%, mientras que en el control fue de 30.00%. En los biofiltros enriquecidos con el consorcio bacteriano se identificaron enzimas relacionadas a los procesos de nitrificación/desnitrificación y metabolismo del fosfato y azufre. Los resultados

del presente estudio abren nuevas vías para futuras investigaciones aplicando las tecnologías ómicas al estudio de las comunidades microbianas involucradas en los ciclos del nitrógeno, fósforo y azufre para la biorremediación en la acuicultura.

Palabras clave: Biofiltro sumergido, Nitrificación heterotrófica, ómicas, *Bacillus*

ABSTRACT:

The accumulation of nitrogen (-N) is a serious problem in the Intensive culture system of *Litopenaeus vannamei*, since it is associated with mass mortality events. In the present study, the effect of the use of *submerged biofilters* on the levels of -N and the survival in an intensive shrimp farming at experimental level was evaluated for 60 days without siphoning and without water changes. The biofilters were previously enriched; a) Using an enrichment protocol for obtaining biofilm nitrifying and b) Using a consortium of heterotrophic nitrifying bacteria characterized at the molecular level. During the enrichment tests, the effect of the carbon source on the biological removal of nitrogen was evaluated. In the enrichment with sodium bicarbonate, total amoniacal nitrogen (TAN) was removed with an efficiency of $96.04 \pm 1.16\%$ and the metagenomic analysis revealed that the taxonomic profile was dominated by the phylum *Proteobacteria* (51.37%) and *Bacteroidetes* (9.72%). In addition, an increase of 0.41% to 2.80% in the abundance of phylum *Nitrospirae* was observed. To obtain heterotrophic nitrifying bacteria, the heterotrophic nitrification capacity of 8 strains isolated from mangrove soil, periphery and biofilters was evaluated. The strains selected were *Bacillus megaterium*, *Bacillus haynesii*, *Bacillus wiedmannii* and *Bacillus tequilensis* in which the specific regions of *nxB*, *nirS* and *nirK* genes were identified by PCR and various key enzymes in the nitrification / denitrification processes by MALDI TOF TOF mass spectrometry, the enzymes ammonia monooxygenase (AMO) and nitrite oxide reductase (NXR) in the genus *Bacillus* are first reported. In shrimp culture ponds with biofilters the water quality was optimal and the levels of TAN and nitrite were lower compared to the control (without biofilter). The survival in the shrimp culture ponds with biofilters was 96.67% and 98.33%, while in the control it was 30%. Proteomic analysis of biofilters enriched with the bacterial consortium reveals the presence of enzymes related to nitrification / denitrification and phosphate and sulfur metabolism processes. The results of the present study would release new avenues for future research by applying omic technologies to the study of microbial communities involved in the nitrogen, phosphorus and sulfur cycles for bioremediation in aquaculture.

Keywords: Submerged biofilter, Heterotrophic nitrification, omics, *Bacillus*