

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN ACUICULTURA Y GESTIÓN AMBIENTAL



**Caracterización molecular de bacterias con capacidad
biorremediadora, aislados de canales de marea aledaños a zonas
de cultivo de langostino de Tumbes**

TESIS

**Para optar el Grado de Maestro en Acuicultura y Gestión
Ambiental**

AUTOR: William Fernando Noriega Alcántara

Tumbes, 2023

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN ACUICULTURA Y GESTIÓN AMBIENTAL



**Caracterización molecular de bacterias con capacidad
biorremediadora, aislados de canales de marea aledaños a zonas
de cultivo de langostino de Tumbes**

Tesis aprobada en forma y estipo por:

Dr. Carlos Alberto Deza Navarrete

Presidente

Dr. Leocadio Malca Acuña

Secretario

Dr. Javier Mijahuanca Infante

Miembro

Tumbes, 2023

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN ACUICULTURA Y GESTIÓN AMBIENTAL



**Caracterización molecular de bacterias con capacidad
biorremediadora, aislados de canales de marea aledaños a zonas
de cultivo de langostino de Tumbes**

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

Br. William Fernando Noriega Alcántara (Autor)

Mg. Marco Antonio Zapata Cruz (Asesor)

Tumbes, 2023

ACTA DE SUSTENTACIÓN



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

Licenciada

Resolución del Consejo Directivo N° 155-2019-SUNEDU/CD

ESCUELA DE POSGRADO

Tumbes – Perú


ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

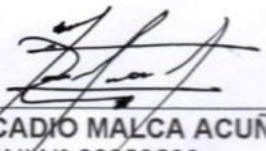
En Tumbes, siendo las dieciséis horas del día trece de enero del dos mil veintitrés, se reunieron mediante la modalidad virtual por la plataforma zoom <https://us02web.zoom.us/j/6063115712>, los miembros del jurado conformado con la **RESOLUCIÓN N° 88-2021/UNTUMBES-EPG-D**, del 30 de abril del 2021: **Dr. CARLOS ALBERTO DEZA NAVARRETE** (presidente); **Dr. LEOCADIO MALCA ACUÑA**, (secretario); **Dr. JAVIER MIJAHUANCA INFANTE**, (vocal); para proceder al acto de sustentación y defensa de la tesis titulada: “**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS CON CAPACIDAD BIORREMEDIADORA, AISLADOS DE CANALES DE MAREA ALEDAÑOS A ZONAS DE CULTIVO DE LANGOSTINO DE TUMBES**”, presentada por el **Br. WILLIAM FERNANDO NORIEGA ALCÁNTARA** para optar el grado académico de maestro en Acuicultura y Gestión Ambiental. Actuó en la condición de asesor, el **Mg. MARCO ANTONIO ZAPATA CRUZ**


Concluido el acto de sustentación y defensa, absueltas las preguntas formuladas y efectuadas las correspondientes observaciones, el jurado calificador decidió declarar: **APROBADA** la tesis, por unanimidad con el calificativo de **MUY BUENA**, en conformidad con lo normado en el artículo 91. del Reglamento de Tesis para Pregrado y Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes.

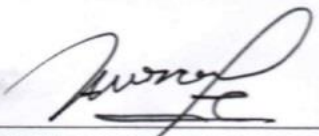
Siendo las diecisiete horas del mismo día, se dio por concluido el indicado acto académico y en expresión de conformidad se procedió a la suscripción de la presente acta.

Tumbes, 13 de enero del 2023


Dr. CARLOS ALBERTO DEZA NAVARRETE
DNI N° 16532820
ORCID N° 0000-0002-3324-3741
(PRESIDENTE)


Dr. LEOCADIO MALCA ACUÑA
DNI N° 00250560
ORCID N° 0000-0002-4428-6114
(SECRETARIO)


Dr. JAVIER MIJAHUANCA INFANTE
DNI N° 00227398
ORCID N° 0000-0002-5701-3967
(MIEMBRO)


Mg. MARCO ANTONIO ZAPATA CRUZ
DNI N° 00219827
ORCID N° 0000-0002-9018-280X
(ASESOR)

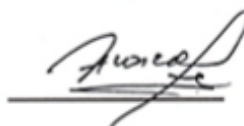
Caracterización molecular de bacterias con capacidad biorremediadora, aislados de canales de marea aledaños a zonas de cultivo de langostino de Tumbes

INFORME DE ORIGINALIDAD

12%	12%	6%	%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.untumbes.edu.pe Fuente de Internet	4%
2	onlinelibrary.wiley.com Fuente de Internet	1%
3	tesis.pucp.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	tel.archives-ouvertes.fr Fuente de Internet	1%
5	repositorio.untumbes.edu.pe:8080 Fuente de Internet	1%
6	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1%
7	www.dspace.espol.edu.ec Fuente de Internet	<1%
8	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	<1%



Mg. Marco Antonio Zapata Cruz (Asesor)

9	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
10	repositorio.promperu.gob.pe Fuente de Internet	<1 %
11	Yuanping Fang, Congli Chen, Bin Cui, Dandan Zhou. "Self-rescue of nitrogen-cycling bacteria under β -lactam antibiotics stress during managed aquifer recharge (MAR): microbial collaboration and anti-resistance", Water Research, 2023 Publicación	<1 %
12	bdigital.unal.edu.co Fuente de Internet	<1 %
13	issuu.com Fuente de Internet	<1 %
14	worldwidescience.org Fuente de Internet	<1 %
15	www.biorxiv.org Fuente de Internet	<1 %
16	doku.pub Fuente de Internet	<1 %
17	www.donner.nl Fuente de Internet	<1 %
18	cdn.www.gob.pe Fuente de Internet	<1 %



Mg. Marco Antonio Zapata Cruz (Asesor)

19	hidrobiologica.izt.uam.mx Fuente de Internet	<1 %
20	munin.uit.no Fuente de Internet	<1 %
21	repositorio.undac.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
22	repositorio.utmachala.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
23	www.globalseafood.org Fuente de Internet	<1 %
24	globalecology.creaf.cat Fuente de Internet	<1 %
25	idoc.pub Fuente de Internet	<1 %
26	www.bib.fcien.edu.uy Fuente de Internet	<1 %
27	repositorio.puce.edu.ec Fuente de Internet	<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 15 words

Excluir bibliografía

Activo



Mg. Marco Antonio Zapata Cruz (Asesor)

DEDICATORIA

A mi esposa María e hijos William y Abigail, que han sido parte fundamental para orientar mi camino.

A mi madre, Carmen Alcántara, que, con su gran esfuerzo y apoyo incondicional, tanto económico como emocional, me ha ayudado a salir adelante personal y profesionalmente, trazándome metas desde muy pequeño para mi futuro.

A mis amigos, que a pesar de todo han estado presente y me han ayudado en diferentes aspectos tanto en los estudios como en este trabajo de investigación.

William

AGRADECIMIENTO

Me es grato agradecer enormemente a mi asesor Mg. Marco Antonio Zapata Cruz y cooasesor Dr. Rubén Hernán Alfaro Aguilera, ya que gracias a su gran apoyo y conocimientos otorgados me ha sido de mucha ayuda y guía para la elaboración de este trabajo, además de la paciencia que me han tenido hasta culminar este trabajo.

A mis amigos y personas cercanas por enviarme las “buenas vibras”, pero más que todo, por realmente alentarme en cada momento que han estado presente.

El Autor

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
I. INTRODUCCIÓN	17
II. REVISIÓN DE LITERATURA (ESTADO DE ARTE).....	19
2.1. Antecedentes de estudio.....	19
2.2. Bases teórico-científicas.....	21
2.2.1. Cultivo de langostino y su impacto en el ambiente	21
2.2.2. Biorremediación	23
2.2.3. Bacterias biorremediadoras	24
2.3. Definición de términos básicos.....	24
2.3.1. Canales de marea	24
2.3.2. Bacterias heterotróficas	25
2.3.3. Bacterias nitrificantes.....	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1. Localidad y periodo de ejecución.....	26
3.2. Tipo de estudio y diseño de contrastación de la hipótesis.....	26
3.3. Población, muestra y muestreo.....	26
3.4. Métodos, técnicas e instrumentación de recolección de datos.....	27
3.4.1. Aislamiento de cepas bacterianas biorremediadoras de detritus orgánicos y compuestos nitrogenados	27
3.4.2. Análisis metagenómico en muestras suelos	27
3.4.3. Evaluación de propiedades biorremediadoras en microcosmos	27
3.4.4. Pruebas de antagonismo entre bacterias para elaboración de consorcio	28
3.4.5. Identificación molecular de microorganismos mediante secuenciación de los genes 16S ARNr.....	28
3.5. Procesamiento y análisis de datos	29
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
4.1. Muestreo	30
4.2. Aislamiento de cepas bacterianas biorremediadoras de detritus orgánicos y compuestos nitrogenados	32
4.3. Análisis metagenómico en muestras de suelo.....	34
4.4. Evaluación de propiedades biorremediadoras en microcosmos.....	39
4.5. Antagonismo entre bacterias para elaboración de consorcio.....	41

4.6. Comportamiento final de consorcio bacteriano en parámetros químicos de suelo y agua.....	41
4.7. Identificación molecular de microorganismos mediante secuenciación de los genes 16S ARNr.....	42
V. CONCLUSIONES	45
VI. RECOMENDACIONES	47
VII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
VIII.ANEXOS	60

ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Página</i>
Tabla 1: Ubicación georreferenciada de los puntos de muestreo y condiciones climáticas en la colecta de muestras de agua y suelo de los canales de marea evaluados.	28
Tabla 2: Registro de parámetros físico-químicos en agua y suelo de canales de marea evaluados	29
Tabla 3: Recuento promedio de microorganismos (UFC/g) en diferentes medios de cultivo, a partir de muestras de suelo de canales de marea evaluados	30
Tabla 4: Evaluación de respirometría y ORP en microcosmos, por cepas bacterianas aisladas de canales de marea aledañas a campos de cultivo de langostino.	36
Tabla 5: Evaluación de TAN y nitritos en microcosmos, por cepas bacterianas aisladas de canales de marea aledañas a campos de cultivo de langostino.	37
Tabla 6: Prueba de antagonismo entre las 4 cepas bacterianas seleccionadas.	38
Tabla 7: Evaluación de respirometría, ORP, Tan y nitritos en microcosmos, de las cepas 1 y 2, consorcio 1–2 y control.	38
Tabla 8: Identificación molecular de cepas bacterianas aisladas a partir de suelo del canal de marea El Bendito.	39

ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
Figura 1: Mapa del departamento de Tumbes y ubicación de sectores de colecta de muestra de agua y suelo.	27
Figura 2: Abundancia de Archaea por clase (%) en suelo de tres sectores de canales de marea aledaños a cultivos de langostino.	31
Figura 3: Abundancia de Archaea por familia (%) en suelo de tres sectores de canales de marea aledaños a cultivos de langostino.	31
Figura 4: Abundancia de Archaea por género (%) en suelo de tres sectores de canales de marea aledaños a cultivos de langostino.	32
Figura 5: Abundancia de Bacteria por clase (%) en suelo de tres sectores de canales de marea aledaños a cultivos de langostino.	33
Figura 6: Abundancia de Bacteria por especie (%) en suelo de tres sectores de canales de marea aledaños a cultivos de langostino.	40
Figura 7: Árbol filogenético mostrando las relaciones de las bacterias biorremediadoras con cepas bacterianas ATCC y referenciales. Se utilizó como outgroup a la bacteria <i>V. cholerae</i> .	40

ÍNDICE DE ANEXOS

	<i>Página</i>
Anexo 1 Colecta de muestras y evaluación de parámetros físico-químicos del agua y suelo de los canales de marea evaluados.....	55
Anexo 2 Análisis microbiológico para recuento microbiano y aislamiento de bacterias biorremediadoras.....	56
Anexo 3 Extracción de ADN genómico a partir de suelo de canales de marea	57
Anexo 4 Flujograma del procedimiento de identificación mediante secuenciación del gen 16S ARNr, en aislados bacterianos obtenidos a partir de suelo de canales de marea.....	58
Anexo 5 Secuencias genéticas generadas a partir de secuenciación del gen 16S ARNr de cepas bacterianas aisladas a partir de suelo de canales de marea	59

RESUMEN

El cultivo de langostino en Tumbes se concentra en zonas de manglares, generando impacto negativo por vertimiento de efluentes a los canales de marea, generando eutroficación. Uno de los procedimientos que pueden ayudar a mejorar esta problemática es la utilización de microorganismos nativos para procesos de biorremediación por bioaumentación en ambientes naturales contaminados. Se realizaron estudios metagenómicos de suelo de canales de marea adyacentes a los cultivos de langostino y aislamiento de bacterias con características biorremediadoras, basados en resultados obtenidos de la respiración de suelo. La metagenómica permitió identificar Arqueas y Bacteria, no cultivables y cultivables con potencial biorremediador, y otras oportunistas y patógenas de humanos, animales y plantas. Se aislaron y caracterizaron molecularmente dos cepas bacterianas identificadas como *Bacillus cereus* y *Bacillus proteolyticus* que aumentaron significativamente la respiración del suelo. El consorcio preparado con estas bacterias no aumentó significativamente los procesos de respiración de suelo comparado con la utilización individual de las mismas, pero sí aumentaron significativamente su valor comparándolo con el control. Se concluye que las cepas bacterianas aisladas sí tienen potencial biorremediador de suelos contaminados con materia orgánica.

Palabras clave: Bacterias biorremediadoras, canales de marea, suelo contaminado.

ABSTRACT

Shrimp farming in Tumbes is concentrated in mangrove areas, generating a negative impact due to the discharge of effluents into tidal channels, generating eutrophication. One procedure that can help to improve this problem is the use of native microorganisms for bioremediation processes by bioaugmentation in contaminated natural environments. Metagenomic studies of soil from tidal channels adjacent to shrimp farms and isolation of bacteria with bioremediation characteristics were carried out, based on results obtained from soil respiration. The metagenomics allowed to identify Archaea and Bacteria, non-cultivable and cultivable with bioremedial potential, and other opportunistic and pathogenic of humans, animals and plants. Two bacterial strains identified as *Bacillus cereus* and *Bacillus proteolyticus* that significantly increased soil respiration were isolated and molecularly characterized. The consortium prepared with these bacteria did not significantly increase the soil respiration processes compared to their individual use, but they did significantly increase their value compared to the control. It is concluded that the isolated bacterial strains do have bioremediation potential for soils contaminated with organic matter.

Keywords: Bioremedial bacteria, tidal channels, contaminated soil.

- a. noriegalcqw@gmail.com Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar.
Universidad Nacional de Tumbes.
- b. mzapatac@untumbes.edu.pe Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar.
Universidad Nacional de Tumbes.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de langostino forma parte de las principales actividades productivas de la zona norte del Perú, que involucra a los departamentos de Tumbes y Piura, que para el año 2019 produjeron un total de 29 900 t de langostino, con un valor de 178 millones de dólares como producto exportado (Comisión de Promoción del Perú para la Exportación y el Turismo [PromPerú], 2020). A la vista es un negocio de alta rentabilidad y generador de muchos puestos de trabajo para la población, pero trae consigo problemas de contaminación ambiental arraigados por casi 30 años de actividad continua y que impactan negativamente sobre los ambientes naturales colindantes a las empresas que se dedican a esta actividad comercial (Hopking et al., 1995; Mialhe et al., 2013). Aun cuando existen normativas que regulan los valores mínimos de contaminantes en los efluentes de los campos de cultivo, estos no son aplicados en su totalidad, debido a la presencia de empresas informales que no cumplen con todos los requisitos necesarios para la producción de langostino, entre ellos el estudio de impacto ambiental (EIA) que solicita la autoridad competente para los procesos de habilitación, que autoriza el inicio de actividades en el centro de cultivo (Ministerio del Ambiente [MINAM], 2018).

Uno de los principales contaminantes generados en el cultivo de langostino son las excretas y los residuos de alimento; produciéndose material orgánico particulado en la columna de agua y que se acumulan continuamente sobre los fondos de los estanques de cultivo e incluyendo los canales de marea aledaños a ellos. Estos restos de materia orgánica bajo condiciones anóxicas y la presencia de ciertos grupos de microorganismos anaeróbicos, generan procesos de reducción en el suelo, con la liberación de compuestos de alta toxicidad como los sulfuros, que impactan negativamente sobre los organismos acuáticos de cultivo y silvestres (Barraza-Guardado et al., 2013; Hossain y Hasan, 2017).

Así tenemos que una de las alternativas para reducir el impacto negativo de los desechos orgánicos en los suelos, es la utilización de bacterias aeróbicas individuales o en consorcio. Estas bacterias son producidas de manera comercial, generando diferentes efectos tanto positivos como negativos, que dependen de las

condiciones ambientales de las que fueron aisladas, reduciendo su efectividad en otras zonas de cultivo o ambientes naturales (Ghattas et al., 2017; Hopkins et al., 2013).

Bajo este contexto, se planteó aislar bacterias nativas degradadoras de contaminantes orgánicos generados por actividades antrópicas como el cultivo de langostino, que permitan mejorar la calidad de suelos, del agua de estanques de cultivo de langostino y ambientes naturales aledaños a ellos; y así disminuir los procesos de eutrofización que alteran significativamente la flora y fauna de los manglares de Tumbes.

II. REVISIÓN DE LITERATURA (ESTADO DE ARTE)

2.1. Antecedentes de estudio

Thatoi et al. (2013), mencionó que el ecosistema de manglares es muy rico en diversidad microbiana, describiéndose al menos el 5% de las especies, que en muchos casos no se conoce, ni su función ecológica ni su potencial de aplicación. Asimismo, actualmente las tecnologías desarrolladas recientemente en biología molecular y genética ofrecen una gran promesa para explorar el potencial de la diversidad microbiana.

Según Barman (2020), la bioaugmentación es un tipo de biorremediación que implica la adición frecuente de microorganismos autóctonos o exógenos a las zonas contaminadas. A la vez, dos factores limitan el uso de cultivos microbianos incorporados en una unidad de tratamiento. La primera debido a que los cultivos agregados rara vez compiten con una población autóctona, y que le permitan desarrollar y mantener niveles de población útiles. Por otro lado, la mayoría de los suelos con exposición prolongada a desechos biodegradables tienen microorganismos autóctonos que son eficaces degradándolos, si la unidad de tratamiento de suelo está bien gestionada.

Por su parte Antony S. & R. Philip. (2006), refieren que la biorremediación mediante el uso de microbios/enzimas en los estanques de cultivo, es un método adecuado que corrige la calidad del agua, y promueve la salud y mantiene estable los ambientes acuícolas. La biorremediación implica la degradación de componentes orgánicos a dióxido de carbono mediante bacterias heterótrofas, optimizando la productividad de microalgas, que a la vez mejora la nutrición del langostino, y que va de la mano con los procesos de nitrificación y desnitrificación para reducir los componentes nitrogenados y así evitar la formación de compuestos tóxicos como los nitritos y sulfuros.

Según Soltani et al. (2019), el uso de bacterias *Bacillus* como biodegradadoras en el agua y el suelo de los estanques de cultivo, tienen el potencial de reducir el

impacto ambiental generado por la industria acuícola. Existen al menos diez especies de *Bacillus* que se utilizan como componentes principales de productos probióticos comerciales para biorremediación, que permite mejorar la calidad del agua de los animales acuáticos, controlando los niveles de sustancia tóxicas (amoníaco, nitrito, nitrato y sulfuros) y conlleva además a una mejor supervivencia de los animales cultivados. Asimismo, estas especies de *Bacillus* probióticos mantienen una mayor densidad de bacterias beneficiosas y una menor carga de agentes patógenos en los estanques.

Adicionalmente Tran et al. (2019), aislaron seis cepas de *Pseudomonas* con capacidad de realizar nitrificación heterotrófica en ensayos con muestras de agua y mostraron una reducción completa de 100 mg/L de NH_4Cl durante un cultivo de 96 h. Estos resultados indican el potencial de aplicar *Pseudomonas* en estanques de camarones para el tratamiento de agua.

De la misma forma Manan et al. (2017), aislaron bacterias heterótrofas identificadas como géneros *Pseudomonas* y *Aeromonas*, que consumieron la materia orgánica cargada en el fondo del tanque de cultivo y mediante biofloculación convirtieron los elementos mediante un proceso químico como proteína útil para ser consumida por los camarones. Concluyen que los organismos biofloc identificados realmente contribuyeron como agentes naturales de biorremediación en el los cultivos de cero intercambio de agua, para asegurar la calidad del agua en las condiciones óptimas hasta el final del período de cultivo.

En un estudio realizado por Mendoza et al. (2020), identificaron mediante metagenómica microorganismos involucrados en el proceso de nitrificación, los cuales pueden utilizarse como biorremediadores del agua de cultivos de *Penaeus vannamei*. Así tenemos, que, a partir de los efluentes de dichos cultivos, identificaron 972 especies, incluidas Bacteria, Archaea, Viridiplantae, Fungi y Protozoa; resaltando la presencia de microorganismos nitrificantes (*Nitratireductor*, *Nitriliruptor*, *Nitrosomonas*, *Nitrosopumilus*, *Nitrospina*, *Candidatus nitrosopumilus*, *Nitratiruptor*, *Nitrosococcus* y *Nitrospira*) y desnitrificantes (*Pseudoalteromonas denitrificans*, *Thioalkalivibrio denitrificans*, *Thioalkalivibrio* spp., *Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans* y *Thiohalomonas denitrificans*).

Así mismo Hohang et al. (2016), aislaron cepas bacterianas oxidantes de amoníaco y de nitritos, a partir de seis muestras diferentes de agua de acuicultura recolectadas en la India. Basándose en su alta actividad de nitrificación y capacidad de formación de biopelículas, seleccionaron seis cepas bacterianas para tomar fotografías mediante microscopio electrónico de barrido (SEM) y realizadas en tanques de 2 litros con y sin portadores. Como resultado, el sistema con portadores (30% del volumen total) aumentó la eficiencia de eliminación de compuestos nitrogenados de 1,2 veces a 2 veces en comparación con el sistema sin portador. Dos representantes del grupo de bacterias oxidantes de amoníaco se clasificaron en función de las características y se clasificaron como *Nitrosomonas sp.* y *Nitrosococcus sp.*

Asimismo, Muthukrishnan et al. (2015) evaluaron tres cepas autóctonas codificadas como VCM5, VCM8 y VCM12 por su capacidad para degradar nitrógeno amoniacal total (TAN por sus siglas en inglés) y nitrito en aguas residuales de la acuicultura de langostino. Todas las cepas redujeron significativamente el nivel de TAN y nitrito de las aguas residuales evaluadas ($p < 0.05$). La cepa VCM5 (número de acceso de GenBank KJ700465) y VCM8 (número de acceso de GenBank KJ700464) mostraron una similitud de secuencia del 99,71% con la especie de tipo de gen de ARNr 16S *Bacillus vietnamensis* 15-1T (ABO99708) y la cepa VCM12 (número de acceso de GenBank KJ700463) mostró una similitud de secuencia de 99,05% con el tipo de secuencia del gen de ARNr 16S, especie *Gordonia bronchialis* DSM43247T (CP001802).

Otros estudios demuestran que el uso de microorganismos probióticos (*Bacillus subtilis* y *B. licheniformis*) en el cultivo de langostino con biofloc, generaron parámetros de calidad de agua equilibrados y ubicados entre los rangos normales para el cultivo de langostino, pero sin obtener un efecto significativo ($P \geq 0.05$) sobre el rendimiento del camarón.

2.2. Bases teórico-científicas

2.2.1. Cultivo de langostino y su impacto en el ambiente

Existen efectos ambientales adversos reales y potenciales en los ecosistemas de manglar como resultado del cultivo de langostino. Los efectos pueden categorizarse como destrucción de ambientes

naturales para la construcción de empresas langostineras, hipernutrición de los ecosistemas de manglar por efluentes de estanques langostineros, contaminación por productos químicos y antibióticos, y contaminación biológica por agentes patógenos de las poblaciones de langostinos nativos y otras especies acuícolas (Hopkins et al. 1995).

En cuanto a los efluentes, los langostinos excretan desechos principalmente como resultado de una digestión y absorción incompletas de sus alimentos, y solo una pequeña porción de los nutrientes en el alimento se consumen, asimilan y retienen para el crecimiento de tejidos. Diferentes estudios indican que sólo el 24%-37% del nitrógeno (N) y el 13%-20% del fósforo (P) del alimento balanceado son retenidos por los langostinos, para posteriormente formar parte de sus tejidos (Tyler 2021).

Por otro lado, la calidad de agua deficiente resulta principalmente de los inadecuados procedimientos en la alimentación del langostino (alimento balanceado no ingerido y fertilizante), que se han constituido como el mayor enemigo de las langostineras en el mundo. La eliminación del exceso de nutrientes directamente a los manglares o áreas costeras, generan eutrofización de los ambientes, más aún cuando los efluentes son de la acuicultura intensiva, que son aproximadamente 10 veces más alta en polución que los valores observados en zonas de cultivos semi-intensivos y extensivos (de Lacerda et al. 2021, Hidalgo M., 2007).

Asimismo, los nutrientes contaminantes de efluentes se acumulan en los sedimentos de zonas aledañas a los campos de cultivo, generando suelos anóxicos e incrementan los niveles de sulfuro, depleción de oxígeno y desbalance de la biodiversidad de poblaciones bacterianas (Tobey et al. 1998). En la columna de agua los sólidos disueltos alteran la composición de los macro y micronutrientes, promoviendo el excesivo florecimiento de microalgas y cianobacterias, muchas de

ellas tóxicas para algunos organismos acuáticos, y además pueden generar patrones de hipoxia o anoxia en la columna de agua, generando mortandad (Alonso-Rodríguez & Páez-Osuna, 2003).

2.2.2. Biorremediación

Es una metodología basada generalmente en microorganismos, enzimas (microbianas/vegetales) y plantas, para desintoxicar los contaminantes en el suelo y otros ambientes. Es una de las alternativa ambientalmente compatible y viable para reducir el impacto negativo producto de los efluentes del cultivo de langostino. Esta tecnología utiliza microorganismos de diferentes especies, con la capacidad de degradar y disminuir componentes orgánicos y nitrogenados (Das, 2014; Lezama-Cervantes, 2010).

Los procesos de biorremediación se producen cuando los microorganismos liberan enzimas para descomponer el contaminante en piezas digeribles y cuando el contaminante de sustancias orgánicas es ingerido y se digiere como alimento junto con otra fuente de energía por la célula microbiana (Chávez-Crooker & Obrequé-Contreras, 2010). Estos procesos están basados en sistemas complejos que están influenciados por la existencia de diversidad de poblaciones microbianas capaces de degradar contaminantes, disponibilidad de ciertos tipos de contaminantes afines para la población microbiana, factores ambientales (temperatura, pH, oxígeno, tipo de suelo, nutrientes y fisiología del microorganismo), concentración de biomasa microbiana y diversidad enzimática (Barman, 2020).

Esto conlleva a poder elegir entre una biorremediación *in situ* y *ex situ*, cada uno con sus características propias, cuya diferencia principal son los costes económicos. La biorremediación *in situ* implica el uso de organismos o enzimas para eliminar contaminantes y es altamente dependiente de las condiciones del ambiente y las propiedades físico-

químicas del suelo; y es la mejor opción debido a su menor costo y logística. Dentro la gama de técnicas de biorremediación *in situ*, la bioaumentación es una de las más utilizadas para recuperar ambientes contaminados. Está basada en la adición de microorganismos autóctonos o exógenos a los sitios contaminados. Es preferible utilizar microbiota autóctono porque permite desarrollar y mantener niveles de población útiles porque no son inhibidas durante el proceso de biorremediación (Maitra, 2018).

2.2.3. Bacterias biorremediadoras

La materia orgánica puede ser degradada eficazmente por bacterias del género *Bacillus*, como *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. coagulans* y del género *Phenibacillus*, como *Phenibacillus polymyxa*. Por otro lado, los *Lactobacillus* también se utilizan junto con *Bacillus* para descomponer los detritos orgánicos. Los productos de desecho nitrogenados como el amonio, nitratos y nitritos; pueden ser metabolizados por los géneros bacterianos *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Nitrosococcus*, *Nitrosovibrio*, *Nitrolobus*, *Nitrospira*, *Nitrococcus* y *Nitrospira*. Los compuestos sulfurados son metabolizados por bacterias fotosintéticas como *Rhodopseudomonas*, *Thiocystis*, *Thiosarcina*, *Thiospirillum*, *Rhodospirillum Thiocapsa*, *Lamprocystis*, *Thiodictyon*, *Thiopedia*, *Amoebobacter*, *Rhodomicrobium*, *Ectothiorhodospira*, *Chlorobium*, *Chloropseudomonas*, *Prosthecochloris*, *Chromatium*, *Pelodictyon* y *Clathrochloris* (Barman, 2020; Rajita et al., 2020; Fabian et al., 2019; Haung, 2003).

2.3. Definición de términos básicos

2.3.1. Canales de marea

Es un canal principal seguido por corrientes de marea, que se extiende desde el océano hasta una marisma o planicie de marea, siguiendo un patrón de flujo de marea bidireccional. Este término puede describir características a través de un rango de escalas, desde grandes distributarios o cortos, entre bancos de arena de marea hasta

pequeños arroyos de pantano y canales poco profundos a través de planicies de marea. Son de naturaleza dinámica, experimentan cambios en escalas de tiempo más cortas que la evolución del paisaje de mareas en su conjunto y en ocasiones puede parecer comparativamente transitorias (Hugues, 2012).

2.3.2. Bacterias heterotróficas

Incluye bacterias que obtienen energía al oxidar moléculas orgánicas preformadas (glúcidos, lípidos y proteínas) de su entorno, cuyo metabolismo de estas moléculas produce ATP como fuente de energía. El metabolismo puede ser aeróbico, donde el aceptor final de electrones es el oxígeno, o anaeróbico, donde el aceptor final puede ser una molécula orgánica o inorgánica distinta del oxígeno. Estas bacterias están universalmente presentes en todos los tipos de agua, alimento, suelo, vegetación y aire (Allen et al., 2004).

2.3.3. Bacterias nitrificantes

Son bacterias que realizan el proceso de transformación biológica de formas reducidas de nitrógeno a nitrato. Los grupos de organismos más importantes que intervienen en este proceso son las bacterias litoautotróficas oxidantes de amoníaco y las bacterias litoautotróficas oxidantes de nitritos. Para estos microorganismos, la oxidación de compuestos inorgánicos de nitrógeno les sirve como fuente de energía característica. Juntos catalizan dos etapas distintas del proceso total, la oxidación en dos pasos del amoníaco a nitrito ($\text{NH}_3 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ y $\text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HNO}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$) y la oxidación de nitrito a nitrato ($\text{HNO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HNO}_3 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$), respectivamente. Por otro lado, la nitrificación heterótrofa es catalizada por muchos microorganismos diferentes, que incluyen tanto hongos como bacterias heterótrofas. Se han postulado vías inorgánicas ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NOH} \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$) y vías orgánicas ($\text{RNH}_2 \rightarrow \text{RNHOH} \rightarrow \text{RNO} \rightarrow \text{RNO}_2 \rightarrow \text{NO}_3$) (Koops & Pommerening-Röser, 2001).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localidad y periodo de ejecución

Las muestras biológicas fueron obtenidas de canales de marea aledaños a zonas de cultivo intensivo y semi-intensivos de langostino de la provincia de Zarumilla; y los ensayos de laboratorio fueron realizados en Biomoléculas Lab EIRL y Ecobiotech Lab SAC, ubicados en la ciudad de Tumbes y Trujillo, respectivamente. Asimismo, la investigación se ejecutó durante julio de 2021 y junio de 2022.

3.2. Tipo de estudio y diseño de contrastación de la hipótesis

La investigación es básica y de metodología no experimental de tipo descriptiva – transeccional (Tam et al., 2008). Para contrastar la hipótesis se utilizó el diseño de una sola casilla (Alvitres, 2000).

3.3. Población, muestra y muestreo

Se consideró como población las bacterias con capacidad degradadora de materia orgánica y componentes nitrogenados en suelo de canales de marea aledaños a campos de cultivo de *P. vannamei* y se consideró la colecta de 03 muestras de suelo. Para el aislamiento de bacterias con potencial biorremediador, se colectaron 02 muestras de suelo de canales de marea impactados por efluentes de diferentes langostineras con cultivo intensivo y semi-intensivo ubicados en el departamento de Tumbes. Además, se incluyó una muestra de suelo de canal de marea con baja influencia de campos langostineros. Las muestras fueron colectadas en bolsas estériles y transportadas en cadena de frío a 4°C, hasta su análisis en el laboratorio. Se registraron datos de condiciones climáticas como temperatura ambiental, humedad, nubosidad, parámetros físico-químicos del suelo y agua de los canales de marea evaluados.

3.4. Métodos, técnicas e instrumentación de recolección de datos

3.4.1. Aislamiento de cepas bacterianas biorremediadoras de detritus orgánicos y compuestos nitrogenados

Cada una de las muestras colectadas fueron diluidas hasta 10^{-8} con agua peptonada suplementada con NaCl 2%, y fueron cultivadas en agar marino de Zobell y agar MRS suplementada con 0,013% de azul de anilina (Panigrahi et al., 2019). Para aislar bacterias nitrificantes y desnitrificantes las muestras se cultivarán en agar Winogradsky I y II (Hoang et al., 2016). Se incubaron a 30°C por 72 h y posteriormente se eligieron colonias de bacterias con características culturales propias de cada medio de cultivo y se evaluó características macro y microscópicas (coloración Gram). Posteriormente fueron subcultivadas, purificadas y conservadas en tubos con TSA (Trypticase soya agar) en refrigeración (4°C) y en caldo Luria Bertani suplementada con 30% de glicerol en congelación (-30°C).

3.4.2. Análisis metagenómico en muestras suelos

Se realizó análisis metagenómico de las muestras descritas en el ítem 3.2. La extracción de ADN genómico se realizó con el kit GF-1 soil sample DNA extraction (Vivantis Technologies), siguiendo las recomendaciones del fabricante y posteriormente fueron conservadas a -20°C. El ADN extraído, fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1% y bromuro de etidio (0,5 g/mL). Se cuantificó el ADN por espectrofotometría de microvolúmenes en equipo MaestroNano Pro Spectrophotometer MN913A.

Posteriormente alícuotas de ADN fueron enviadas a la empresa MR DNA Lab de Estados Unidos, para la secuenciación de metagenomas (16S rRNA Sequencing) mediante la tecnología Diversity Assay bTEFAP® Illumina. Los porcentajes de diversidad y abundancia fueron obtenidos mediante el programa Excel.

3.4.3. Evaluación de propiedades biorremediadoras en microcosmos

Para evaluar la degradación bacteriana de materia orgánica se midió la actividad de respiración de suelo en microcosmos (Pitombo et al., 2018;

Brzezinska et al., 2010). Para este fin se utilizó suelo procedente de canales de marea con alto nivel de contaminación por efluentes de cultivo de langostino. Las pruebas se realizaron en frascos de 1 L por triplicado con aproximadamente 100 g de suelo homogenizado, para cada una de las bacterias heterotróficas aisladas (10^5 células/g de suelo) y un control sin bacteria. Adicionalmente, se registró datos de potencial redox (ORP) de cada una de los ensayos realizados.

Para la evaluación de compuestos nitrogenados (TAN y nitritos), se utilizó efluente de aguas residuales de cultivo intensivo de langostino. Los ensayos se realizaron por triplicado en frascos de 1 L que contienen 450 mL de agua de efluente y 50 mL de suspensión bacteriana (10^6 células/mL), se incubó con agitación a temperatura ambiente. Las muestras de agua se analizaron a las 24 horas para determinar los valores de TAN y nitrito (kit YSI Photometers) (Hoang et al., 2016; Muthukrishnan et al., 2015).

3.4.4. Pruebas de antagonismo entre bacterias para elaboración de consorcio

De cada especie bacteriana con mayor capacidad biorremediadora tanto para degradación de materia orgánica y compuestos nitrogenados; se analizó el antagonismo bacteriano mediante el método de “botón en césped” siguiendo los procedimientos de Bauer (1966) y Kumar et al. (2015). Las cepas bacterianas sin presencia de antagonismo fueron utilizadas para elaborar el consorcio bacteriano biorremediador. El consorcio bacteriano será ensayado posteriormente siguiendo los pasos del ítem 3.4.3.

3.4.5. Identificación molecular de microorganismos mediante secuenciación de los genes 16S ARNr

Las cepas de bacterias, fueron analizadas mediante secuenciación del gen 16S ARNr. Se realizaron cultivos en caldo Luria Bertani y se procedió a extraer ADN según Gustincich et al. (1991) y adaptado por Dulanto (2013). La amplificación de la región 16S ARNr se realizó con los cebadores 8F (5´ AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3´) y 1510R (5´ GGC TAC CTT GTT ACG A 3´) según Weisburg (1991) y Monsalud et al. (2003), para obtener productos de

aproximadamente 1500 pares de bases. Los productos de amplificación de la PCR fueron analizados en gel de agarosa al 1%. La secuenciación de ambas cadenas de los productos de amplificación, fueron realizados en la empresa Macrogen Inc. de Korea.

3.5. Procesamiento y análisis de datos

Se utilizó una bitácora de campo para el registro de la data generada en los ensayos de laboratorio. La zonificación de los puntos de muestreo se realizó mediante georreferenciación haciendo uso de un GPS Garmín etrex (coordenadas UTM, Universal Transverse Mercator) y los mapas fueron elaborados mediante el programa informático Google Earth, Power Point y Microsoft Paint. Se utilizaron los programas bioinformáticos MEGA-X (Kumar et al., 2018) para obtener las secuencias consenso y generar los árboles filogenéticos. Y para identificar las especies bacterianas se utilizaron los programas Nucleotide Blast (Basic Local Alignment Search Tool) y EzBioCloud (Yoon et al., 2017). La data colectada fue procesada en hoja de cálculo Excel y el análisis estadístico ANOVA y Tukey con el programa SPSS para Windows v. 22.0.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Muestreo

Las muestras de suelo fueron colectadas en 3 sectores de los canales de marea El Bendito (sector 1), que colinda con la empresa langostinera Virazón y playa El Bendito; Algarrobo (sector 2), que colinda con langostinera Marinasol S.A. (campo Paracas) y Santa Gertrudis; y Soledad (sector 3), colindante con la langostinera Inversiones Silma S.A.C. Todos ellos ubicados aledaños a langostineras con cultivo semi-intensivo e intensivo de la provincia de Zarumilla. El sector 1 se evaluó como zona con baja influencia por efluentes de langostineras (Figura 1).

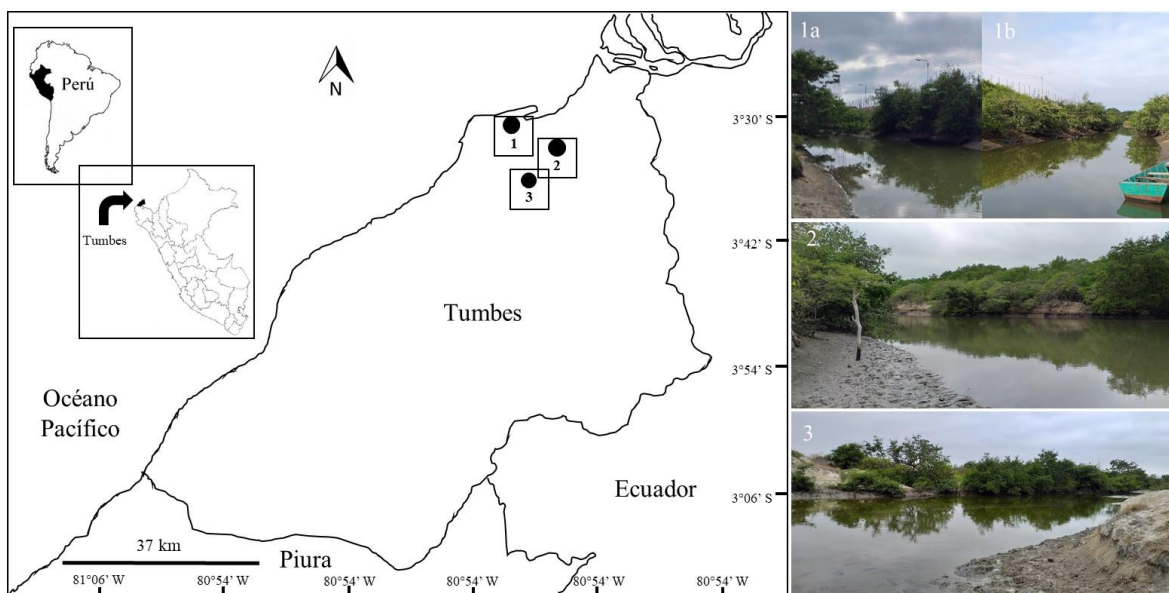


Figura 1. Mapa del departamento de Tumbes y ubicación de sectores de colecta de muestras de agua y suelo.

Se registraron datos de condiciones climáticas como temperatura ambiental, humedad y nubosidad mientras se evaluaron los canales de marea (Tabla 1).

Tabla 1. Ubicación georreferenciada de los puntos de muestreo y condiciones climáticas en la colecta de muestras de agua y suelo de los canales de marea evaluados.

Código	Ubicación georeferenciada	Hora de muestreo	Condiciones climáticas		
			Temperatura ambiental (°C)	Humedad relativa (%)	Nubosidad
Sector 1	Latitud 3°32'36,2"S; longitud 80°24'22,3"O	8:50 am	25,5	79	5/8 de cielo cubierto
Sector 2	Latitud 3°27'13,6"S; longitud 80°16'47,9"O	9:30 am	27,1	73	4/8 de cielo cubierto
Sector 3	Latitud 3°28'29,4"S; longitud 80°17'40,0"O	10:17 am	31,1	70	2/8 de cielo cubierto

Fuente: Propia

Por otro lado, se registraron parámetros físico-químicos del suelo y agua de los canales de marea evaluados y se colectaron muestras de suelo para realizar recuento microbiano y aislamiento de bacterias con potencial biorremediador (Tabla 2, anexo 1). Es de suma importante evaluar estos parámetros porque permiten crear condiciones adecuadas para el aislamiento *in vitro* de microorganismos, e incluso permite decidir la mejor matriz de ensayo para obtener bacterias con mayor potencial biorremediador (Wilson et al., 2017; Soffritti et al., 2019). Así tenemos que el Potencial REDOX (ORP), evalúa el nivel de oxidación o reducción química del suelo, siendo los valores más negativos los que indiquen condiciones de reducción del suelo, que se deben a la ausencia de oxígeno disuelto y están relacionadas con producción de oxinas y baja solubilidad de minerales. Por otro lado, la evaluación del pH permite conocer si hay posible presencia de compuestos tóxicos como el NH₃, el cual se reduce cuando el pH disminuye; a su vez, bajo estas condiciones

de pH, el porcentaje de H₂S aumenta, generando toxicidad. Esto también involucra el aumento o disminución de las reacciones microbiológicas que se puedan generar en el suelo (Krebs, 2003).

Tabla 2. Registro de parámetros físico-químicos en agua y suelo de canales de marea evaluados.

Código	Parámetros químicos del suelo			Parámetros físico-químicos del agua					
	pH	ORP (mV)	Materia orgánica (%)	pH	Alcalinidad (mg/L)	Conductividad (uS/cm)	Salinidad (ppt)	Oxígeno disuelto (mg/L)	Temperatura (°C)
Sector 1	5,6±0,1	Máx 132, mín 10	12,1	7,3	90,0	52,8	32,0	3,3	25,9
Sector 2	4,8±0,1	Máx -36, mín - 116	5,6	6,8	100,0	47,8	29,4	2,8	25,2
Sector 3	5,7±0,1	Máx -90, mín - 210	3,0	7,8	100,0	52,2	31,8	5,1	28,4

Fuente: Propia

4.2. Aislamiento de cepas bacterianas biorremediadoras de detritus orgánicos y compuestos nitrogenados

Se realizaron recuentos microbianos de grupos bacterianos con potencial biorremediador, encontrándose que la muestra del sector 1 presenta mayor cantidad de microorganismos heterótrofos, predominando colonias circulares de 2 a 3 mm de diámetro, blancas (formas bacilares grampositivas) y colonias de bordes

irregulares de 3 a 5 mm de diámetro (formas bacilares grampositivas). Además, se verificó que la abundancia de *Lactobacillus* y bacterias fijadoras de nitrógeno fue menor que las obtenidas en las muestras del sector 2 y 3. Para algunos grupos bacterianos se obtuvieron diferencias significativas entre los sectores de muestreo evaluados (Tabla 3).

Tabla 3. Recuento promedio de microorganismos (UFC/g) en diferentes medios de cultivo, a partir de muestras de suelo de canales de marea evaluados.

Código	Recuento promedio de microorganismos (UFC/g)			
	Heterótrofos totales	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Lactobacillus</i> sp.	Bacterias fijadoras de nitrógeno
Sector 1	1,10E+06 ^a	2,40E+04 ^a	2,00E+02 ^b	7,70E+04 ^a
Sector 2	1,20E+06 ^a	2,96E+04 ^b	1,00E+04 ^a	1,00E+05 ^a
Sector 3	1,00E+06 ^a	1,05E+04 ^c	1,20E+04 ^a	4,00E+06 ^b

Fuente: Propia

a,b,c Superíndices diferentes dentro de columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Las bacterias para este estudio fueron aisladas del sector 1, esto considerando que este punto de muestreo presentó valores adecuados de ORP en suelo (valores positivos) y parámetros químicos en agua, que se encontraron dentro de rangos óptimos para acuicultura (Boyd & Tucker, 1992). Se aislaron 3 cepas bacterianas para las pruebas *in vitro* de biorremediación, esto basado en su crecimiento rápido en placa de cultivo y abundancia, sin dejar de lado sus características fenotípicas como forma y reacción a la coloración Gram. Todas las bacterias seleccionadas tuvieron forma bacilar y reacción grampositiva. Según los resultados, se observa una mayor cantidad de bacterias del género *Lactobacillus* y fijadoras de nitrógeno en canales de marea con mayor impacto de campos langostineros (canal de marea Soledad y Algarrobo), esto posiblemente al uso de estos grupos bacterianos como probióticos en los estanques de cultivo aledaños.

Los resultados de bacterias heterótrofas de los canales de marea evaluados, están dentro de los rangos encontrados por Selvam et al. (2012), en canales de distribución naturales influenciados por camarónicas de *Penaeus monodon* en la

India. Estos valores están dentro del rango de $1,3E+04$ a $1,79E+07$ UFC/g. En contraste, estudios de recuento de bacterias totales en suelos de estanques de cultivo de langostino, indican que los valores se encuentran entre $1.0E+07$ y $1.0E+09$ UFC/g.

4.3. Análisis metagenómico en muestras de suelo

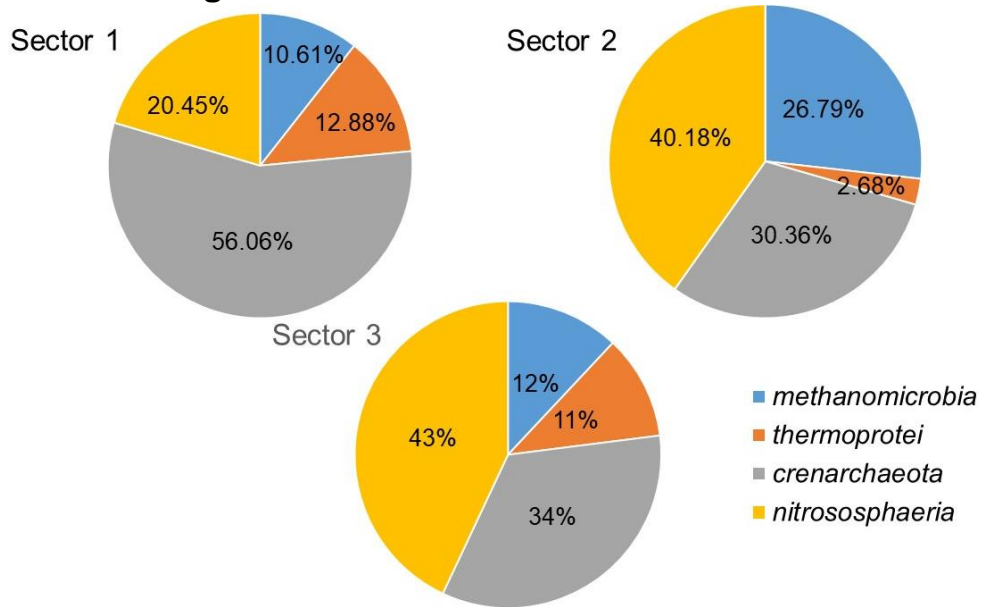


Figura 2. Abundancia de Archaea por clase (%) en suelo de tres sectores de canales de marea aledaños a cultivos de langostino.

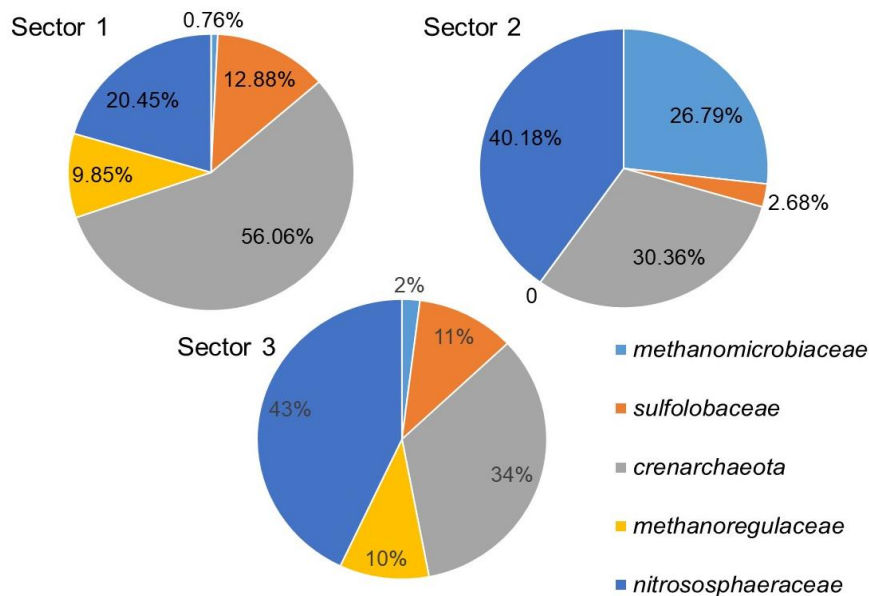


Figura 3. Abundancia de Archaea por familia (%) en suelo de tres sectores de canales de marea aledaños a cultivos de langostino.

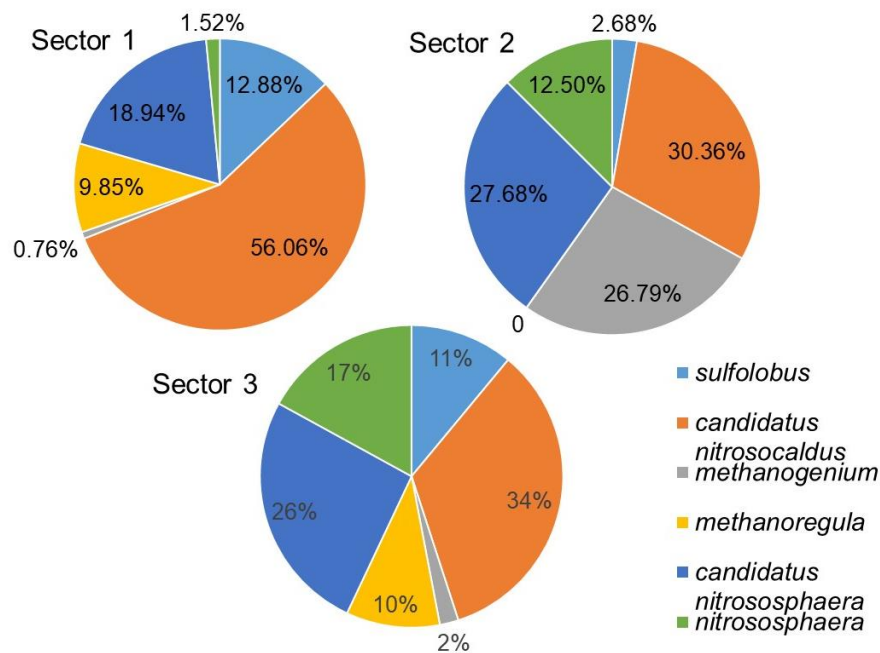


Figura 4. Abundancia de Archaea por género (%) en suelo de tres sectores de canales de marea aledaños a cultivos de langostino.

En cuanto a las Arqueas, el sector 1 tiene predominancia de la clase Crenarchaeota, que incluye microorganismos hipertermófilos, acidófilos, reductores /oxidantes del azufre y quimiolitoheterótrofos. Estudios en sedimentos de cultivo de langostino, demostraron la presencia de Crenarchaeot, en cuyo proceso biogeoquímico necesitan azufre elemental como aceptor externo de electrones y dependen de la presencia de H₂ para su crecimiento. Según Wu et al. (2022), esta clase de arquea se encuentra en mayor proporción en sedimento de manglar que en estanques de cultivo de langostino. Por otro lado, los sectores 2 y 3, presenta predominancia de clase Nitrososphaeria, caracterizados por ser arqueas mesófilas, aerobias y oxidantes de amoníaco. Representan el único grupo de arquea que se distribuye globalmente en ambientes óxicos compitiendo eficientemente con las bacterias aeróbicas. Debido a su gran número en el plancton oceánico, en los sedimentos marinos, en los lagos y en los suelos, se consideran uno de los grupos de procariotas más abundantes en el planeta. Por lo tanto, la presencia de estas diversas comunidades de arqueas indica su importante papel en el ciclo del carbono, el nitrógeno y el azufre, lo que puede generar una biorremediación eficiente en los ambientes naturales aledaños a estanques de cultivo de langostinos (Joseph et al., 2021; Abby et al., 2018; Stieglmeier et al., 2014).

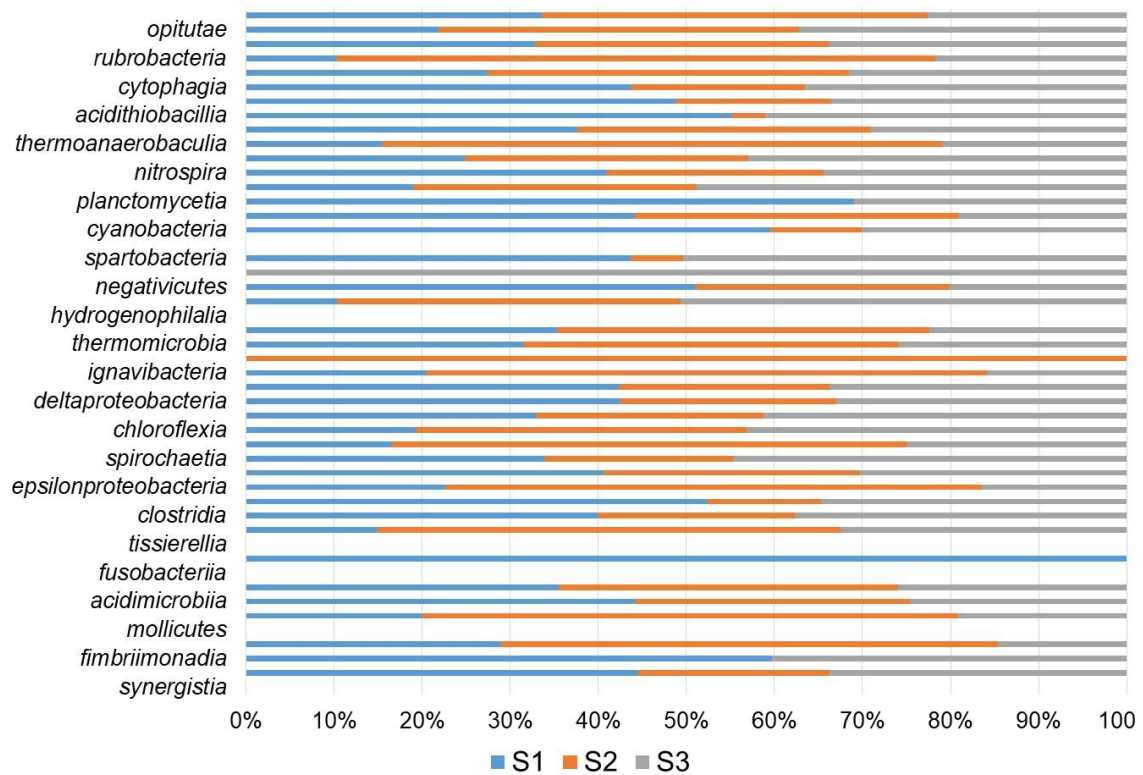


Figura 5. Abundancia de Bacteria por clase (%) en suelo de tres sectores de canales de marea aledaños a cultivos de langostino.

Los resultados muestran predominancia de ciertas clases de bacteria según el punto de muestreo. El sector 1 presenta abundancia mayor al 50% en las clases *Acidithiobacillia*, *Planctomycetia*, *Cyanobacteria*, *Negativicutes*, *Coriobacteriia*, *Lentisphaeria* y *Fimbriimonadia*. Por otra parte, en el sector 2 predominaron las clases *Rubrobacteria*, *Thermoanaerobaculia*, *Deferribacteres*, *Chitinophagia*, *Epsilonproteobacteria*, *Acidobacteria* y *Gemmtimonadetes*; y en el sector 3 se presentó mayor abundancia de *Actinomycetia*, *Spartobacteria* y *Thermoleophilia*. Según Wu et al. (2022), en un estudio de suelos en manglares y estanques de cultivo del sureste de China, determinaron abundancia relativa de *Cyanobacteria* y *Verumicrobia*. Variables ambientales asociadas a la producción primaria, incluyendo luz, clorofila a y el contenido total de nitrógeno del sedimento, son importantes en la conformación de este tipo de comunidades microbianas en la superficie del sedimento en los tratamientos óxicos, sobre todo de la clase *Lentisphaeria* (Robinson, 2017).

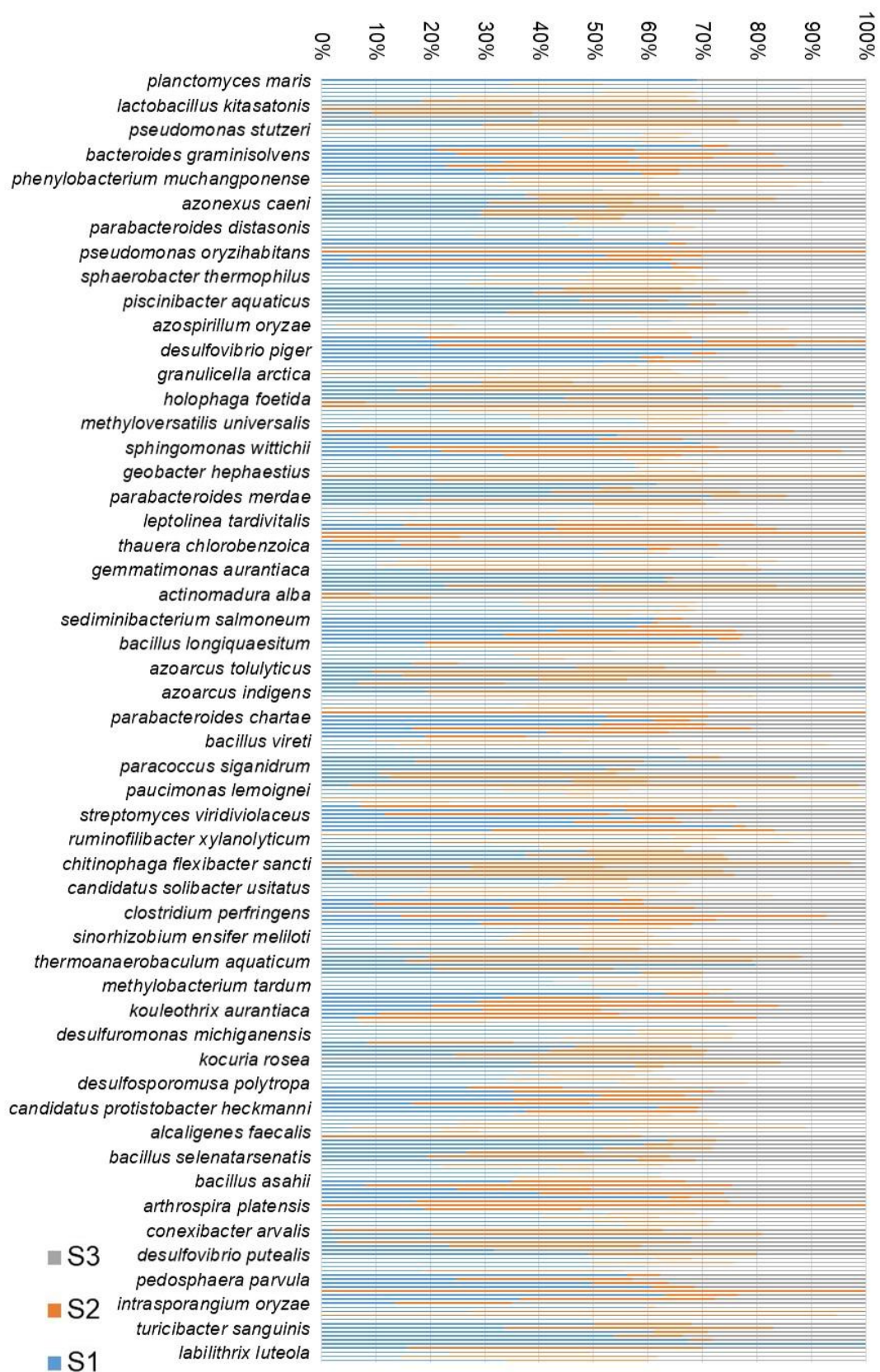


Figura 6. Abundancia de Bacteria por especie (%) en suelo de tres sectores de canales de marea aledaños a cultivos de langostino.

Datos basados en especies bacterianas, muestran que en el sector 1 presentan mayor abundancia las especies *Geobacter psychrophilus*, bacteria reductora de hierro III (Nevin et al. 2005), *Georgenia muralis*, *Acidovorax temperans*, *Desulfovibrio piger*, *Shigella sonnei*, *Parabacteroides merdae*, *Succinospira mobilis*, *Prolinoborus fasciculus*, *Spirochaeta thermophila*, polisacrolítico (Aksenova et al., 1992), *Victivallis vadensis*, *Paracoccus siganidrum*, *Maricaulis maris*, formadora de biopelículas que captura carbono en hábitats oligotróficos y volatiliza el mercurio (Yun et al., 1994), *Paracoccus aminophilus*, metilótrofo heterótrofo capaz de utilizar una amplia gama de compuestos C1 como únicas fuentes de carbono y energía (Dziewit et al., 2015), *Jahnella thaxteri* y *Lactobacillus gallinarum*. Por otro lado, en el sector 2 predominan las especies bacterianas *Arthrospira platensis*, *Melghirimyces thermohalophilus*, *Anaerophaga thermohalophila*, *Alkaliphilus transvaalensis*, *Candidatus Monilibacter batavus*, *Cystobacter gracilis*, *Thermomonas haemolytica*, *Chitinophaga flexibacter sancti*, *Brevundimonas olei*, produce esterasas lipolíticas (Lee et al., 2010), *Holdemania filiformis*, *Paucimonas lemoignei*, degradadora de PHA (Handrick et al., 2001), *Ochrobactrum tritici*, *Thauera phenylacetica*, *Deferribacter desulfuricans*, termófilo reductor de azufre, nitrato y arseniato (Takai et al., 2003), *Stenotrophomonas maltophilia*, *Desulfomicrobium norvegicum*, *Rhodothermus profundus*, *Edaphobacter modestus*, *Pseudomonas oryzae*, *Clostridium disporicum* y *Pandora thiooxydans*, quimiolitotrófica oxidante de tiosulfato y aislada de suelo de la rizósfera. En el sector 3 las más abundantes fueron *Thioprofundum hispidum*, quimiolitotrófica y oxidante de azufre obligada (Mori et al., 2011), *Aquabacterium parvum*, *Brachybacterium paraconglomeratum*, *Azospirillum oryzae*, *Pelomonas saccharophila*, *Rheinheimera texana*, *Ammoniphilus oxalaticus*, son dependientes de amonio, oxalotróficas obligadas y tolerantes a los haloálcalis (Zaitsev et al., 1998), *Thermoleophilum album*, *Salinispora pacifica*, *Actinomadura alba*, *Kitasatospora phosalacinea*, *Geodermatophilus arenarius*, *Arthrobacter ramosus*, *Clostridium perfringens*, *Paracoccus denitrificans*, *Plantactinospora mayteni*, *Cystobacter violaceus*, *Alcaligenes faecalis*, *Litoribacter ruber* e *Intrasporangium oryzae*. Muchas de las bacterias identificadas forman parte del microbioma de humanos (*Victivallis vadensis*), peces (*Paracoccus siganidrum*), gallinas (*Lactobacillus gallinarum*) y plantas de cultivo (*Intrasporangium oryzae*, *Cystobacter*

gracilis, *Azospirillum oryzae*) (Zoetendal et al., 2003; Liu et al., 2013; Sugimura et al., 2022; Xie et al., 2005).

4.4. Evaluación de propiedades biorremediadoras en microcosmos

Se evaluó la respirometría del suelo para determinar cuál cepa bacteriana generaba una mayor actividad metabólica del suelo, basado en la degradación bacteriana de materia orgánica por emisión de CO₂. Adicionalmente, se registraron datos ORP de cada una de los ensayos realizados (Tabla 4).

Tabla 4. Evaluación de respirometría y ORP en microcosmos, por cepa bacteriana aisladas de canales de marea aledañas a campos de cultivo de langostino.

Parámetro	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Control
Respirometría (mg CO ₂ /m ² /d)	3,83±0,38 ^a	5,55±0,67 ^b	2,06±0,31 ^c	1,76±0,54 ^c
ORP (mV)	Máx -85, mín -12	Máx -65, mín -45	Máx -97, mín -56	Máx -68, mín -29

Fuente: Propia

a,b,c Superíndices diferentes dentro de la fila indican diferencias significativas (p<0.05).

La respiración del suelo se relaciona a la producción total de CO₂/área/tiempo. Se produce por la actividad biológica de macroorganismos, microorganismos propios del suelo, raíces y micorrizas, y en menos proporción, debido a la oxidación bioquímica de los compuestos químicos que contienen carbono (Vásquez et al., 2013; Lloyd y Taylor, 1994). Es de suma importancia mejorar la respiración de los suelos en ambientes acuáticos donde se desarrollan organismos vivos, esto debido a la demanda de oxígeno adicional que puede resultar cuando se produce disminución del oxígeno disuelto en el agua (Boyd, 1995). Según Vásquez et al. (2013), los rangos normales se encuentran entre 1 – 10 mg CO₂/m²/día, pero otros autores detallan que este valor puede encontrarse dentro el rango 2,5 – 4,0 mg CO₂/m²/día. Basado en los resultados obtenidos, se observó una mayor tasa de respiración en suelos que contienen inóculo bacteriano comparado con el control, favoreciendo este proceso.

La medición del ORP permitió evaluar el nivel de oxidación-reducción química en el suelo. Resultados negativos de este parámetro, indican condiciones de reducción generadas por la escases de oxígeno y están relacionados con la producción de compuestos altamente tóxicos (gas sulfídrico, amonio y nitrito). Los valores de ORP en los suelos ensayados se encuentran dentro del rango moderadamente reducido (-100 a 100 mV), basado en la categorización de Chien et al., (1989).

La evaluación de TAN y nitritos se concluyó a las 24 horas de cultivo, considerando que en este tiempo los valores se encontraban por debajo de los valores mínimos. No se observó diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Tabla 5).

Tabla 5. Evaluación de TAN y nitritos en microcosmos, por cepa bacteriana aisladas de canales de marea aledañas a campos de cultivo de langostino.

Parámetro	Tiempo (Horas)	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Control
TAN (mg/L)	24	0,73±0,12 ^a	0,80±0,30 ^a	0,83±0,06 ^a	0,53±0,12 ^a
Nitrito (mg/L)	24	2,13±0,31 ^a	2,47±0,35 ^a	2,78±0,35 ^a	1,96±0,40 ^a

Fuente: Propia

a,b Superíndices diferentes dentro de la fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En el agua, el amoníaco se encuentra en dos formas químicas, la ionizada (NH_4^+) y no-ionizada (NH_3), en combinación producen el amoníaco total. Su presencia y diferencia en concentración depende de la temperatura y pH del agua. La forma no ionizada es altamente tóxica y está relacionada negativamente con la alimentación, el crecimiento, la supervivencia y la presencia de enfermedades en organismos acuáticos. Por otro lado, el nitrito forma parte del proceso biológico intermediario de nitrificación bacteriana, donde el amoníaco se transforma a nitrato. Este compuesto es tóxico dependiendo de su cantidad en el ambiente, y del estadio de desarrollo del organismo (Martins & Cupertino, 2017). Los microorganismos, en condiciones aeróbicas estrictas, la nitrificación completa se lleva a cabo en dos etapas oxidativas secuenciales: el amoníaco se convierte primero en nitrito por bacterias oxidantes de amoníaco (*Nitrosomonas*) y este nitrito se convierte nuevamente en

nitrito por bacterias oxidantes de nitrito (*Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* y *Nitrocystis*) (Sheela et al., 2014).

4.5. Antagonismo entre bacterias para elaboración de consorcio

Basado en el procedimiento de Kumar et al., (2015), después del tiempo de incubación, solo la cepa 3 generó antagonismo (inhibición bacteriana) a la cepa 2 (Tabla 6).

Tabla 6. Prueba de antagonismo entre las 4 cepas bacterianas seleccionadas.

Bacteria	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3
Base			
Cepa 1		+	+
Cepa 2	+		-
Cepa 3	+	-	

Fuente: Propia

El signo (+) indica la ausencia de antagonismo., mientras que el signo (-) indica presencia de antagonismo bacteriano.

4.6. Comportamiento final de consorcio bacteriano en parámetros químicos de suelo y agua

Las cepas bacterianas 1 y 2 reunieron características adecuadas para conformar el consorcio bacteriano biorremediador. Aun cuando los parámetros químicos (TAN y nitritos) del agua ensayado en el ítem 4.4 no tuvieron cambios significativos, se procedió a evaluar de la misma forma, con un tiempo de ensayo de 24 horas. Los resultados se detallan en la tabla 7.

Tabla 7. Evaluación de respirometría, ORP, Tan y nitritos en microcosmos, de las cepas 1 y 2, consorcio 1–2 y control.

Parámetro	Cepa 1	Cepa 2	Consorcio 1-2	Control
Suelo				
Respirometría (mg CO ₂ /m ² /d)	3,21±0,36 ^a	4,19±0,65 ^b	5,12±0,24 ^{ac}	2,52±0,38 ^{bc}

ORP (mV)	Máx -185, mín -120	Máx -220, mín -132	Máx -205, mín -167	Máx -230, mín -160
Agua				
TAN (mg/L)	1,30±0,13	1,58±0,21	1,37±0,15	1,46±0,33
Nitrito (mg/L)	3,48±0,30	3,60±0,35	3,20±0,23 ^a	3,96±0,10 ^a

Fuente: Propia

a,b,c Superíndices iguales dentro de la fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Basado en los resultados obtenidos sobre la aplicación de bacterias aisladas en suelos de canales de marea se observa con diferencias significativas con respecto al control, el aumento en la respiración del suelo cuando se aplican inóculos bacterianos individuales y una mezcla de ellas. Según Krebs (2003), una buena respiración del suelo se logra con una adecuada productividad, relacionada con el contenido bacteriano, nutrientes, textura y manejo de parámetros químicos del suelo.

4.7. Identificación molecular de microorganismos mediante secuenciación de los genes 16S ARNr

De las cepas bacterianas seleccionadas para el consorcio microbiano, se realizó identificación molecular mediante secuenciación genética del gen 16S ARNr.

Tabla 8. Identificación molecular de cepas bacterianas aisladas a partir de suelo del canal de marea El Bendito.

Canal de marea	Identificación de la cepa	P _b	BLAST			EZBioCloud		
			Especie identificada	% de identidad	Número de accesión	Especie identificada	% de similitud	Cepa bacteriana
El Bendito	Cepa 1	1473	<i>Bacillus proteolyticus</i>	99,93	MT184819.1	<i>Bacillus albus</i>	100,00	N35-10-2

Cepa 2	1441	<i>Bacillus cereus</i>	99,86	MH916584.1	<i>Bacillus paranthracis</i>	99,86	Mn5
--------	------	------------------------	-------	------------	------------------------------	-------	-----

Fuente: Propia

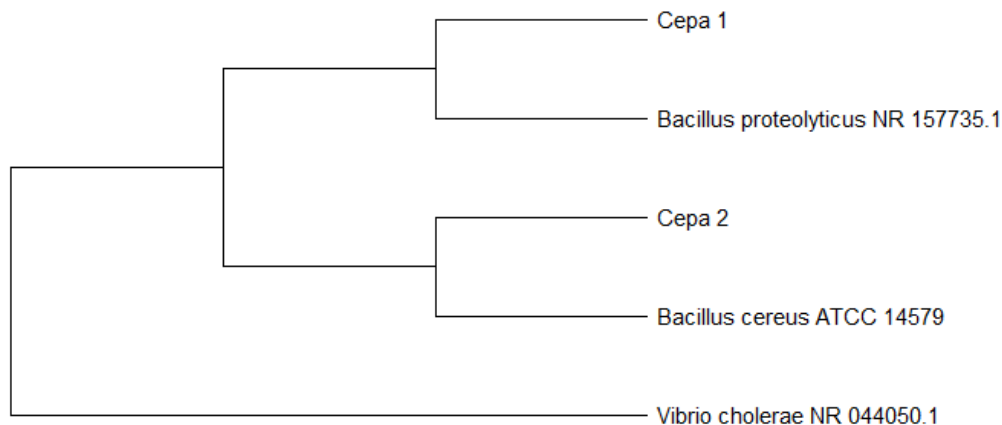


Figura 7. Árbol filogenético mostrando las relaciones de las bacterias biorremediadoras con cepas bacterianas ATCC y referenciales. Se utilizó como outgroup a la bacteria *V. cholerae*.

El género *Bacillus*, ha sido utilizado frecuentemente en procesos de biorremediación de suelos y agua de ambientes naturales contaminados con petróleo (Lustosa et al., 2018; Sprocati et al., 2012; Cerqueira et al., 2012), metales pesados (Sahoo & Goli., 2020; Sprocati et al., 2012; Kayalvizhi et al., 2019), plásticos (Ibiene et al., 2013), compuestos nitrogenados de aguas residuales (Sheela, 2015) y compuestos orgánicos de la acuicultura. La eficacia de *Bacillus* en la modulación de la calidad del agua depende en gran medida de factores como el modo de aplicación, la concentración de oxígeno, la temperatura, el pH, la fuente de nutrientes, el tipo de cepa y los iones metálicos en la matriz para biorremediar (Hlordzi et al., 2020).

La especie *Bacillus cereus* se encuentran comúnmente en el medio ambiente e incluye cepas benéficas y patógenas para el humano, debido a la producción de toxinas, cuando contamina los alimentos (McDowell et al., 2022). Tiene la capacidad de crecer como biopelículas sumergidas o flotantes y de secretar dentro de la biopelícula una amplia gama de metabolitos, enzimas, tensioactivos y

bacteriocinas; todos ellos para actuar sobre la propia biopelícula y/o sobre su entorno (Majed et al., 2016). Por otro lado, esta especie bacteriana es utilizada como probiótico para acuicultura de peces, estimulando la inmunidad y capacidad antioxidante y crecimiento de carpas (Yang et al., 2019); en la producción de postarvas de *P. vannamei*, promoviendo la reducción de bacterias patógenas en el agua (Aderaldo et al., 2018).

Asimismo, estudios realizados con *B. proteolyticus* indican que es una bacteria productora de proteasa, por lo tanto, tiene potencial para su uso en la acuicultura como agente de biorremediación y probiótico debido a su actividad proteolítica, además de sus propiedades antagónicas frente a varios patógenos (Bhaskar et al., 2007).

V. CONCLUSIONES

En el suelo de los canales de marea del manglar de Tumbes:

1. Se aislaron e identificaron molecularmente dos cepas bacterianas del género *Bacillus cereus* y *Bacillus proteolyticus*, con capacidad biorremediadora, basada en la descomposición de materia orgánica utilizando la técnica de respirometría del suelo. No se logró verificar el metabolismo de compuestos nitrogenados por no encontrarse diferencias significativas en el agua evaluada.
2. Mediante metagenómica se identificaron arqueas y bacterias con potencial biorremediador como *Candidatus nitrosocaldus*, *Nitrososphaera*, *Geobacter psychrophilus*, *Spirochaeta thermophila*, *Maricaulis maris*, *Paracoccus aminophilus*, *Brevundimonas olei*, *Paucimonas lemoignei*, *Deferribacter desulfuricans*, *Pandoraea thiooxydans* y *Ammoniphilus oxalaticus*, algunas de ellas no cultivables.
3. Muchas de las bacterias identificadas, *Geobacter psychrophilus*, *Spirochaeta thermophila*, *Brevundimonas olei*, *Paucimonas lemoignei*, *Deferribacter desulfuricans*, *Pandoraea thiooxydans* *Thioprofundum hispidum* y *Ammoniphilus oxalaticus*; presentaron dentro de su metabolismo procesos bioquímicos relacionados con la biorremediación de materia orgánica, plásticos, metales pesados, componentes químicos inorgánicos y pesticidas.
4. Se identificó otro grupo bacteriano considerado como parte del microbioma normal, oportunistas y patógenos de humanos (*Holdemania filiformis*, *Shigella sonnei*, *Parabacteroides merdae*, *Ochrobactrum tritici*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes faecalis*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas oryzae* y *Brachybacterium paraconglomeratum*),

animales (*Clostridium disporicum* y *Paracoccus siganidrum*) y plantas (*Azospirillum oryzae*, *Plantactinospora mayteni* y *Cystobacter gracilis*).

VI. RECOMENDACIONES

1. De las cepas bacterianas aisladas e identificadas, se recomienda realizar pruebas de dinámica de crecimiento que permitan identificar el tiempo de cultivo necesario para obtener la fase logarítmica de crecimiento, y hacer más eficiente el inóculo bacteriano que pueda ser utilizado en biorremediación de suelos.
2. Es necesario proponer a estas cepas como bacterias potenciales para biorremediación de suelos tanto de ambientes naturales, así como de estanques de cultivo; y llevarlos a un nivel de escalamiento piloto con el fin de utilizarlos a nivel comercial como cepas nativas en los campos de cultivo de langostinos de la región Tumbes.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abby, S. S., Melcher, M., Kerou, M., Krupovic, M., Stieglmeier, M., Rossel, C., Pfeifer, K. & Schleper, C. (2018). *Candidatus Nitrosocaldus cavascurensis*, an ammonia oxidizing, extremely thermophilic archaeon with a highly mobile genome. *Frontiers in Microbiology*, 28.

Aderaldo, J., Da Cruz, M., Leandro, M, de Paula, P., Shinozaki, M. 2018. Probiotic potencial of *Bacillus cereus* against *Vibrio* spp. In post-larvae shrimp. *Revista Caatinga*, 31(2). doi: 10.1590/1983-21252018v31n226rc

Aksenova, H. Y., Rainey, F. A., Janssen, P. H., Zavarzin, G. A., & Morgan, H. W. (1992). *Spirochaeta thermophila* sp. nov., an obligately anaerobic, polysaccharolytic, extremely thermophilic bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 42(1), 175-177.

Allen, M. J., Edberg, S. C., & Reasoner, D. J. (2004). Heterotrophic plate count bacteria—what is their significance in drinking water?. *International journal of food microbiology*, 92(3), 265-274

Alonso-Rodríguez, R., & Páez-Osuna, F. (2003). Nutrients, phytoplankton and harmful algal blooms in shrimp ponds: a review with special reference to the situation in the Gulf of California. *Aquaculture*, 219(1-4), 317-336.

Alvitres, V. (2000). *Método Científico. Planificación de la Investigación*. 2da ed. Lambayeque: Editorial Ciencia.

Antony, S. P., & Philip, R. (2006). Bioremediation in shrimp culture systems. *Naga The WorldFish Center Quarterly*, 29(3 & 4), 62-66.

Barman, D. (2020). Bioremediation of Waste Waters and Application in Aquaculture-A Mini Review. *Research Biotica*, 2(1), 20-25.

Barraza-Guardado, R. H., Arreola-Lizárraga, J. A., López-Torres, M. A., Casillas-Hernández, R., Miranda-Baeza, A., Magallón-Barrajas, F., & Ibarra-Gámez, C. (2013). Effluents of shrimp farms and its influence on the coastal ecosystems of Bahía de Kino, Mexico. *The Scientific World Journal*, 2013.

Bauer, A. T. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J clin pathol*, 45, 149-158.

Boyd, C. E. (1995). *Bottom soils, sediment, and pond aquaculture*. Springer Science & Business Media.

Boyd, C., y C. Tucker. 1992. Water quality and pond soil analyses for aquaculture. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Alabama. USA. pp. 46-171.

Bhaskar, N., Sudeepa, E. S., Rashmi, H. N., & Selvi, A. T. (2007). Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. *Bioresource Technology*, 98(14), 2758-2764.

Brzezinska, M. S., Lalke-Porczyk, E., Walczak, M., & Donderski, W. (2010). Microbial Degradation of Shrimp Waste in Soil. *Polish Journal of Environmental Studies*, 19(3).

Cerqueira, V. S., Hollenbach, E. B., Maboni, F., Camargo, F. A., Peralba, M. D. C. R., & Bento, F. M. (2012). Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 1203-1222.

Chávez-Crooker, P., & Obreque-Contreras, J. (2010). Bioremediation of aquaculture wastes. *Current opinion in Biotechnology*, 21(3), 313-317.

Comisión de Promoción del Perú para la Exportación y el Turismo. (2020). *Desarrollo del comercio exterior pesquero y acuícola en el Perú. Informe Anual 2019*. 82 pp. Disponible en: <https://www.siicex.gob.pe/siicex/resources/sectoresproductivos/desarrollo-comercio-exterior-pesquero-acuicola-en-peru-informe-anual-2019-v2.pdf>

de Lacerda, L. D., Ward, R. D., Godoy, M. D. P., de Andrade Meireles, A. J., Borges, R., & Ferreira, A. C. (2021). 20-years cumulative impact from shrimp farming on mangroves of Northeast Brazil. *Frontiers in Forests and Global Change*, 4, 653096.

Chien, Y. H., Lai, H. T., & Chang, S. K. (1989). The effects of using steel-making waste slags as substrates on shrimp *Penaeus monodon* reared in aquaria. *Asian Fish. Sci*, 2, 147-161.

Das, S. (Ed). (2014). *Microbial biodegradation and bioremediation*. Elsevier. 1st Edition.

Dulanto G.J. (2013). Identificación rápida de especies del género *Vibrio* asociadas con el cultivo de "langostino blanco" *Litopenaeus vannamei* por amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). Tesis de Biólogo. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 109 p.

Dziewit, L., Czarnecki, J., Prochwicz, E., Wibberg, D., Schlüter, A., Pühler, A., & Bartosik, D. (2015). Genome-guided insight into the methylotrophy of *Paracoccus aminophilus* JCM 7686. *Frontiers in microbiology*, 6, 852.

Fabian, N., Anyanwu Ch., Esther, D. (2019). Application of Heterotrophic Nitrifying Bacteria in Bioremediation of Heavy Metals. *World Journal of Innovative Research*. 7(5): 113-127 p.

Ghattas, A. K., Fischer, F., Wick, A., & Ternes, T. A. (2017). Anaerobic biodegradation of (emerging) organic contaminants in the aquatic environment. *Water research*, 116, 268-295.

Gustincich, S., Manfioletti, G., Del, G. S., Schneider, C., & Carninci, P. (1991). A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques*, 11(3), 298-300.

Handrick, R., Reinhardt, S., Focarete, M. L., Scandola, M., Adamus, G., Kowalczyk, M., & Jendrossek, D. (2001). A new type of thermoalkalophilic hydrolase of *Paucimonas lemoignei* with high specificity for amorphous polyesters of short chain-length hydroxyalkanoic acids. *Journal of Biological Chemistry*, 276(39), 36215-36224.

Haug, H. J. (2003). Important tools to the success of shrimp aquaculture- Aeration and the applications of tea seed cake and probiotics. *Aqua International February, 2003*, 13-16.

Hidalgo A. (2007). Impacto ambiental de la actividad langostinera, extractiva y agrícola sobre el ecosistema de manglar en el litoral de la región Tumbes. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Trujillo. 75 p. Disponible en: <https://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/1735/TESIS%20DOCTORAL-HIDALGO%20MOGOLLON.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Hlordzi, V., Kuebutornye, F. K., Afriyie, G., Abarike, E. D., Lu, Y., Chi, S., & Anokyewaa, M. A. (2020). The use of *Bacillus* species in maintenance of water quality in aquaculture: A review. *Aquaculture Reports*, 18, 100503.

Hoang, P. H., Nguyen, H. T., Tran, T. T., Tran, T. T., Do, L. P., & Le, T. N. C. (2016). Isolation and selection of nitrifying bacteria with high biofilm formation for treatment of ammonium polluted aquaculture water. *Journal of Vietnamese Environment*, 8(1), 33-40.

Hopkins, J. S., Sandifer, P. A., DeVoe, M. R., Holland, A. F., Browdy, C. L., & Stokes, A. D. (1995). Environmental impacts of shrimp farming with special reference to the situation in the continental United States. *Estuaries*, 18(1), 25-42.

Hossain, M. A. R., & Hasan, M. R. (2017). An assessment of impacts from shrimp aquaculture in Bangladesh and prospects for improvement. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No, 618*, 96.

Hughes, Z. J. (2012). Tidal channels on tidal flats and marshes. In: *Principles of tidal sedimentology*. Springer, Dordrecht. 269-300 p.

Ibiene, A. A., Stanley, H. O., & Immanuel, O. M. (2013). Biodegradation of polyethylene by *Bacillus* sp. indigenous to the Niger delta mangrove swamp. *Nigerian Journal of Biotechnology*, 26, 68-78.

Joseph, V., Chellappan, G., Aparajitha, S., Ramya, R. N., Vrinda, S., Rejish Kumar, V. J., & Bright Singh, I. S. (2021). Molecular characterization of bacteria and archaea in a bioaugmented zero-water exchange shrimp pond. *SN Applied Sciences*, 3(4), 1-20.

Kayalvizhi, K., & Kathiresan, K. (2019). Microbes from wastewater treated mangrove soil and their heavy metal accumulation and Zn solubilization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22, 101379.

Koops, H. P., & Pommerening-Röser, A. (2001). Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiology ecology*, 37(1), 1-9.

Krebs, L. (2003). Respiración del suelo como herramienta para evaluar calidad de fondos en acuicultura. I. Desarrollo de un protocolo estándar para medir dióxido de carbono. Tesis de Maestría. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil. Ecuador. 67 p.

Kumar, V., Singh, S., Singh, J., & Upadhyay, N. (2015). Potential of plant growth promoting traits by bacteria isolated from heavy metal contaminated soils. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 94(6), 807-814.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.

Lee, M., Srinivasan, S., & Kim, M. K. (2010). New taxa in Alphaproteobacteria: *Brevundimonas olei* sp. nov., an esterase-producing bacterium. *The Journal of Microbiology*, 48(5), 616-622.

Lezama-Cervantes, C., Paniagua-Michel, J. D. J., & Zamora-Castro, J. (2010). Biorremediación de los efluentes de cultivo del camarón *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) utilizando tapetes microbianos en un sistema de recirculación. *Latin american journal of aquatic research*, 38(1), 129-142.

Liu, Y., Xie, Q. Y., Hong, K., Li, L., Zhao, Y. M., Tang, Y. & Xu, C. H. (2013). *Paracoccus siganidrum* sp. nov., isolated from fish gastrointestinal tract. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103(5), 1133-1139.

Lloyd, J., & Taylor, J. A. (1994). On the temperature dependence of soil respiration. *Functional ecology*, 315-323.

Lustosa, M. A., López, J. A., Freire, K. C. S., Padilha, F. F., Hernández-Macedo, M. L., & Cabrera-Padilla, R. Y. (2018). Petroleum hydrocarbon degradation by isolated mangrove bacteria. *Revista peruana de biología*, 25(4), 453-456.

McDowell, R. H., Sands, E. M., & Friedman, H. (2022). *Bacillus cereus*. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.

Manan, H., Moh, J. H. Z., Kasan, N. A., Suratman, S., & Ikhwanuddin, M. (2017). Identification of biofloc microscopic composition as the natural bioremediation in zero water exchange of Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, culture in closed hatchery system. *Applied Water Science*, 7(5), 2437-2446.

Maitra, S. (2018). In situ bioremediation—an overview. *Responsibility of Life Science Informatics Publications*. 4(6). 576-598 pp. doi: 10.26479/2018.0406.45

Majed, R., Faille, C., Kallassy, M., & Gohar, M. (2016). *Bacillus cereus* biofilms—same, only different. *Frontiers in microbiology*, 7, 1054.

Martins, F. & Cupertino, E. (2017). Determinación de niveles seguros de amoníaco y nitrito para el cultivo de langostinos. *Global Aquaculture Advocate*. 6 p. Disponible en: <https://www.globalseafood.org/advocate/determinacion-de-niveles-seguros-de-amoniaco-y-nitrito-para-el-cultivo-de-langostinos/>

Mendoza, O., Pretell, K., Ramírez, B., Sandoval, J., Caballero, J. L., & Dorado, G. (2020). Metagenomic Analyses of Biofilms on Whiteleg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Effluents: Implications for Worldwide Aquaculture Bioremediation and Environmental Sustainability in the Current Trend of Climate Change and Global Warming—State of the Art and Experimental Proof of Concept. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 1-14.

Mialhe, F., Gunnell, Y., & Mering, C. (2013). The impacts of shrimp farming on land use, employment and migration in Tumbes, northern Peru. *Ocean & coastal management*, 73, 1-12.

Ministerio del Ambiente (2018). Guía para la elaboración de la línea base en el marco del Sistema Nacional de Evaluación del Impacto Ambiental. Resolución Ministerial N° 455-2018-MINAM. 277 p.

Monsalud R.G., Maybanua F.O., Tapay L.M., Hedreyda C.T., Olympia M.S., Migo V.P., Kurahashi M., Yokota A. (2003). Identification of pathogenic and non-pathogenic *Vibrio* strains from shrimp farms in the Philippines. *J Gen Appl Microbiol* 49: 309-314 p. doi: 10.2323/jgam.49.309

Mori, K., Suzuki, K. I., Urabe, T., Sugihara, M., Tanaka, K., Hamada, M., & Hanada, S. (2011). *Thiopfundum hispidum* sp. nov., an obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing gammaproteobacterium isolated from the hydrothermal field on Suiyo Seamount, and proposal of Thioalkalispiraceae fam. nov. in the order Chromatiales. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(10), 2412-2418.

Muthukrishnan, S., Sabaratnam, V., Tan, G. Y. A., & Chong, V. C. (2015). Identification of indigenous bacteria isolated from shrimp aquaculture wastewater with bioremediation application: total ammoniacal nitrogen (TAN) and nitrite removal. *Sains Malaysiana*, 44(8), 1103-1110.

Nevin, K. P., Holmes, D. E., Woodard, T. L., Hinlein, E. S., Ostendorf, D. W., & Lovley, D. R. (2005). *Geobacter bemidjiensis* sp. nov. and *Geobacter psychrophilus* sp. nov., two novel Fe (III)-reducing subsurface isolates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4), 1667-1674.

Panigrahi, A., Esakkiraj, P., Jayashree, S., Saranya, C., Das, R. R., & Sundaram, M. (2019). Colonization of enzymatic bacterial flora in biofloc grown shrimp *Penaeus vannamei* and evaluation of their beneficial effect. *Aquaculture International*, 27(6), 1835-1846.

Pitombo, L. M., Ramos, J. C., Quevedo, H. D., do Carmo, K. P., Paiva, J. M., Pereira, E. A., & do Carmo, J. B. (2018). Methodology for soil respirometric assays: Step by step and guidelines to measure fluxes of trace gases using microcosms. *MethodsX*, 5, 656-668

Ringø, E. (2019). Genus bacillus, promising probiotics in aquaculture: Aquatic animal origin, bio-active components, bioremediation and efficacy in fish and shellfish. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 27(3), 331-379.

Robinson, G. (2017). *Microbial-deposit feeder aquaculture bioremediation systems* (Doctoral dissertation, Newcastle University).

Sahoo, S., & Goli, D. (2020). Bioremediation of lead by a halophilic bacteria *Bacillus pumilus* isolated from the mangrove regions of Karnataka. *Int. J. Sci. Res*, 9, 1337-1343.

Selvam, D. G., Mujeeb Rahiman, K. M., & Mohamed Hatha, A. A. (2012). An Investigation into occasional white spot syndrome virus outbreak in traditional paddy cum prawn fields in India. *The Scientific World Journal*, 2012: 30830. doi: 10.1100/2012/340830

Sheela, B. & KhasimBeebi, S. K. (2014). Bioremediation of Ammonia from Polluted Waste Waters-A Review. *America J Microbial Res*, 2(2), 201-210.

Sheela, B. (2015). Simultaneous Nitrification and Denitrification of Ammonical Wastewaters Using *Bacillus* Species SB1 Isolated from Domestic Sewage. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research* 4, 17-21 p. doi: 10.12720/ijlbpr.4.1.17-21

Soffritti, I., D'Accolti, M., Lanzoni, L., Volta, A., Bisi, M., Mazzacane, S., & Caselli, E. (2019). The potential use of microorganisms as restorative agents: an update. *Sustainability*, 11(14), 3853.

Soltani, M., Ghosh, K., Hoseinifar, S. H., Kumar, V., Lymbery, A. J., Roy, S., & Rajta, A., Bhatia, R., Setia, H., & Pathania, P. (2020). Role of heterotrophic aerobic denitrifying bacteria in nitrate removal from wastewater. *Journal of applied microbiology*, 128(5), 1261-1278.

Sprocati, A. R., Alisi, C., Tasso, F., Marconi, P., Sciuillo, A., Pinto, V., Chiavarini, S., Ubaldi, C. & Cremisini, C. (2012). Effectiveness of a microbial formula, as a bioaugmentation agent, tailored for bioremediation of diesel oil and heavy metal co-contaminated soil. *Process Biochemistry*, 47(11), 1649-1655.

Stieglmeier, M., Klingl, A., Alves, R. J., Simon, K. M. R., Melcher, M., Leisch, N., & Schleper, C. (2014). *Nitrososphaera viennensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic and mesophilic, ammonia-oxidizing archaeon from soil and a member of the archaeal phylum Thaumarchaeota. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt 8), 2738.

Sugimura, N., Li, Q., Chu, E. S. H., Lau, H. C. H., Fong, W., Liu, W., Liang, C., Nakatsu, G., Chin, A., Oluwabukola, O., Kei, W., Leung, F. & Yu, J. (2022). *Lactobacillus gallinarum* modulates the gut microbiota and produces anti-cancer metabolites to protect against colorectal tumourigenesis. *Gut*, 71(10), 2011-2021.

Takai, K., Kobayashi, H., Nealson, K. H., & Horikoshi, K. (2003). *Deferribacter desulfuricans* sp. nov., a novel sulfur-, nitrate- and arsenate-reducing thermophile isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), 839-846.

Tam, J., Vera, G., & Oliveros, R. (2008). Tipos, métodos y estrategias de investigación científica. *Pensamiento y acción*, 5(1), 145-154.

Tyler I. 2021. Whiteleg shrimp, giant tiger prawn. *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus monodon*. Monterey Bay Aquarium. Seafood Watch. 120 p. Disponible en: https://www.seafoodwatch.org/globalassets/sfw-data-blocks/reports/S/MBA_SeafoodWatch_FarmedShrimp_India_Report.pdf

Thatoi, H., Behera, B. C., Mishra, R. R., & Dutta, S. K. (2013). Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. *Annals of Microbiology*, 63(1), 1-19.

Tobey, J., Clay, J., & Vergne, P. (1998). Impactos económicos, ambientales y sociales del cultivo de Camarón en Latinoamérica. Centro de Recursos Costeros. Universidad de Rhode Island, Rhode Island (EUA). 68 p. Disponible en: https://www.crc.uri.edu/download/MAN_0034.pdf

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.

Vásquez, J. R., Macías, F., & Menjivar, J. C. (2013). Respiración del suelo según su uso y su relación con algunas formas de carbono en el departamento del Magdalena, Colombia. *Bioagro*, 25(3), 175-180.

Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. (1991). 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriol*, 173 (2): 697-703 p. doi: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991

Wilson, C., Lukowicz, R., Merchant, S., Valquier-Flynn, H., Caballero, J., Sandoval, J., Okuom, M., Huber, Ch., Brooks, T., Wilson, E., Clement, B., Wentworth, Ch., & Holmes, A. E. (2017). Quantitative and qualitative assessment methods for biofilm growth: a mini-review. *Research & reviews. Journal of engineering and technology*, 6(4).

Wu, L., Yang, P., Luo, L., Zhu, W., Hong, Y., Tong, C., & Peñuelas, J. (2022). Conversion of mangrove forests to shrimp ponds in southeastern China destabilizes sediment microbial networks. *Geoderma*, 421, 115907.

Xie, C. H., & Yokota, A. (2005). *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(4), 1435-1438.

Yang, G., H. Cao, W. Jiang, B. Hu, S. Jian, C. Wen, K. Kajbaf, V. Kumar, Z. Tao, M. Peng. 2019. Dietary supplementation of *Bacillus cereus* as probiotics in Pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. Pengze): Effects on growth performance, fillet quality, serum biochemical parameters and intestinal histology. *Aquaculture Research* 50 (8): 2207-2217. DOI: 10.1111/are.14102

Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(5), 1613 p. doi: 10.1099/ijsem.0.001755

Yun C, Ely B, Smit J. 1994. Identification of genes affecting production of the adhesive holdfast of a marine *Caulobacter*. *J Bacteriol.* 176:796-803.

Zoetendal, E. G., Plugge, C. M., Akkermans, A. D., & de Vos, W. M. (2003). *Victivallis vadensis* gen. nov., sp. nov., a sugar-fermenting anaerobe from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(1), 211-215.

VIII. ANEXOS

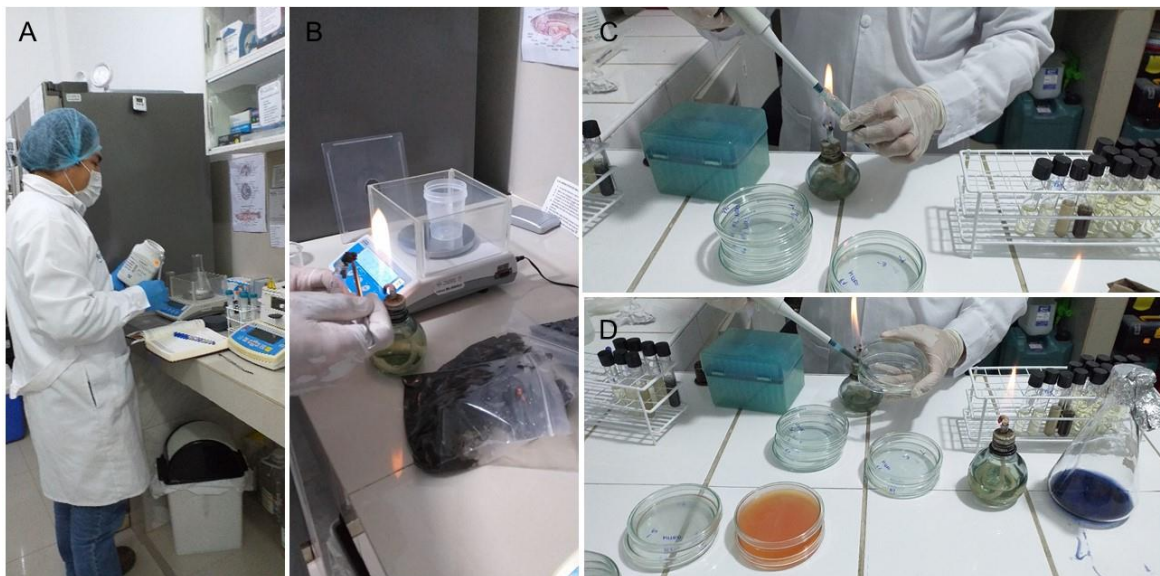
Anexo 1

Colecta de muestras y evaluación de parámetros físico-químicos del agua y suelo de los canales de marea evaluados: A y B. Lectura de pH en suelo, oxígeno disuelto, temperatura, conductividad y pH en agua, C. Colecta de muestra de agua en frasco de primer uso para análisis de alcalinidad, D. Colecta de muestra de suelo para análisis de materia orgánica, ORP y aislamiento de microorganismos, E. Suelo reducido en canal de marea Soledad.



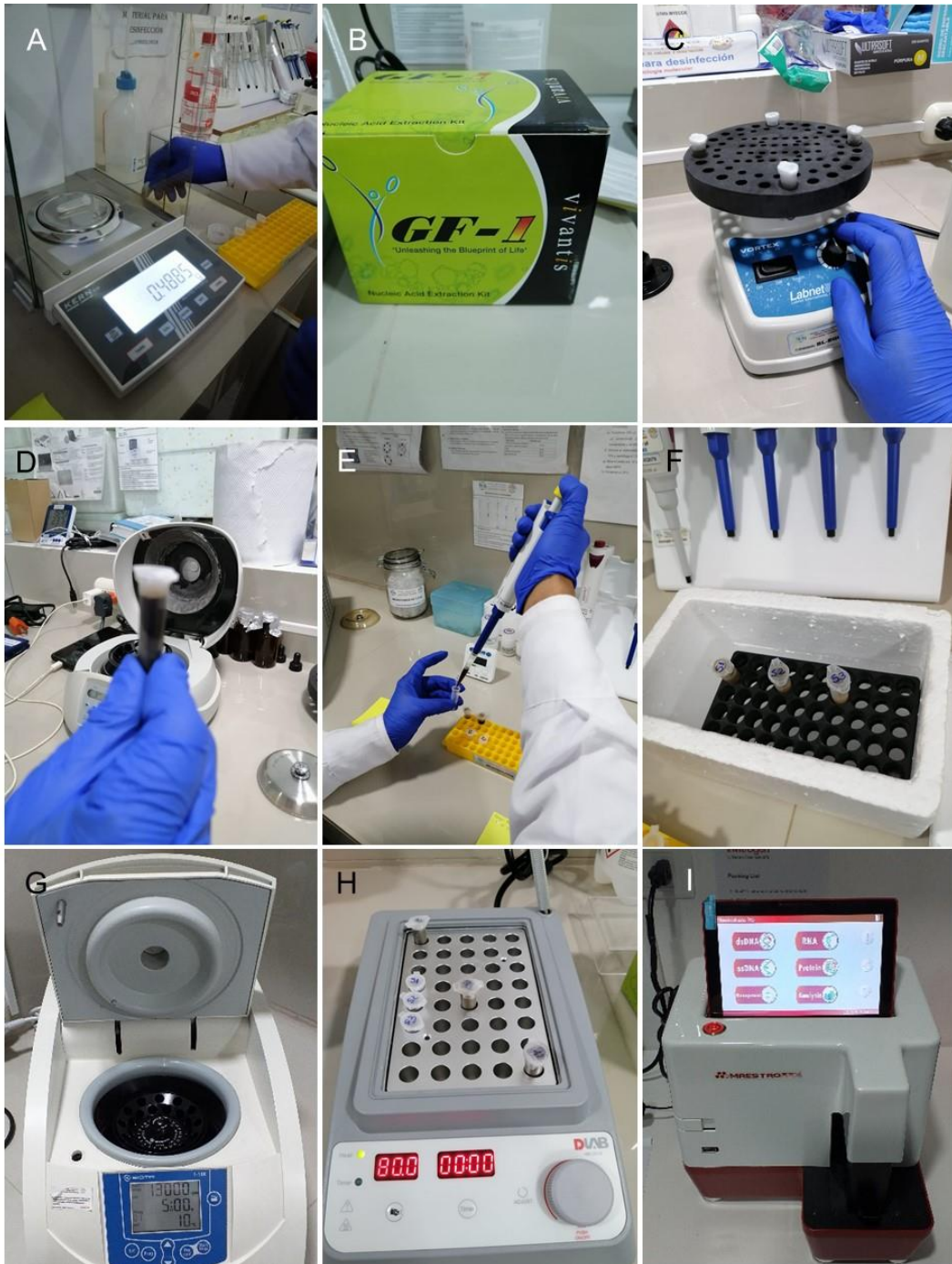
Anexo 2

Análisis microbiológico para recuento microbiano y aislamiento de bacterias biorremediadoras: A. Preparación de medios de cultivo, B. Pesaje de muestras, C. Diluciones seriadas de las muestras de suelo y D. Siembra de las muestras diluidas por incorporación en placa.



Anexo 3

Extracción de ADN genómico a partir de suelo de canales de marea: A. Pesaje de la muestra de suelo, B. Kit para extracción de ADN en suelo, C y D. Mezcla de suelo con perlas de vidrio, E. Proceso de separación de suelo digerido, F. Enfriamiento para precipitación de ADN, G. Centrifuga refrigerada, H. Placa de calentamiento para microtubos y I. Cuantificador de ADN (espectrofotómetro UV-Visible).



Anexo 4

Flujograma del procedimiento de identificación mediante secuenciación del gen 16S ARNr, en aislados bacterianos obtenidos a partir de suelo de canales de marea.

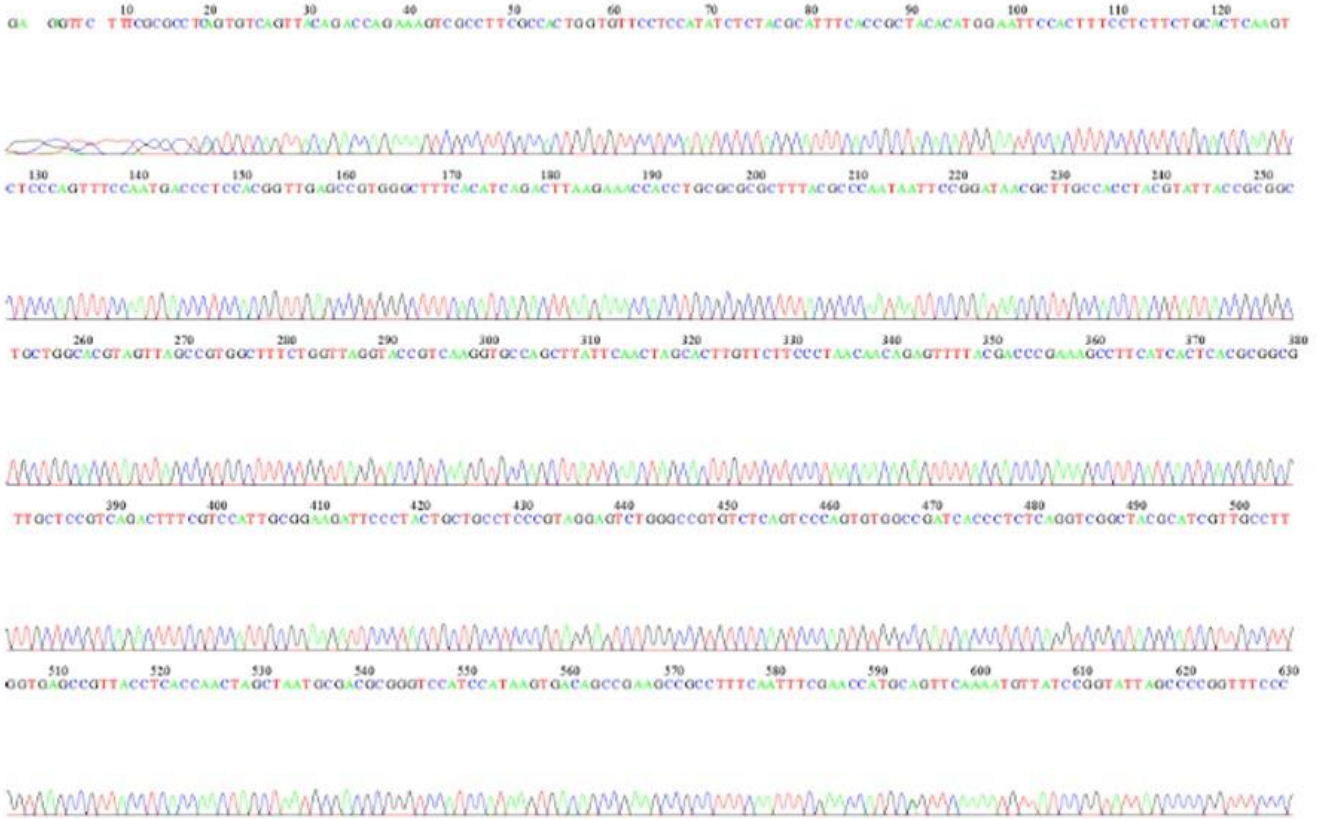


Cepa 1 (secuencia inversa)



File: 1_S00R.ab1
Sample: 1_S00R

Run Ended: 2022/4/5 4:50:37 Signal G:788 A:1100 C:2708 T:1670
Lane: 33 Base spacing: 16.30689 783 bases in 15870 scans Page 1 of 2



File: 1_S00R.ab1
Sample: 1_S00R

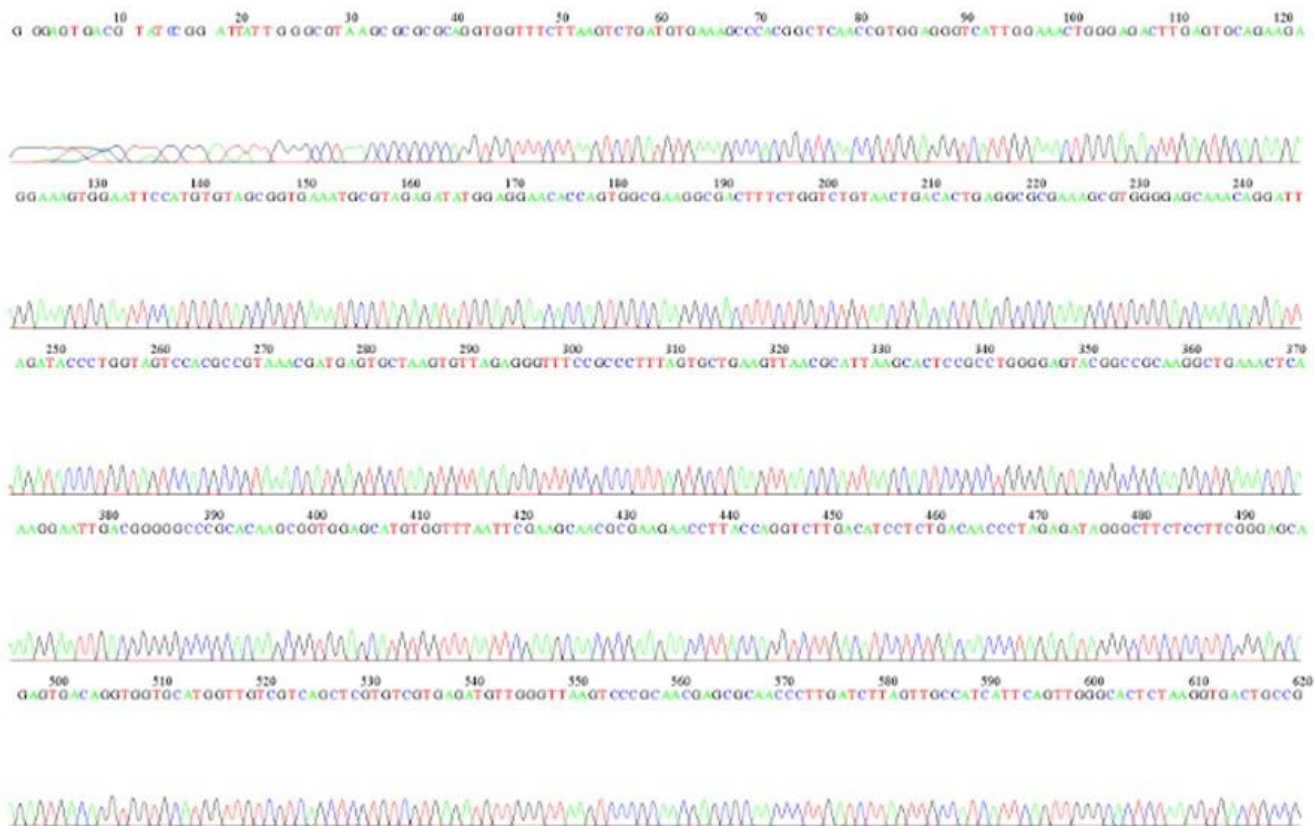
Run Ended: 2022/4/5 4:50:37 Signal G:788 A:1100 C:2708 T:1670
Lane: 33 Base spacing: 16.30689 783 bases in 15870 scans Page 2 of 2



Cepa 2 (secuencia directa)



File: 2_51SF.ab1 Run Ended: 2022/4/5 4:50:37 Signal G:1965 A:2644 C:3539 T:2900
 Sample: 2_51SF Lane: 39 Base spacing: 15.799103 1406 bases in 17556 scans Page 1 of 2



File: 2_51SF.ab1 Run Ended: 2022/4/5 4:50:37 Signal G:1965 A:2644 C:3539 T:2900
 Sample: 2_51SF Lane: 39 Base spacing: 15.799103 1406 bases in 17556 scans Page 2 of 2

