



**Pontificia Universidad
Católica del Ecuador**

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

SEDE MANABÍ

CARRERA DE BIOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN

**ANÁLISIS DE BACTERIAS SULFATORREDUCTORAS AISLADAS DE
SUELOS CAMARONEROS PARA LA REDUCCIÓN DE SULFATOS**

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
MANEJO SOSTENIBLE DE RECURSOS**

**SUBLÍNEA DE INVESTIGACIÓN
MICROBIOLOGÍA**

**PREVIO AL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

**AUTOR
ADRIAN MARCELO MOGRO DELGADO**

**TUTOR
FRANCISCO POZO MIRANDA, M. Sc.**

BAHÍA DE CARÁQUEZ – MANABÍ – ECUADOR

ABRIL, 2024

Certificación

En mi calidad de tutor del trabajo de integración curricular, certifico haber revisado el presente manuscrito de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigentes de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Manabí, cumpliendo los requisitos establecidos por la Dirección de Investigación; en consecuencia, es apto para su presentación y sustentación.

Francisco Pozo Miranda, M. Sc.

Director del trabajo de titulación

CI: 0918330952

Aprobación del tribunal

El jurado examinador, aprueba el presente manuscrito de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Sede Manabí.

Kruger Iván Loor Santana, M. Sc.

Primer Lector

Gabriel Modesto Durán Cobo, M. Sc.

Segundo Lector

Francisco Pozo Miranda, M. Sc.

Tercer Lector

Bahía de Caráquez, marzo 2024

Declaración de originalidad

Este manuscrito no contiene ningún tipo de material que ha sido aceptado para la obtención de un título universitario en otra institución, excepto en forma de información de soporte que ha sido debidamente citada en mi trabajo. Este trabajo es de total responsabilidad de autor, quien declara bajo juramento que ninguna sección de este trabajo de integración curricular infringe los derechos de autor de nadie.

Adrian Marcelo Mogro Delgado

CI: 1313693317

Teléfono: 0984707557

adrianmogro17@gmail.com

Declaración de derechos de autor

Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a distribuir este manuscrito de investigación en medios físicos y electrónicos con el fin de promover la divulgación de mis resultados a la comunidad científica y a la sociedad en general. Adicionalmente autorizo el uso de los contenidos de esta investigación como bibliografía para fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, citando como fuente de información al autor de este trabajo.

Adrian Marcelo Mogro Delgado

CI: 1313693317

Dedicatoria

Le doy gracias a Dios por haberme dado fuerzas y sabiduría para poder culminar con mi carrera. Me dedico este logro muy importante en mi vida, por el cual he luchado desde el día uno que inició este gran reto, camino que costó mucho en lo personal, pero gracias a Dios puedo decir que pude cumplirlo, también se los dedico a mis padres que han sido un apoyo y pilar fundamental a lo largo de todo este tiempo. A mi hermana, cuñado y sobrinos testigos de este largo proceso, siempre estuvieron presentes con sus consejos y ánimos para alcanzar el objetivo. También importante va dedicado a mi hijo el motor de mi vida que me siguió inyectando esas fuerzas para cumplir con este objetivo, a mi esposa que me acompañó en esta última parte del proceso y no soltó mi mano en ningún momento y estuvo ahí para apoyarme incondicionalmente.

Agradecimiento

Empiezo agradeciéndole a Dios quien permitió que todo este logro se dé, agradezco a mis padres, hermana, cuñado y sobrinos por haber sido mi inspiración y fortaleza en este largo proceso, los cuales nunca soltaron mi mano y estuvieron conmigo ahí cada vez que sentía que no podía. Agradecido con Dios por haberme dado la sabiduría necesaria para afrontar este proceso el cual me costó mucho en varias ocasiones, pero siempre estuvo firme conmigo dándome el aliento y las fuerzas necesarias para poder cumplir con mi meta.

Gracias a mis Padres Marcelo Mogro y Adriana Delgado por enseñarme a luchar por lo que quiero y mostrarme que todo es posible cuando uno se lo propone y se esfuerza por lo que desea, agradezco a Dios por haberme rodeado de buenas amistades y buenos profesores que fueron parte de mi aprendizaje a lo largo de la carrera. También agradecerle a mi tutor M. Sc Francisco Pozo Miranda quien me ayudo a que todo este logro sea posible.

Este último texto de agradecimiento se lo dedico a mi esposa e hijo quienes estuvieron apoyándome en todo momento, Evam mi niño gracias por enseñarme a ver las cosas desde otra perspectiva y ser mi motor principal para poder terminar mi carrera universitaria.

Gracias infinitas a cada uno de ustedes que fueron parte de mi proceso como profesional.

Resumen

Se realizó una investigación mixta en el cual se examinó consorcios de bacterias sulfatorreductoras mediante análisis molecular para la comprensión del funcionamiento microbiano. Consiguientemente, este estudio experimental ejecutado durante agosto y diciembre de 2023, se utilizó el método de (ANOVA) ($p \leq 0.05$) para evaluar los datos y Tukey ($p \leq 0.05$) en el análisis de varianza. El trabajo experimental-explicativo, se trabajó con agar sulfito y medio reductor de sulfato para el aislamiento y crecimiento de los consorcios de bacterias sulfatorreductoras, añadiéndolas al suelo contaminado de la piscina camaronera, en el laboratorio de microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Manabí, Campus Bahía de Caráquez. Se probó 2 consorcios bacterianos en el suelo de cultivo de camarón para comprobar cual actuaba mejor en la reducción de sulfato. El análisis de los datos reveló una notable incidencia del 14% de bacterias perteneciente al *filo Firmicutes* en el ambiente estudiado, entre estas se identificaron *Anaerotignum propionicum* y diversas especies del género *Clostridium* que en la literatura científica se las destaca como organismo sulfatorreductores. En cuanto a los dos consorcios, se observan mejores resultados en el consorcio B2 que tuvo una disminución significativa con relación al consorcio B1 (2017 ± 646 mg/l), mientras que en el tratamiento de 4 ml hubo un aumento del consorcio B1 y B3 teniendo una diferencia de (1116 ± 618 mg/l). En conclusión, este análisis de bacterias sulfatorreductoras mostró que *Anaerotignum propionicum* y distintas especies del género *Clostridium* son esenciales para mejorar la productividad y sostenibilidad de la industria camaronera.

Palabras clave: Suelo, sulfatorreductoras, acuícola, bacterias, *Anaerotignum propionicum*, *Clostridium*

ABSTRACT

A mixed research study was conducted to examine consortia of sulfate-reducing bacteria (SRB) using molecular analysis to understand microbial functioning. Consequently, this experimental study, carried out between August and December 2023, employed the ANOVA method ($p \leq 0.05$) to evaluate the data and Tukey's test ($p \leq 0.05$) for the analysis of variance. The experimental-explanatory work was carried out using sulfite agar and sulfate-reducing medium for the isolation and growth of SRB consortia, adding them to contaminated shrimp pond soil, in the microbiology laboratory of the Pontificia Universidad Católica del Ecuador in Manabí Branch, Bahía de Caraquez Campus. Two bacterial consortia were tested in shrimp farming soil to determine which performed better in sulfate reduction. Data analysis revealed a notable incidence of 14% of bacteria belonging to the *phylum Firmicutes* in the studied environment, among which *Anaerotignum propionicum* and various species of the genus *Clostridium* were identified, which are highlighted in the scientific literature review as sulfate-reducing organisms. Regarding the two consortia, better results were observed in consortium B2, which had a significant decrease compared to consortium B1 (2017 • } 646 mg/l), while in the 4 ml treatment there was an increase in consortia B1 and B3 having a difference of 1116 • } 618mg/l. In conclusion, this analysis of sulfate-reducing bacteria showed that *Anaerotignum propionicum* and different species of the genus *Clostridium* are essential to improve the productivity and sustainability of the shrimp farming industry.

Keywords: Soil, sulfate-reducing, aquaculture, *Anaerotignum propionicum*, *Clostridium*

TABLA DE CONTENIDO

1 INTRODUCCIÓN	13
2 METODOLOGÍA	16
2.1 Obtención de la muestra	16
2.2 Selección de la cepa	16
2.3 Producción de biomasa	17
2.4 Ensayo de pH	17
2.5 Ensayo de salinidad	18
2.6 Ensayo de temperatura	18
2.7 Métodos de prueba	18
2.8 Ensayo de Suelo.....	19
2.9 Análisis estadístico.	19
3. RESULTADOS	20
3.1 Análisis de temperatura	20
3.2 Análisis de salinidad	20
3.3 Análisis de pH	21
3.4 Análisis en suelo	22
3.5 Identificación de bacterias	23
4 DISCUSIÓN	25
CONCLUSIÓN	28
BIBLIOGRAFÍA.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS

Figura 1:

Imagen satelital de la Piscina 5v CONSEXPORT (a partir de *Google Earth*) 16.

Figura 2: Descripción del crecimiento bacteriano del consorcio uno (a) y el consorcio dos (b) a diferentes temperaturas (las barras verticales corresponden a las desviaciones estándar) 20

Figura 3: Estudio del incremento bacteriano del consorcio uno (a) y el consorcio dos (b) a distintas salinidades (las barras verticales corresponden a las desviaciones estándar) 21

Figura 4: Evaluación del crecimiento bacteriano de los consorcios B1 (a) y B2 (b) a diferentes niveles de pH (las barras verticales corresponden a las desviaciones estándar) 22

Figura 5: Análisis de reducción de ion sulfato del consorcio B1 (a) y del consorcio B2 (b) en muestras de suelo camaronero (las barras verticales corresponden a las desviaciones estándar) 23

Figura 6:

Grupos microbianos presentes en el sedimento 24

1 INTRODUCCIÓN

La industria de cultivo de camarón en Ecuador ha experimentado un crecimiento sustancial en las últimas décadas y se ha convertido en un pilar económico del país (Loayza Galarza et al., 2022), con una producción a octubre del 2023 de 98.106,4 Toneladas, equivalente a \$ 495'078.500,28. Lo cual representa ingresos económicos importantes para el país. Este crecimiento no solo se debe a la expansión de las áreas de cultivo, sino también al aumento constante de las densidades de camarones en estas áreas. Sin embargo, la problemática de este trabajo de investigación en el ámbito de la acuicultura es, la acumulación de residuos ricos en sulfato, derivados del alimento no consumido que se deposita en el fondo de los estanques de cultivo, junto con la falta de un tratamiento adecuado del suelo después de la cosecha, provoca un aumento en la concentración de compuestos sulfatados (Bravo, 2003).

El tratamiento adecuado de la materia orgánica, particularmente en el sedimento del fondo, es esencial para evitar daños al entorno y prevenir problemas para el cultivo del camarón (Bravo, 2003). Una alternativa a la problemática es el aislamiento y cultivo de bacterias sulfatorreductoras acidófilas. Estas bacterias, capaces de prosperar en condiciones ácidas (Gutierrez et al., 2007), progresan en ambientes sin oxígeno, pudiendo poblar el sitio y mejorar la calidad del suelo.

Estas bacterias a menudo coexisten con microorganismos aerobios que consumen el oxígeno, creando condiciones anaeróbicas ideales para las sulfatorreductoras (Lopez & Fuentes, 2015), capaces de reducir sulfatos en un proceso llamado reducción desasimilatoria de sulfato, generando sulfuro de hidrógeno (H₂S), una sustancia corrosiva. Es importante destacar que el H₂S producido no se incorpora en la biomasa, lo que es una característica distintiva de este proceso (Monroy-Cruz, 2014) que afecta negativamente la calidad de agua-suelo y a los organismos en los estanques de cultivo. La interacción de los

suelos sulfatados ácidos con el agua es un fenómeno de gran relevancia en la acuicultura. Esta interacción tiene un impacto directo en la calidad del agua y por lo tanto, en la salud y productividad de los camarones (Pardo-Carrasco et al., 2009).

La biorremediación con microorganismos sulfatorreductores ha demostrado ser altamente eficaces en la descomposición de sustancias orgánicas, ya sea en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, así como en la eliminación efectiva de compuestos perjudiciales como nitrógeno, fósforo, metales, hidrocarburos y otros elementos. Estos procesos biológicos se utilizan en la biorremediación de desechos de origen acuícola (L. R. Martínez-Córdova et al., 2014), para transformar contaminantes en compuestos no dañinos, ya sea en condiciones in situ o ex situ (L. Martínez-Córdova et al., 2009).

La depuración de aguas residuales es un desafío ambiental crucial en la actualidad, especialmente en entornos acuáticos donde la contaminación puede tener graves consecuencias para la vida acuática y la salud humana. Una de las soluciones innovadoras que se han explorado es el aislamiento y la aplicación de bacterias sulfatorreductoras, observándose una disminución en la carga de contaminantes gracias al metabolismo y crecimiento de las bacterias sulfatorreductoras en las muestras de prueba (Useche-Castro et al., 2020). En otro estudio se pudo evidenciar como la actividad de las bacterias sulfatorreductoras registraron bajos niveles de metales pesados y cargas bacterianas, y no superaron los límites máximos permisibles para la producción de camarón. Esto se registró luego de 10 h después de haberse inoculado en tubos (Sánchez-Meza, 2007). Ante estos antecedentes el presente trabajo tiene como objetivo general evaluar dos aislados de cepas sulfatorreductoras (consorcios) a diferentes factores ambientales que permitan la biorremediación de suelos ricos en sulfato procedentes de suelo camaronero y como específicos: a) examinar cepas de bacterias sulfatorreductoras mediante análisis molecular para la comprensión del funcionamiento microbiano. b) determinar el crecimiento de

bacterias sulfatorreductoras a diferentes temperaturas, salinidades y pH, y c) comprobar la reducción de sulfato usando dos concentraciones de suspensión bacteriana para la remediación del suelo camaronero.

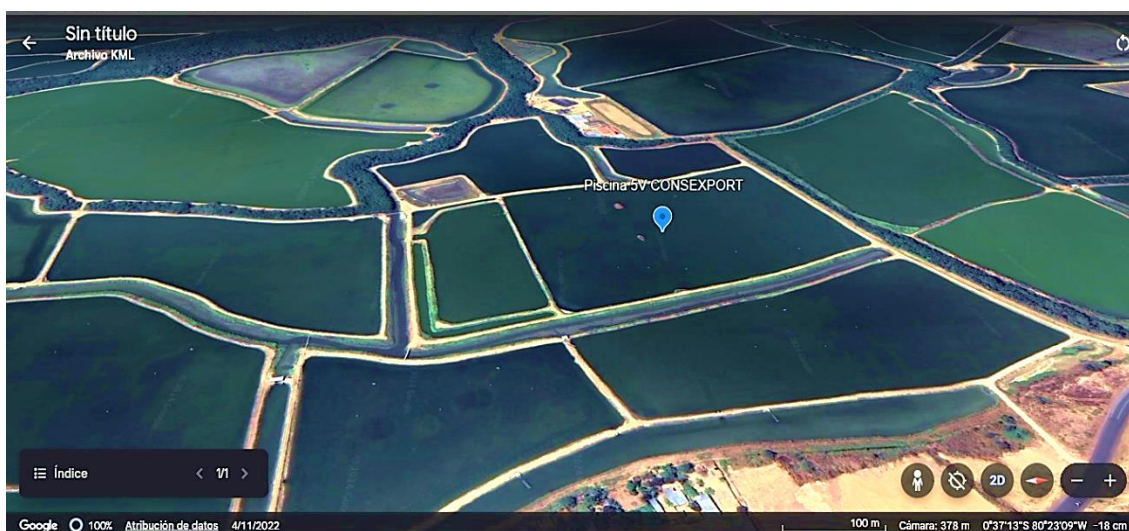
2 METODOLOGÍA

2.1 Obtención de la muestra

La muestra empleada fue obtenida de piscinas camaroneras de la empresa CONSEXPORT, ubicado en la provincia de Manabí, Cantón San Vicente. Se trató de un suelo fangoso obtenido en la compuerta de salida de la piscina, seleccionado con el propósito de obtener suelo con mayor materia orgánica rica en sulfato, se lo almacenó en fundas Ziploc y fueron refrigeradas en un cooler para su traslado al laboratorio (figura 1).

Figura 1.

Imagen satelital de la Piscina 5v CONSEXPORT (a partir de *Google Earth*)



Para separar las bacterias biorremediadores se tomó 0.5 g de suelo, para ubicarlo en un vaso de precipitación de 600 ml, al cual se le adicionó 500 ml de agua destilada. Se mantuvo en reposo durante 10 min. para permitir el desprendimiento de la bacteria desde la partícula de sedimento en el agua. Luego se filtró y se recuperó el sobrenadante para refrigerarlo a 25°C hasta su uso.

2.2 Selección de la cepa

Se aisló la cepa usando un medio de cultivo para la obtención de bacterias sulfatorreductoras, el medio contuvo sulfito de sodio para estimular el metabolismo microbiano. Se usó sulfito agar TM (TM Media, lote M4D3IW01) para aislar las colonias

previo al ensayo experimental. El medio de cultivo se preparó según las instrucciones del fabricante, se tomó 6.2 g del medio de cultivo y se añadió 500 ml de agua destilada, se procedió a calentar el medio de cultivo hasta ebullición, luego se distribuyó 20 ml de medio de cultivo en cada plato Petri.

Se tomó 0.1 ml de la muestra y se colocó sobre el medio de cultivo sulfito agar, luego por medio de barrido se realizó la dispersión de la muestra, y se dejó incubando por 24 horas a 30 °C. A continuación, se procedió a seleccionar las colonias con mayor crecimiento para la generación de biomasa.

La identificación molecular se realizó mediante la secuenciación de las bacterias presentes mediante la técnica de metagenómica, desarrollado por la Empresa Macrogen.

2.3 Producción de biomasa

Para la producción de biomasa microbiana sulfatorreductoras se usó el medio de cultivo Sulphate reducing médium (Triple pack) (TM Media, lote M1AJ5DX01). La preparación se realizó según el fabricante, consistió en disolver 3.9 g en 500 ml de agua destilada, se calentó hasta alcanzar ebullición y se esperó una hora para que el medio de cultivo tenga una temperatura de 30 °C. A continuación, se procedió a inocular 3 colonias sulforeductoras en el medio de cultivo y se mantuvo en incubación por 24 horas a 30 °C.

2.4 Ensayo de pH

Se preparó medio de cultivo Sulphate reducing médium (Triple pack), se distribuyó 50 ml en recipientes de vidrio, con ayuda de pHímetro (Hanna) se ajustó el gradiente de pH añadiendo ácido clorhídrico hasta obtener los tratamientos de pH 5 y 6, para lograr 7 y 8 se usó Bicarbonato de sodio. Para cada tratamiento se dividió 5 ml de medio de cultivo ajustado al pH correspondiente, en tubos vidrio con capacidad de 6 ml, luego se añadió 1 ml de inóculo de biomasa microbiana a una Densidad Óptica (DO) de 1.0 Abs. Finalmente

se incubó a 30°C. La cuantificación se hizo usando un espectrofotómetro YSI 9300 a una OD = 650 nm. Todos los tratamientos se realizaron con 6 réplicas.

2.5 Ensayo de salinidad

Se preparó cada uno de los tratamientos usando medio de cultivo Sulphate reducing médium (Triple pack), consistió en preparar tres recipientes con 50 ml de medio de cultivo ajustado a tres salinidades con Cloruro de Sodio (Lobachemie) (1%, 0.75% y 0.5%). Luego para cada tratamiento se distribuyó 5 ml de medio de cultivo ajustado en tubos de vidrio, se añadió 1 ml de inóculo microbiano a una OD de 1.0. se procedió a mantener en incubación a 30 °C. La cuantificación se realizó mediante espectrofotometría (YSI 9300) a OD = 650 nm. El ensayo tuvo 6 réplicas.

2.6 Ensayo de temperatura

Para el ensayo de temperatura se preparó 150 ml de medio de cultivo Sulphate reducing médium (Triple pack), a continuación, se distribuyó 50 ml de medio de cultivo en recipientes de vidrio para definir 3 tratamientos (20 °C, 25 °C, 30 °C). En cada tratamiento se repartió 5 ml en tubos de vidrio, luego se añadió 1 ml de inóculo bacteriano. Luego se incubó a temperatura acorde al tratamiento correspondiente (20 °C, 25 °C, 30 °C). La cuantificación se tomó mediante el nivel de turbidez que presente cada tratamiento medido en ABS a 650 nm. Cada tratamiento tuvo 6 réplicas.

2.7 Métodos de prueba

Dado su papel fundamental en el metabolismo y desarrollo bacteriano, la actividad de SRB se evalúa mediante la medición de la densidad óptica (OD) utilizando un espectrofotómetro UV (APHA, 2012). La ecuación de conversión específica de la actividad es la siguiente:

$$A_{SRB} = \frac{(FMV_{SOD665} - IMV_{SOD665})}{\Delta T}$$

En particular, A_{SRB} indica la actividad bacteriana, FMV_{SOD665} corresponde al valor de OD_{665} en la medición final, mientras que IMV_{SOD665} se refiere al valor de OD_{665} en la medición inicial. Mientras, ΔT representa el tiempo transcurrido desde la medición inicial hasta la medición final.

2.8 Ensayo de Suelo

Para establecer el nivel de reducción de la concentración de iones de sulfato, se realizaron ensayos con suelos procedentes de camaronera, se tomaron 100 gramos de suelo y se colocaron en recipientes plásticos herméticos, se establecieron 2 tratamientos: 1) en el día uno, se colocaron 4 ml de biomasa microbiana, y en el día 2 se añadió una segunda dosis de 2 ml. Esto se realizó para dos aislados bacterianas seleccionadas (Aislado 1 y 2).

Para el ensayo se tomó la concentración inicial y final de sulfatos para determinar la concentración presente de sulfatos presentes en el suelo tratado respecto suelo no tratado (control). Así, se determinó por método de espectrofotometría PHOT.32. AUTO (Palintest-sulfate) usando tabletas de turbidez de sulfato Palintest, un espectrofotómetro y tubos de vidrio. Los resultados se obtuvieron en mg/l sulfatos.

2.9 Análisis estadístico.

Para la evaluación estadística de los resultados, se evaluó la normalidad y homocedasticidad de los datos en cada ensayo, una vez superado los supuestos de normalidad se procedió a realizar un análisis de varianza y debido a que existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) se procedió a realizar la prueba de Tukey, para identificar diferencias significativas que presentaban los tratamientos entre sí, y así concluir cual de todos presenta mayor capacidad reductora de sulfato.

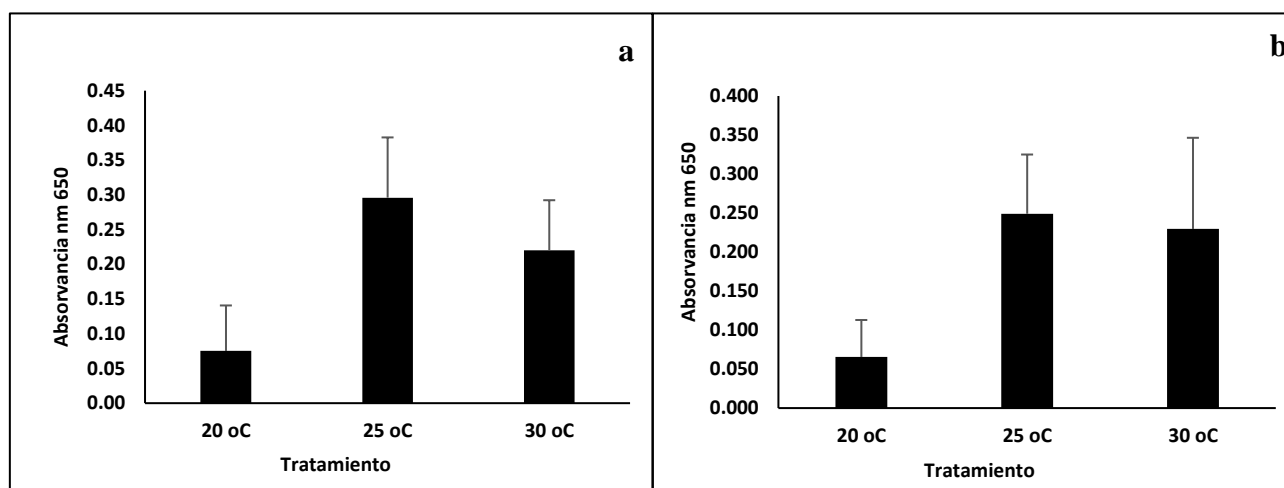
3. RESULTADOS

3.1 Análisis de temperatura

Los datos obtenidos de los ensayos fueron evaluados mediante análisis de varianza (anova $p \leq 0.05$) y pruebas de contraste (Tukey $p \leq 0.05$), se observó que el Consorcio B1, el tratamiento a temperatura de 25°C presento 0.296 ± 0.087 Abs, esto es significativamente superior (Tukey $p \leq 0.05$) al tratamiento de 30 °C con (0.220 ± 0.072 Abs), mientras que el tratamiento a 20 °C mostró un desarrollo de crecimiento celular más bajo (0.075 ± 0.066 ABS) (figura 2a). Resultados diferentes se observaron para el consorcio B2, cuyo mejor crecimiento se observó a 25 °C ($0.249 \pm 0,076$ Abs) y 30 °C ($0.230 \pm 0,117$ Abs), esto fue superior al crecimiento a 20 °C ($0,065 \pm 0,047$ Abs) (figura 2b). Esto significa que el consorcio B2 tiene mayor tolerancia a factores ambientales importantes en ambientes acuícolas como es temperatura.

Figura 2.

Descripción del crecimiento bacteriano del consorcio uno (a) y el consorcio dos (b) a diferentes temperaturas (las barras verticales corresponden a las desviaciones estándar).



3.2 Análisis de salinidad

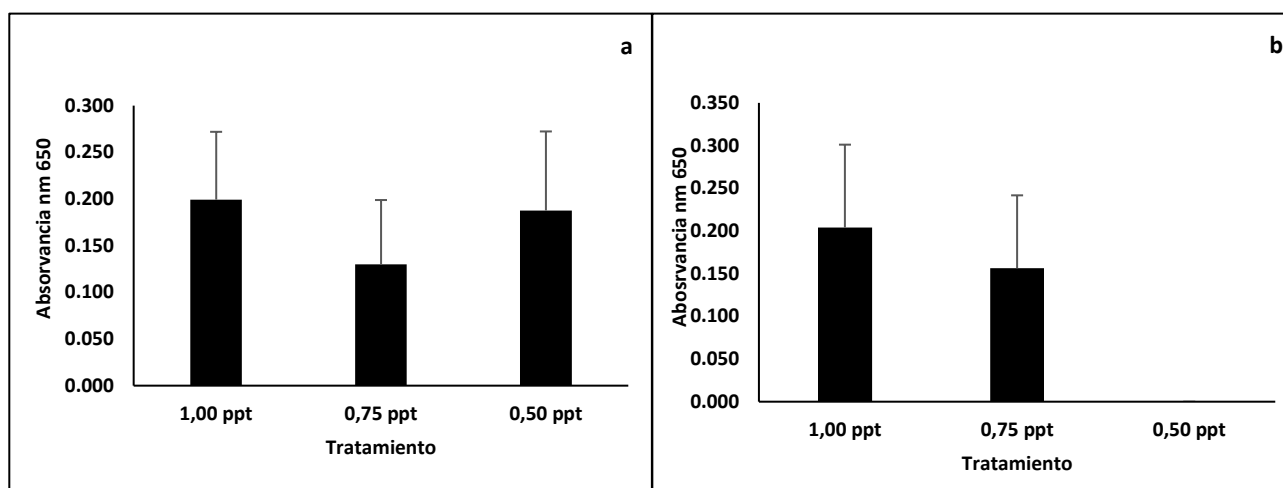
Para tratar de comprender el efecto de la salinidad sobre el tratamiento, los datos obtenidos de los ensayos se evaluaron mediante análisis de varianza (ANOVA, $p \leq 0.05$) y

pruebas de contraste (Tukey, $p \leq 0.05$). Se observó que el consorcio bacteriano B1, brinda un crecimiento similar en todas las concentraciones de salinidades evaluadas con un rango de 0.156 ± 0.085 Abs a 0.199 ± 0.073 Abs (figura 3a).

En el consorcio bacteriano B2, los resultados fueron mejores en el tratamiento a 1.0 y 0.75 ppt de salinidad (0.204 ± 0.097 Abs y 0.156 ± 0.085 Abs respectivamente), respecto al tratamiento a 0.5 ppt de salinidad cuyo crecimiento fue nulo (figura 3b).

Figura 3.

Estudio del incremento bacteriano del consorcio B1 (a) y el consorcio B2 (b) a distintas salinidades (las barras verticales corresponden a las desviaciones estándar).



3.3 Análisis de pH

Al investigar la adaptación de bacterias biorremediadora a cambios significativos en la concentración de pH durante el cultivo, fueron llevados a cabo experimentos de crecimiento en soluciones líquidas con diferentes niveles de pH.

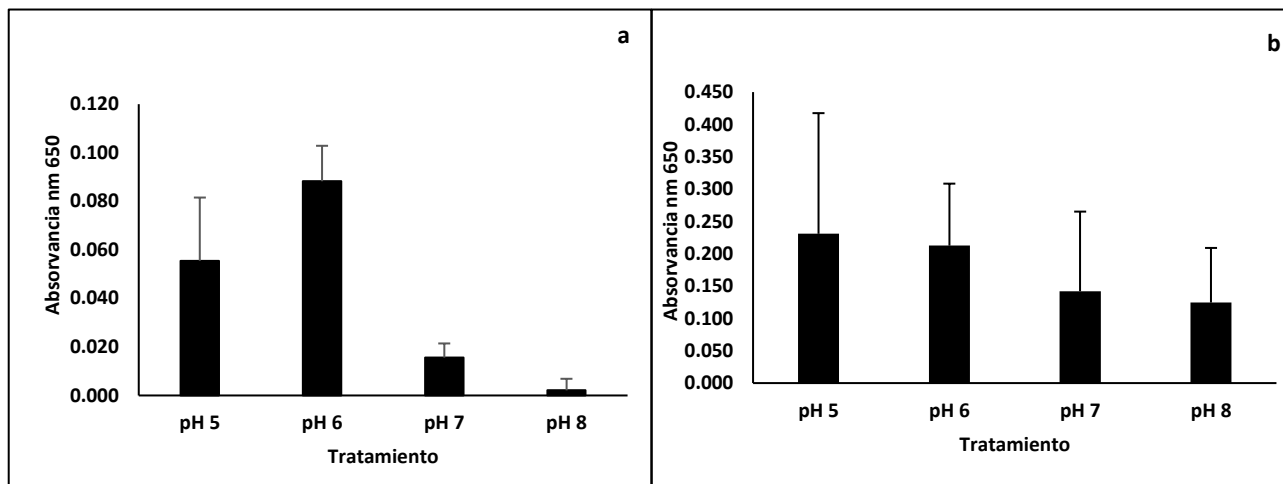
Posteriormente, tras recopilar los datos, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA $p \leq 0.05$), seguido de pruebas de contraste (Tukey $p \leq 0.05$).

Se observó que el consorcio B1, redujo significativamente su crecimiento a pH 7 y 8 (0.142 ± 0.123 Abs y 0.125 ± 0.085 Abs). Mientras que a pH ácidos el crecimiento

microbiano aumenta (0.231 ± 0.187 Abs y 0.213 ± 0.096 Abs) como se observa en la figura 4. En el caso del consorcio B2, todos los tratamientos presentaron crecimiento homogéneo.

Figura 4.

Evaluación del crecimiento bacteriano de los consorcios B1 (a) y B2 (b) a diferentes niveles de pH (las barras verticales corresponden a las desviaciones estándar).



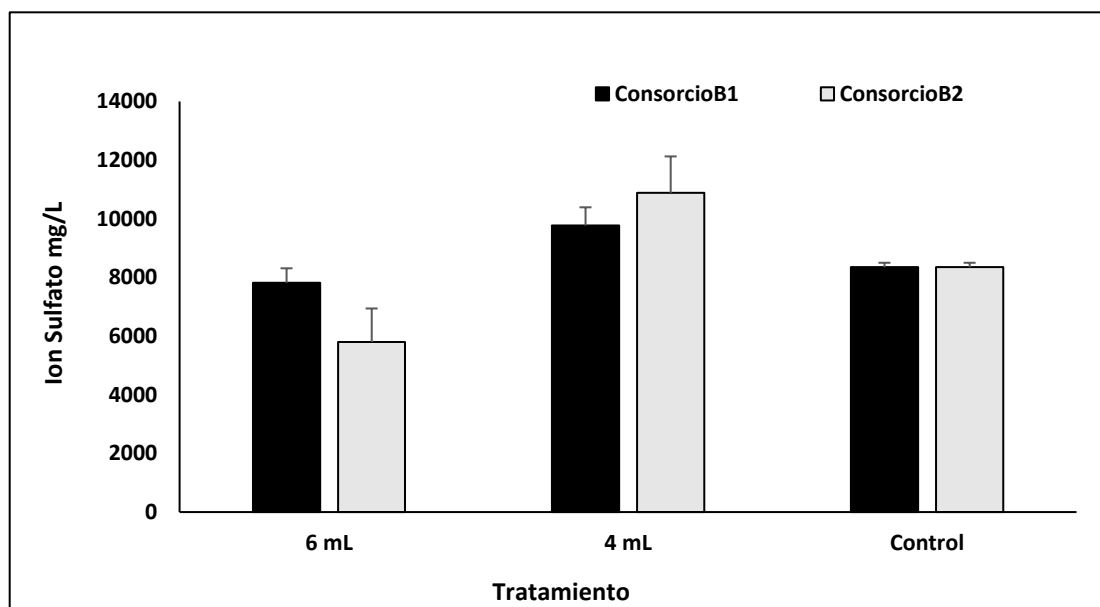
3.4 Análisis en suelo

Al comprobar la reducción de sulfato usando bacterias biorremediadoras, se pudo cuantificar mediante análisis de varianza (ANOVA $p \leq 0.05$), seguidas de pruebas de contraste (Tukey $p \leq 0.05$), se observó que, en el tratamiento de 6 ml, el consorcio B2 se presentó una disminución significativa en relación al consorcio B1 (2.017 ± 646 mg/L), mientras que en el tratamiento de 4 ml, hubo un aumento iones de sulfato del consorcio B1 y B2 teniendo una diferencia de (1.116 ± 618).

Estos resultados muestran al consorcio B1 como una opción para el tratamiento de reducción de sulfatos en suelos camaroneros (figura 5).

Figura 5.

Análisis de reducción de ion sulfato del consorcio B1 (a) y del consorcio B2 (b) en muestras de suelo camaronero (las barras verticales corresponden a las desviaciones estándar).

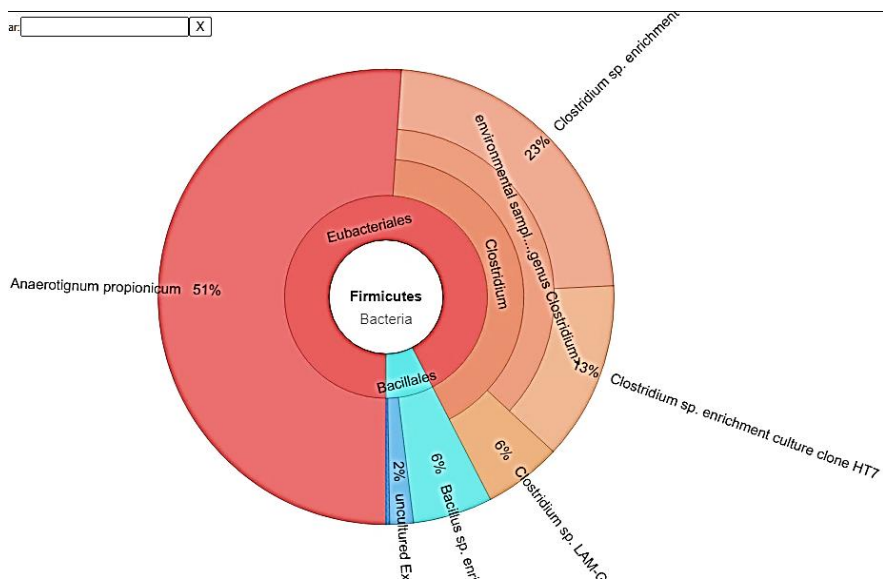


3.5 Identificación de bacterias

El análisis de los datos reveló una notable incidencia (alcanzando un 14%) de bacterias pertenecientes al filo *Firmicutes* en el ambiente estudiado. Entre estas, se identificaron *Anaerotignum propionicum* y *Clostridium spp* (figura 2), es relevante destacar que estas bacterias han sido previamente documentadas en la literatura científica como organismos sulfatorreductores.

Figura 6.

Grupos microbianos presentes en la muestra de sedimento



4 DISCUSIÓN

En los estanques de acuicultura, el contenido de sulfato en los sedimentos desempeña un papel crucial en la configuración de las comunidades microbianas, pero sus efectos aún no se han estudiado en comparación con otros nutrientes de los sedimentos. Aunque el enriquecimiento con sulfato puede inhibir el crecimiento microbiano mediante mecanismos, también sirve de receptor de electrones para las bacterias reductoras de sulfato, lo que influye en la composición de la comunidad y la dinámica de coexistencia. Los altos aportes orgánicos en los estanques de acuicultura de camarón crean condiciones anaeróbicas, favorables para las bacterias convirtiendo al sulfato en azufre elemental (Wu et al., 2023).

Los lodos de acuicultura, ricos en compuestos nitrogenados y materia orgánica, plantean riesgos medioambientales si no se gestionan adecuadamente. Las bacterias bentónicas fotosintéticas, particularmente las bacterias de azufre de color púrpura y verde, ofrecen soluciones potenciales para la descomposición de H₂S en los sedimentos de estanques a través de su capacidad para realizar la fotosíntesis en condiciones anaeróbicas. El análisis del suelo reveló que el pH de la muestra seca original era $2,69 \pm 0,36$. Se encontró un efecto significativo del tratamiento de re-sumersión en el aumento del pH del suelo y la descomposición del carbono orgánico en las muestras. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa ($p > .05$) entre el día 7 y el día 15, por lo que el análisis del suelo presentó un pH muy bajo (3.47 ± 0.00), con exceso de carbono orgánico ($>3.5\%$) (Jasmin et al., 2020). Mientras que en nuestro ensayo se observó al consorcio B1 reducir significativamente su crecimiento bacteriano a pH 7 y 8 (0.142 ± 0.123 Abs y 0.125 ± 0.085 Abs). El cultivo masivo y la aplicación de estas bacterias como probióticos pueden reducir eficazmente la toxicidad del H₂S en estanques de acuicultura (Jasmin et al., 2020).

La biorremediación microbiana es prometedora para el tratamiento de aguas residuales de acuicultura intensiva, y las bacterias moradas sin azufre (PNSB, por sus siglas en inglés) como *Rhodobacter* muestran potencial para una rápida reproducción y degradación de los componentes de los desechos de la acuicultura. Las técnicas de enriquecimiento como las columnas Winogradsky ofrecen medios eficientes para cultivar estas bacterias beneficiosas para aplicaciones de tratamiento de aguas residuales (Dong et al., 2021).

La presencia de sulfato en agua salina influye significativamente en la producción de sulfuro de hidrógeno (H₂S) a través del proceso de reducción disimilatoria de sulfato, mediado principalmente por bacterias anaeróbicas reductoras de sulfato (SRB). Estos SRB utilizan sulfato como aceptor de electrones para descomponer la materia orgánica, lo que lleva a la generación de disulfuro y sulfuro de hidrógeno como productos finales. La tasa de producción de H₂S está influenciada por varios factores como el pH, la temperatura, las concentraciones de sulfato y la biodisponibilidad de la materia orgánica.

La evaluación de la temperatura en bacterias bio remediadoras nos permitiría comprender su desarrollo en ambientes con temperaturas muy variables en los cultivos, a partir de ensayos de crecimientos en medios líquidos incubados a diferentes temperaturas (20-25-30°C). Donde se observó que el tratamiento a temperatura 25°C tuvo 0.296±0.087 Abs, mostrando mejor crecimiento bacteriano que los tratamientos a temperatura 20-30°C. Mientras que en otro ensayo se evidenció un mejor crecimiento bacteriano a temperatura 25 °C (0.249±0,076 Abs) y 30 °C (0.230±0,117 Abs), siendo superior al tratamiento de 20 °C con un valor de absorbancia 0,065±0,047. Si bien las bacterias reductoras de sulfato son diversas, las deltaproteobacterias se asocian comúnmente con este proceso, particularmente en sedimentos marinos ricos en sulfato y ambientes con altas concentraciones de sulfato y materia orgánica. Aunque se observa producción de H₂S en ambientes de acuicultura, los

microorganismos específicos involucrados aún no se han caracterizado completamente. La mitigación de la concentración de H₂S puede ocurrir a través de múltiples mecanismos, incluida la oxidación de sulfuros bacterianos, la quelación por ácidos grasos, la precipitación con metales solubles como cadmio, hierro y zinc, o la difusión en la fase gaseosa. Los estudios han indicado el potencial del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) para eliminar H₂S de los sistemas de acuicultura de agua salada, destacando la importancia de comprender su cinética y las funciones del oxígeno (O₂) y el nitrato (NO₃⁻) en este proceso (Letelier-Gordo et al., 2020).

El sulfuro de hidrógeno es altamente tóxico y puede causar mortalidades significativas en la acuicultura, lo que enfatiza la necesidad de estrategias de mitigación efectivas. Las bacterias reductoras de sulfato son las principales productoras de H₂S y prosperan en ambientes anaeróbicos donde utilizan fuentes simples de carbono para producir H₂S (Bergstedt et al., 2022). Sin embargo, la adición de nitrato puede cambiar la dinámica microbiana al promover la desnitrificación e inhibir la reducción de sulfato, lo que en última instancia reduce la producción de H₂S, comprender las complejas interacciones entre el sulfato, las comunidades microbianas y la dinámica del H₂S es esencial para desarrollar prácticas de acuicultura sostenibles. Las investigaciones futuras deberían centrarse en dilucidar estos mecanismos para mejorar la calidad del agua, mejorar la productividad y mitigar los riesgos ambientales en los sistemas de acuicultura (Torun et al., 2020).

CONCLUSIÓN

- El análisis molecular de las cepas de bacterias sulfatorreductoras permitió identificar genes específicos *Anaerotignum propionicum* y especies del género *Clostridium* que estuvieron involucrados en la reducción de sulfatos.
- Las bacterias sulfatorreductoras mostraron su capacidad de crecimiento bajo diferentes condiciones de temperatura, salinidad y pH, mostrando su capacidad de adaptación y reproducción en diferentes entornos, esenciales para la mejora del suelo en los sistemas de acuicultura.
- Los resultados mostraron que las bacterias sulfatorreductoras funcionan como agentes biorremediadores en la calidad del suelo, promoviendo un entorno más saludable para la cría de camarones.

BIBLIOGRAFÍA

- APHA. (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 1496.
- ASTM International. (2011). Designation: D2487-11 standard practice for classification of soils for engineering purposes (unified soil classification system). *ASTM International*, 1–12.
<https://doi.org/10.1520/D2487-11.2>
- Bergstedt, J. H., Skov, P. V., & Letelier-Gordo, C. O. (2022). Efficacy of H₂O₂ on the removal kinetics of H₂S in saltwater aquaculture systems, and the role of O₂ and NO₃⁻. *Water Research*, 222(February), 118892. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118892>
- Bravo, E. (2003). Caso 2: La industria camaronera en Ecuador. *Globalización y Agricultura. Jornadas Para La Soberanía Alimentaria*, 1–11.
- Dong, D., Sun, H., Qi, Z., & Liu, X. (2021). Improving microbial bioremediation efficiency of intensive aquacultural wastewater based on bacterial pollutant metabolism kinetics analysis. *Chemosphere*, 265, 129151. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129151>
- Exh_14_OB*. (n.d.).
- Gutierrez, A., Terrazas S, L. E., & Álvarez A, M. T. (2007). Aislamiento y cultivo de bacterias sulfato reductoras acidófilas para la Producción de Sulfuro Biogénico para la precipitación de metales pesados. In *Revistas Bolivianas* (Vol. 15, pp. 5–12).
- Jasmin, M. Y., Syukri, F., Kamarudin, M. S., & Karim, M. (2020). Potential of bioremediation in treating aquaculture sludge: Review article. *Aquaculture*, 519(September 2019), 734905.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734905>
- Letelier-Gordo, C. O., Aalto, S. L., Suurnäkki, S., & Pedersen, P. B. (2020). Increased sulfate availability in saline water promotes hydrogen sulfide production in fish organic waste. *Aquacultural Engineering*, 89(November 2019), 102062. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2020.102062>
- Loayza Galarza, C., Toala, P., Salcedo-Muñoz Joseph, V., & Sotomayor-Pereira, J. (2022). Efecto covid-19 en las determinantes de las exportaciones del sector camaronero del Ecuador, año 2020. *ECA Sinergia*, 13(1), 21. https://doi.org/10.33936/eca_sinergia.v13i1.3311

- Lopez, P., & Fuentes, J. (2015). *Las bacterias sulfato-reductoras The sulfate-reducing bacteria As bacterias sulfato-redutoras Biosynthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles View project. October, 2–7*. <https://www.researchgate.net/publication/309322176>
- Martínez-Córdova, L., Martínez-Porchas, M., & Cortés-Jacinto, E. (2009). Camaronicultura Mexicana y Mundial: ¿Actividad sustentable o industria contaminante? *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 25(1), 181–196.
- Martínez-Córdova, L. R., Martínez-Porchas, M., López-Elías, J. A., & Enríquez-Ocaña, L. F. (2014). Uso De Microorganismos En El Cultivo De Crustáceos. *BIOtecnica*, 16(3), 50. <https://doi.org/10.18633/bt.v16i3.141>
- Monroy-Cruz, Y. (2014). Bacterias sulfato reductoras. *Universidad Militar de Nueva Grana, Bogotá*, 28. [http://unimilitar-dspace.metabiblioteca.org/bitstream/10654/12039/1/BSR - SEMINARIO DE INVESTIGACION.pdf](http://unimilitar-dspace.metabiblioteca.org/bitstream/10654/12039/1/BSR-SEMINARIO-DE-INVESTIGACION.pdf)
- Pardo-Carrasco, S., Suárez-Mahecha, H., & Pertuz-Buelvas, V. (2009). Interacción de los suelos sulfatados ácidos con el agua y sus efectos en la sobrevivencia del bocachico (*Prochilodus magdalenae*) en cultivo. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 22(4), 619–631. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902009000400005&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Peng, S., Wang, F., Li, X., Fan, L., & Gong, F. (2019). A microbial method for improving salt swelling behavior of sulfate saline soil by an experimental study. *Alexandria Engineering Journal*, 58(4), 1353–1366. <https://doi.org/10.1016/j.aej.2019.11.006>
- Sánchez-Meza, P. (2007). *Aprovechamiento de los ambientes reducidos en los canales de Xochimilco para el cultivo del acocil, Cambarellus montezumae, para consumo humano*. 47. <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/bitstream/123456789/2046/1/103863.pdf>
- Torun, F., Hostins, B., Teske, J., De Schryver, P., Boon, N., & De Vrieze, J. (2020). Nitrate amendment to control sulphide accumulation in shrimp ponds. *Aquaculture*, 521(January), 735010. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735010>

Useche-Castro, V., Sáenz-Orjuela, Constanza López- Chaparro, Y., & León-Gallo, A. (2020). Aislar y aplicar bacterias sulfato reductoras para la depuración de aguas residuales de la mina del centro minero. *Revista Centro Minero*, 2, 34–40.

<http://revistas.sena.edu.co/index.php/CEMI/article/view/3894>

Wang, F., Peng, S., Fan, L., & Li, Y. (2022). Mechanism of pore relative humidity on salt swelling characteristics in sulfate saline soil. *Alexandria Engineering Journal*, 61(6), 4963–4976.

<https://doi.org/10.1016/j.aej.2021.09.062>

Wu, L., Yang, P., Zhang, L., Luo, L., Hong, Y., Zhu, W., Zheng, L., Zhao, G., Tong, C., & Peñuelas, J. (2023). Sediment sulfate content determines assembly processes and network stability of bacteria communities of coastal land-based shrimp aquaculture ponds. *Aquaculture*, 563(October 2022).

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738953>