



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN RECURSOS ACUÁTICOS



EFECTO DE BACTERIAS HETEROTROFAS CON ACTIVIDAD

DESNITRIFICANTE AEROBICA Y AGENTE BIOCONTROL EN EL CULTIVO

DE JUVENILES DE *Penaeus vannamei*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN RECURSOS ACUÁTICOS

**EN EL ÁREA DE Desarrollo de sistemas para la producción sustentable de
organismos acuáticos**

PRESENTA:

Alexis Cárdenas Canizalez

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Irasema Elizabeth Luis Villaseñor †

Dr. Francisco Antonio Flores Higuera

Dr. Píndaro Álvarez Ruiz

Mazatlán, Sinaloa, México, Junio del 2024.



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial
Compartir Igual, 4.0 Internacional



AGRADECIMIENTOS

Con gran satisfacción y gratitud, quiero expresar mi sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que fueron fundamentales para la culminación de mi tesis de maestría titulada "EFECTO DE BACTERIAS HETEROTROFAS CON ACTIVIDAD DESNITRIFICANTE AEROBICA Y AGENTE BIOCONTROL EN EL CULTIVO DE JUVENILES DE *Penaeus vannamei*".

Este logro no habría sido posible sin el apoyo, la orientación y la colaboración de diversas figuras a lo largo de mi trayectoria académica en el **Programa de Posgrado en Ciencias en Recursos Acuáticos de la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Autónoma de Sinaloa**, durante el periodo 2020-2022.

En primer lugar, agradezco al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT)** por el apoyo financiero recibido a través de la beca con número de registro 1081742, que me permitió dedicarme de lleno a mi investigación y cubrir mis necesidades durante estos dos años.

A mis directores de tesis, la Dra. Irasema Luis Villaseñor, el Dr. Francisco Antonio Flores Higuera y el Dr. Píndaro Álvarez Ruiz, les expreso mi más profundo agradecimiento por su guía, paciencia y apoyo incondicional. Sus conocimientos y experiencia fueron fundamentales para el desarrollo de este proyecto. Además, agradezco al Dr. Píndaro Álvarez Ruiz por permitirme realizar mis experimentos en el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa (CIIDIR Sinaloa), donde encontré un entorno de trabajo ideal y recursos indispensables para mi investigación.

También, quiero expresar mi gratitud a los miembros de mi comité de evaluación y sinodales, el Dr. José Antonio Estrada Godínez, la Dra. María del Rosario Pacheco Marges y el Dr. Luis Rafael Martínez Córdova, por su tiempo, valiosas observaciones y contribuciones que enriquecieron significativamente mi trabajo.

A mis profesores, el Dr. Francisco Antonio Flores Higuera, Dra. María del Rosario Pacheco Marges, Dr. Raúl Pérez González, Dr. Juan Francisco Arzola González, Dra. Laura Beatriz

Rivera Rodríguez, Dr. Joel Bojórquez Saucedo, Dr. José Cristóbal Román Reyes, y Dr. Luis Antonio Salcido Guevara.

A L.I. Nérika Azucena Benítez Pardo, Dr. Guillermo Rodríguez Domínguez, Dr. Mario Nieves Soto, y a todo el personal administrativo que hizo posible mi ingreso y estancia en el Posgrado en Ciencias en Recursos Acuáticos de la Facultad de Ciencias del Mar.

No puedo dejar de mencionar a mis compañeros y amigos que compartieron conmigo este camino, brindándome su apoyo moral y motivación constante. Su compañía y palabras de aliento fueron esenciales en los momentos más difíciles.

Finalmente, agradezco a mi familia y a mi esposa Lidia por su amor y apoyo incondicional durante todo este proceso. Su fe en mí y su constante aliento me dieron la fuerza necesaria para superar los desafíos y alcanzar esta meta.

Dedicatoria

A la memoria de la Dra. Irasema Luis Villaseñor, cuya guía y sabiduría fueron fundamentales para la realización de este trabajo. Su pasión por la ciencia y su dedicación a la enseñanza dejaron una huella imborrable en todos aquellos que tuvimos el privilegio de conocerla y aprender de ella.

Su legado vive en cada uno de sus estudiantes y en la obra que ayudó a construir. Esta tesis es un testimonio de su impacto en mi vida académica y personal.

Gracias, Dra. Irasema, por su invaluable apoyo y por inspirarme a seguir adelante, incluso en los momentos más difíciles. Su memoria será siempre una fuente de inspiración.

Con profundo respeto y gratitud.

RESUMEN

Hoy en día, la industria acuícola se está enfocando en el uso de bacterias heterótrofas que remueven compuestos nitrogenados, ayudando así a eliminar agentes tóxicos del nitrógeno, como el amonio y nitritos. Estos compuestos ocasionan estrés e inhiben la respuesta inmune a patógenos. El objetivo de este estudio es establecer el efecto de bacterias heterótrofas en la mejora de la calidad de agua en un cultivo de juveniles de *Penaeus vanamei* y la posible resistencia a una cepa patógena de *Vibrio parahemolyticus* causante de la enfermedad de la necrosis aguda de hepatopáncreas (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease V_{PAHPND}). Se realizó una prueba *in vitro* con 6 bacterias para determinar: tasa de remoción de amonio, nitritos y nitratos, durante 72 h a 30°C. Los resultados indican que *Pseudomonas stutzeri* tuvo mejor tasa de remoción de amonio. Las bacterias *P. stutzeri*, *P. balearica* y *Pseudomonas* sp. removieron el 100 % del nitrato en 24 h, mientras que *Shigella flexneri* y *Enterobacter huaxiensis* en 36 h. *P. stutzeri* y *Pseudomonas* sp. removieron el 100% de los nitritos en 48 h, mientras que *P. balearica*, *S. flexneri* en 72 h. Posteriormente se usaron las cepas *P. stutzeri*, *P. balearica* y *Pseudomonas* sp en pruebas *in vivo* en un cultivo de juveniles de *P. vanamei* durante 30 días, removiendo el amonio en un 93%, 98% y 98%, respectivamente, con una supervivencia de 92.5%, 92.5% y 90%, mientras que en el control se tuvo una supervivencia del 57.5%. Se realizó un reto contra una cepa patógena de *Vibrio parahemolyticus* causante de la enfermedad de la necrosis aguda de hepatopáncreas (V_{PAHPND}) con los organismos previamente tratados. Se tomó muestra de la hepatopáncreas para hacer extracción de ADN y cuantificación por qPCR de vibrios que lograron colonizar después del reto con V_{PAHPND} . En los organismos tratados con las cepas bacterianas probadas se obtuvo una supervivencia del 100% y poca colonización de V_{PAHPND} en el hepatopáncreas. Esto contrasta con el control, que tuvo un 40% de supervivencia y una alta colonización de V_{PAHPND} .

Palabras clave: **nitrificación, amonio, nitritos, nitratos, *Vibrio parahemolyticus*, *Penaeus vanamei*.**

ABSTRACT

Nowadays, the aquaculture industry is focusing on the use of heterotrophic bacteria that remove nitrogen compounds, thus helping to eliminate toxic nitrogen agents such as ammonia and nitrites. These compounds cause stress and inhibit the immune response to pathogens. The objective of this study is to establish the effect of heterotrophic bacteria on improving water quality in a culture of juvenile *Penaeus vanamei* and the possible resistance to a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of Acute Hepatopancreas Necrosis Disease (V_{PAHPND}). An *in vitro* test was conducted with 6 bacteria to determine the removal rate of ammonia, nitrites and nitrates, over 72 h at 30°C. The results indicate that *Pseudomonas stutzeri* had the best ammonia removal rate. The bacteria *P. stutzeri*, *P. balearica* and *Pseudomonas* sp. removed 100% of nitrate in 24 h, while *Shigella flexneri* and *Enterobacter huaxiensis* did so within 36 h. *P. stutzeri* and *Pseudomonas* sp. removed 100% of the nitrites within 48 h, while *P. balearica*, *S. flexneri* did so within 72 h. Subsequently, the strains *P. stutzeri*, *P. balearica* and *Pseudomonas* sp were used in *in vivo* tests in a culture of *P. vannamei* juveniles for 30 days, removing ammonia by 93%, 98% and 98%, respectively, with a survival of 92.5%, 92.5% and 90%, whereas the control had a survival rate of 57.5%. A challenge was carried out against pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* causing agent Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (V_{PAHPND}), with the organisms previously treated. Samples of the hepatopancreas were taken for DNA extraction and qPCR of vibrios that managed to colonize after the challenge with V_{PAHPND} . In organisms treated with the tested bacterial, a survival rate 100% and low colonization of V_{PAHPND} in the hepatopancreas were obtained. This contrasts with the control, which had 40% survival and high V_{PAHPND} colonization.

Keywords: **nitrification, ammonia, nitrites, nitrates, *Vibrio parahaemolyticus*, *Penaeus vanamei*.**

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	6
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	11
5. HIPÓTESIS	12
6. OBJETIVO GENERAL.....	13
6.1. Objetivos específicos	13
7. MATERIALES Y METODOS.....	14
7.1. Determinación del efecto de las bacterias biocontrol en la calidad del agua en un ensayo <i>in vitro</i>	14
7.1.1. Preparación de inóculos de bacterias de prueba	14
7.1.2. Bioensayo Calidad de agua	15
Medición de NO₂⁻, NO₃⁻ y NH₄⁺	15
7.2. Evaluación del efecto de la adición de las cepas seleccionadas en un cultivo de juveniles de <i>P. vannamei</i>	18
7.2.1. Preparación de inóculos de bacterias de prueba	18
7.2.2. Evaluación del efecto de la adición de las cepas seleccionadas en un cultivo de juveniles de <i>P. vannamei</i>	18
7.2.3. Cultivo de Bacterias patógenas	19
7.2.4. Reto con <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	19
7.2.5. Extracción de ADN	20
7.2.6. PCR en tiempo real con sonda TaqMan	20
8. Análisis estadísticos.....	23
9. RESULTADOS.	24
9.1. Bioensayo 1. Calidad de agua de manera <i>in vitro</i>	24
9.2. Bioensayo 2 Evaluación del efecto de la adición de las cepas seleccionadas sobre la respuesta productiva en un cultivo de juveniles de <i>P. vannamei</i>	30
9.3. Bioensayo III Reto con <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	38
10. DISCUSIÓN	40
10.1. Bioensayo 1. Calidad de agua de manera <i>in vitro</i>	40

10.2. Bioensayo II Evaluación del efecto de la adición de las cepas seleccionadas en un cultivo de juveniles de <i>P. vannamei</i>	43
10.3. Bioensayo III Reto con <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	45
11. CONCLUSIÓN.....	47
12. BIBLIOGRAFIA.	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.	Cepas previamente aisladas utilizadas en el bioensayo 1.....	14
Tabla II.	Cepas bacterianas que dieron positivas a los genes <i>nirK</i> , <i>nirS</i> , <i>narG</i> , <i>napA</i> y <i>amoA</i> y el número de genes asociados al ciclo del Nitrógeno detectado por cepa.....	17
Tabla III	Mezcla de reactivos para PCR convencional con AP4.....	21
Tabla IV	Mezcla de reactivos para curva de calibración de V_{PAHPND} - E9.....	21

ÍNDICE DE GRAFICAS

- Figura 1. Concentración de amonio con 6 tratamientos y un control en un periodo de 72 horas. Las cepas utilizadas fueron ●14-ISDES1, ○20-IRS1B, ▼12A-AEDES1, Δ13A-SIDES1, ■26A-ELB1 □6-ISLB1. (media ± desviación estándar) P<0.05. 25
- Figura 2. Concentración de nitratos con 6 tratamientos y un control en un periodo de 72 horas. Las cepas utilizadas fueron ●14-ISDES1, ○20-IRS1B, ▼12A-AEDES1, Δ13A-SIDES1, ■26A-ELB1 □6-ISLB1. (media ± desviación estándar) P<0.05. 27
- Figura 3. Concentración de nitritos con 6 tratamientos y un control en un periodo de 72 horas. Las cepas utilizadas fueron ●14-ISDES1, ○20-IRS1B, ▼12A-AEDES1, Δ13A-SIDES1, ■26A-ELB1 □6-ISLB1. (media ± desviación estándar) P<0.05. 28
- Figura 4. Porcentaje de supervivencia % con 3 tratamiento y un control en un periodo de 30 días. Las cepas utilizadas fueron. ▼14-ISDES1, ○13A-SIDES1, ●6-ISLB1. (media ± desviación estándar) P<0.05 29
- Figura 5. Peso promedio de los camarones (gr) con los 3 tratamiento y un control en un periodo de 30 días. Las cepas utilizadas fueron. ▼14-ISDES1, ○13A-SIDES1, ●6-ISLB1. (media ± desviación estándar) P<0.05 30
- Figura 6: Concentración de nitratos con 3 tratamientos y un control en un periodo de 30 días. Las cepas utilizadas fueron. ▼14-ISDES1, ○13A-SIDES1, ●6-ISLB1. (media ± desviación estándar) P<0.05 32
- Figura 7: Concentración de nitritos con 3 tratamientos y un control en un periodo de 30 días. Las cepas utilizadas fueron. ▼14-ISDES1, ○13A-SIDES1, ●6-ISLB1. (media ± desviación estándar) P<0.05 33
- Figura 8: Concentración de amonio con 3 tratamientos y un control en un periodo de 30 días. Las cepas utilizadas fueron. ▼14-ISDES1, ○13A-SIDES1, ●6-ISLB1. (media ± desviación estándar) P<0.05 35

Figura 9. Cuantificación del amplicón PirA en $V_{PAHPND-E9}$ durante la cinética de crecimiento bajo diferentes tratamientos. Las diferencias significativas entre tratamientos para cada momento de muestreo se indican con letras diferentes. La significancia estadística se calculó mediante ANOVA de una vía ($p < 0,05$). Las barras de error representan la desviación estándar de la media

36

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Producción Acuícola y problemas de enfermedades

La acuicultura es una de las industrias más importantes en la producción de alimentos en el mundo debido a su rápido desarrollo (Wang *et al.*, 2018). A nivel mundial, la producción acuícola se estimó en 122 millones de toneladas, con un valor de 281.5 mil millones de dólares estadounidenses para el año 2022 (FAO, 2022). Entre los principales organismos que contribuyen a esta producción se encuentran los camarones del género *Penaeus*, con una producción mundial estimada de 5,6 millones de toneladas para el 2023 (Jory, 2023). México ocupa el séptimo lugar en el mundo como productor de crustáceos después de China, Indonesia, Vietnam, India, Ecuador y Tailandia (GSA, 2022), con una producción de 198,062 toneladas. Se estima que, en México, el 89% del cultivo de camarón se lleva a cabo en los estados de Sonora y Sinaloa (CONAPESCA, 2022), generando ingresos de 967 millones de dólares estadounidenses, de los cuales el 47.8% se produjo en Sinaloa durante 2021 (CONAPESCA, 2022).

Sin embargo, a escala global, esta producción se ha visto afectada por brotes de enfermedades, como el registrado en el año 2013, donde se observó una disminución en la producción de camarón blanco de cultivo debido a los efectos de algunos virus como la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV), el Virus de la Cabeza Amarilla (YHV), la Mancha Blanca (WSSV), el Síndrome de Taura (TSV), y la Mionecrosis Infecciosa (IMNV) (Reyes-Mero, 2021).

Aunque estos organismos parezcan sanos al comienzo del cultivo, estas enfermedades están ocurriendo frecuentemente tanto en sistemas intensivos como extensivos (Asche *et al.*, 2021). El desarrollo del sector acuícola se ha visto afectado con pérdidas de varios millones dólares por año debido los brotes de infecciones, por lo que el éxito o el fracaso de esta actividad depende principalmente de una buena gestión ante estas enfermedades. (Jennings *et al.*, 2016).

Las pérdidas provocadas por las enfermedades virales y bacterianas son el principal factor que dificulta la sostenibilidad del cultivo de camarón (De la Peña *et al.*, 2015; Hong *et al.*,

2016). Dentro de las enfermedades bacterianas, la vibriosis es una de las más frecuentes en los cultivos de camarones peneidos (Abdel-Latif *et al.*, 2022), y es causada por bacterias del género *Vibrio*, que forma parte de la microbiota natural en ambientes marinos y estuarinos, así como en los sistemas acuícolas donde se cultivan camarones (Zermeño-Cervantes *et al.*, 2023). Las principales especies de vibrios patógenos causantes de estas enfermedades son *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* y *V. penaeicida* (Grajeda-Gutierrez, 2019).

Durante los últimos años, varios autores han reportado que la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* ha sido la causa de la enfermedad letal conocida como Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS), también denominada *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* (AHPND) o Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda (Manan, 2015). Los organismos infectados por *Vibrio parahaemolyticus* muestran un hepatopáncreas pálido o blanco, atrofia celular y manchas o estrías negras, y finalmente una mortalidad masiva a los pocos días de iniciados los signos de la enfermedad (Manan, 2015).

Esta enfermedad ha provocado grandes pérdidas económicas en los criaderos de camarón de países como China, Vietnam, Tailandia, Malasia, y también la Gran Bretaña para luego pasar a México y otros países (Zorriehzahra, y Banaederakhshan, 2015). En México, la Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda provocó una grave crisis en la industria camaronícola en los años del 2013 al 2016 (GOAL, 2019).

En estos escenarios, se estaban aplicando varios químicos y antibióticos como un recurso para controlar estas infecciones bacterianas. El uso de antibióticos en la industria acuícola ha provocado severas pérdidas económicas y, a la vez, generado resistencia de algunas cepas bacterianas hacia los antibióticos utilizados (Limbu *et al.*, 2018). Por lo tanto, actualmente, los antibióticos no pueden asegurar un control eficiente de la vibriosis. Es por ello que el uso sistemas de cultivo que promocionan la proliferación de la microbiota autótrofa o heterótrofa representan uno de las estrategias más viables hacia una acuicultura sostenible (Martínez-Córdova *et al.*, 2015).

Una medida para contrarrestar estas enfermedades ha sido el uso de bacterias heterótrofas como agentes biocontrol, ya que ayudan a eliminar los desechos tóxicos del nitrógeno, como

el amonio, amoniaco o nitritos y tienen un efecto inhibitorio para otros patógenos en el cultivo (Nadella *et al.*, 2021).

Algunas bacterias de esta índole tienen compuestos antibióticos como pirrolnitrina, 2,4-diacetilfloroglucinol, además de los sideróforos, bacteriocinas y piocianina (Kankariya *et al.*, 2019; Tienda-Serrano, 2021; Bendoya-Velez, 2022; Priyaja *et al.*, 2014). Este último es un pigmento de fenazina soluble en cloroformo de color azul verdoso que posee propiedades antibacterianas de amplio espectro, antifúngicas y actividad antiprotozoaria (Pragana *et al.*, 2022). Las bacterias productoras de este pigmento se han utilizado comúnmente en la agricultura como agentes biocontrol para la inhibición de hongos y bacterias patógenas, (Justo *et al.*, 2014.; Motta-Escobar *et al.*, 2022) así como para inhibir el *Vibrio* en la acuicultura (Hamad, *et al.*, 2020). Las bacterias que producen piocianina también se han utilizado como agentes biorremediadores de agua (Dou *et al.*, 2021); recientemente, se han aplicado en la acuicultura como antibióticos contra *Vibrio harveyi* y ha demostrado una excelente mejora en la supervivencia de larvas en los sistemas de cría de camarón (Hamad *et al.*, 2020).

La característica fundamental para que una bacteria sea considerada como agente biocontrol es su capacidad para ser benéfica para el organismo cultivado, mejorando la calidad del agua e inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas (Cutting, 2011).

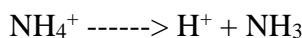
1.2. Calidad de Agua en los sistemas intensivos e hiperintensivos

El manejo de la calidad de agua es uno de los factores más importantes que se consideran para lograr la eficiencia en los cultivos intensivos e hiper-intensivos de camarón (Hernández-Gurrola 2016). Estos sistemas involucran altos recambios de aguas y la liberación continua de agua contaminada, lo que ocasiona problemas ambientales (Cho *et al.*, 2013; Ramírez y Romero, 2017). La acumulación de desechos nitrogenados en el agua, provenientes de alimento no consumido, organismos muertos y la alta densidad de población en el cultivo intensivo de camarón junto con las heces, son los principales factores que contribuyen a la acumulación de amonio y amoniaco en los estanques. Esto resulta en cantidades sustanciales de efluentes contaminados, lo que conduce a un aumento de la contaminación ambiental de

ecosistemas adyacentes a las zonas de cultivo (Crab *et al.*, 2007; Habaki *et al.*, 2011; Hashihama *et al.*, 2015).

Para los organismos acuáticos como los camarones, el amonio y nitrito son altamente tóxicos (Martínez-Córdova *et al.*, 2015). En el caso del amonio, está representado por dos especies químicas del nitrógeno con diferente grado de toxicidad. La primera es el NH₃ (amonio no ionizado o amoniaco), el cual es extremadamente tóxico debido a su alta solubilidad en lípidos y su capacidad para ingresar fácilmente a pH altos a través de la membrana celular. El otro es el NH₄⁺ (amonio ionizado o ion amonio) que se considera levemente tóxico o no tóxico, pero su toxicidad aumenta drásticamente a bajos pH (Liang *et al.*, 2016, Xiao *et al.*, 2019 y Frías-Espericueta *et al.*, 2000).

El nitrógeno amoniacal total (NAT) es la suma de estas dos formas del nitrógeno en el agua:



Se ha establecido que la concentración letal media LC₅₀ (mg L⁻¹) para *Penaeus vannamei* es de 39.54 mg L⁻¹ para el N-amonio (Lin y Chen, 2001), mientras que para el NH₃ –N es de 2.59 mg L⁻¹, para nitritos es de 16.7 mg L⁻¹ N-NO₂ en 48 h (Tu *et al.*, 2022). Concentraciones superiores a estos valores hacen que los organismos cultivados sean más vulnerables a enfermedades, principalmente microbianas, lo que provoca grandes daños en la industria camaronícola (Valencia-Castañeda, *et al.*, 2018).

Ante esto, el tratamiento eficiente de las aguas residuales y la efectiva remoción del NAT de los estanques de cultivo son clave para el éxito en la acuicultura (Shao *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2020). Se han utilizado una serie de técnicas para eliminar el exceso de nitrógeno de los cultivos acuícolas, entre las cuales se encuentran el intercambio y reemplazo del agua, la mejora y estímulo del proceso de nitrificación, y la eliminación de amonio a través de la asimilación por acción microbiana, que la transforman en proteína (Zhou *et al.*, 2023).

Diversos autores han reportado el uso de microorganismos para eliminar desechos nitrogenados en aguas residuales, potenciando la mejora de su calidad. Entre las principales especies se pueden mencionar a *Pseudomonas stutzeri* (Su *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2015), *Alcaligenes faecalis* (Joo *et al.*, 2007), *Rhodococcus sp.* CPZ24 (Chen *et al.*, 2012),

Pseudomonas putida (Kim *et al.*, 2008), *Bacillus subtilis* A1 (Yang *et al.*, 2011), *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 (Padhi *et al.*, 2013), *Acinetobacter calcoaceticus* (Zhao *et al.*, 2010) y *Vibrio diabolicus* SF16 (Duan *et al.*, 2015).

El uso de bacterias nitrificantes y desnitrificantes heterotróficas ha ganado un gran auge en la mineralización aeróbica de los compuestos nitrogenados en el tratamiento de aguas residuales (Krishnani *et al.*, 2013). Por lo tanto, la eliminación de amonio a través de la transformación en proteína microbiana es un método práctico para los cultivos cerrados en la acuicultura (Barik *et al.*, 2018).

La nitrificación bacteriológica es un proceso que implica la oxidación del amonio (NH_4^+) o amoniaco (NH_3) a hidroxilamina (NH_2OH) mediante la enzima amonio monooxigenasa (AMO) y luego a nitrato (NO_3^-) por bacterias nitrito oxidantes (NOB). (Sedlacek *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018), La desnitrificación es el proceso mediante el cual se elimina el nitrógeno del agua debido a la reducción del nitrato (NO_3^-) a óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O), y finalmente a nitrógeno gaseoso (N_2), el cual es liberado a la atmosfera (Correa-Galeote, 2016). Este proceso inicia con la activación de la enzima nitrato reductasa, que facilita la reducción del NO_3^- ; esta enzima puede actuar tanto de manera aeróbica (NaP) como anaeróbica (NAR). El nitrito es convertido a NO o N_2O por la enzima nitrito reductasa (NIR) (Murugapiran *et al.*, 2013).

En este sentido, es importante llevar a cabo estudios centrados en el uso de bacterias heterótrofas que participen en el proceso de mineralización de compuestos nitrogenados y que presenten actividad antimicrobiana contra patógenos, con el fin de utilizarlos en cultivos de camarones en la acuicultura. Estos estudios pueden ayudar a reducir los niveles de nitrógeno en el agua y a disminuir los efectos de infecciones bacterianas, principalmente causadas por bacterias del género *Vibrio*, que provocan altas tasas de mortalidad en este crustáceo. La presente investigación tiene como objetivo analizar el efecto de bacterias biocontrol en la calidad de agua en juveniles de *Penaeus vannamei* y además la posible resistencia a una cepa patógena de *Vibrio parahemolyticus* bajo condiciones de un cultivo intensivo.

2. ANTECEDENTES

Las bacterias heterótrofas están presentes en los cuerpos de agua. Incluso, diferentes estudios han destacado la existencia de bacterias aerobias desnitrificantes en la biorremediación de aguas residuales (Chen *et al.*, 2014; He *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2019). Los sistemas bioseguros y de cero recambios de agua, tienen ventajas notables en la mejora del uso y calidad de agua, reducción de la descarga de efluentes contaminados, así como la disminución del riesgo de transmisión de enfermedades entre poblaciones silvestres y cautivas (Schock *et al.*, 2013; Ray *et al.*, 2017). Estos residuos producto del cultivo de organismos acuáticos acumulan altas concentraciones de nitrógeno (amonio y nitrito) y materia orgánica, producto del exceso de heces, alimento no consumido y metabolitos (Ruiz *et al.*, 2020).

Para que un cultivo de camarón sea exitoso deben de tener un equilibrio en la capacidad de producción como en la asimilación de estos residuos, teniendo en cuenta aspectos como la supervivencia y el crecimiento (El-Sayed, 2021). En este sentido, las comunidades bacterianas desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la calidad de agua mediante la asimilación y mineralización de los compuestos orgánicos del estanque, lo que favorece un desarrollo óptimo del camarón (Rurangwa, y Verdegem, 2015).

2.1.Mecanismo de acción de las bacterias

Diversos autores han reportado que para solucionar estos problemas sanitarios y mejorar la producción en la camaronicultura es necesario el manejo de las comunidades de bacterias y diferentes grupos de fitoplancton, ya que estos reciclan nutrientes y degradan la materia orgánica logrando así el desarrollo de una cadena trófica bien estructurada entre el conglomerado de bacterias y microalgas (Lananan, *et al.*, 2014 y Decamp *et al.*, 2009). Lian *et al.* (2024) indicó que al aplicar el balance bacterias-microalgas, es factible mejorar la calidad de agua y la tasa de crecimiento de camarón al promover el desarrollo de bacterias heterótrofas, manteniendo aceptables los niveles de metabolitos nitrogenados a la vez que constituyen una fuente suplementaria de alimento.

Hoy en día, el uso de bacterias aerobias desnitrificantes en acuicultura intensiva ha recibido mucha atención debido a que, en condiciones aerobias, la nitrificación y desnitrificación

ocurren de forma simultánea. En este sentido, se ha demostrado el beneficio del uso de bacterias del género *Bacillus* con actividad desnitrificante, al comprobar que la cepa N31 de *Bacillus litoralis*. remueve nitritos bajo condiciones aeróbicas y puede ser utilizado como probiótico en acuicultura intensiva (Huang *et al.*, 2017). Resultados similares fueron obtenidos por Thurlow *et al.* (2019), quienes observaron que la cepa bacteriana *Bacillus velezensis* AP193 mejora la calidad del agua en un cultivo del bagre de canal *Ictalurus punctatus* al reducir los niveles de fósforo y nitrógeno en un 19 y 43%, respectivamente, al mismo tiempo que presenta un efecto probiótico en los organismos en cultivo.

Sin embargo, para remover el nitrógeno en agua residuales comúnmente se utilizan cepas del género *Pseudomonas* (Ji *et al.*, 2015). Una de las bacterias heterótrofas más estudiadas por su actividad desnitrificante es *Pseudomonas stutzeri*, la cual se encuentra comúnmente en suelos y aguas contaminadas (Sacca, 2014) y puede remover hasta el 57.2% del amonio en 24 horas. Silva *et al.* (2020) reportaron que *P. stutzeri* removió el 100% del amonio en 48 horas en un medio nitrificante donde la fuente de amonio fue sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$. De igual forma, otros géneros bacterianos presentan capacidad de fijación de nitrógeno como las bacterias, *Klebsiella pneumoniae*, y *Enterobacter roggkampii*, las cuales son consideradas excelentes microorganismos fijadores de nitrógeno al oxidar el amonio por la vía de la hidroxilamina y a su vez son consideradas como bacterias diazotróficas (Guo *et al.*, 2023; Zhang, 2019). En este sentido, Zhang (2019) aisló dos cepas identificadas como *Enterobacter sp. Z1* y *Klebsiella sp. Z2* que se usaron en análisis *in vitro* en medios desnitrificantes y nitrificantes, dando resultados prometedores, en la reducción de amonio, nitrógeno total y nitrito; estas cepas se utilizaron también en tratamiento de agua residuales removiendo eficazmente el amonio y el nitrógeno total.

El uso de consorcios bacterianos de cultivos mixtos es de suma importancia y tienen varias ventajas en comparación con cepas bacterianas individuales, especialmente para la eliminación de contaminantes combinados (Patel *et al.*, 2018).

Yunjie-Ruan *et al.* (2020) aislaron la bacteria *Pseudomonas balearica* cepa RAD-17, la cual tenía la enzima nitrato reductasa. Esta cepa tuvo un alto rendimiento en la desnitrificación

aeróbica, reduciendo el nitrato, el nitrito y el amonio, concluyendo que es eficiente para las tres formas típicas del nitrógeno.

Un consorcio microbiano es un conjunto de microorganismos que interactúan para su mutuo beneficio dentro de una comunidad, degradando desechos orgánicos complejos. (Zhang *et al.*, 2019)

Zhang *et al.* (2019) utilizó un consorcio (Mix-CADB) en el cual fueron identificadas 7 cepas diferentes: *Pseudomonas tolaasii*, *Pseudomonas stutzeri*, *Rhodococcus sp*, *Acinetobacter calcoaceticus*, una bacteria desnitrificante no identificada, *Bacillus litoralis*, *Bacillus subtilis*. Se observó que, al utilizar el consorcio, fue posible la eliminación de desechos nitrogenados, así como de otros contaminantes presentes en el agua, de manera mucho más eficiente que con cepas individuales, ya que se aprovechan sus diferentes habilidades metabólicas.

John *et al.* (2020) aislaron tres cepas identificadas como *Bacillus cereus*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Pseudomonas stutzeri*, las cuales se utilizaron en un cultivo de *Oreochromis mossambicus* para la degradación de amonio y nitrito en agua residuales obteniendo resultados favorables en su uso.

En la camaronicultura, para resolver problemas sanitarios y de producción implica manejar adecuadamente las interacciones de la microbiota en el sistema de cultivo y la calidad de agua mediante el desarrollo de una cadena trófica bien estructurada (Zeng *et al.*, 2020). Estudios recientes se centran en el uso de bacterias heterotróficas como medida precautoria contra patógenos y para mejorar la calidad de agua.

Priyaja *et al.* (2016) aislaron *P. aeruginosa* MCCB118 a partir de sedimento marino; observando su capacidad para inhibir el crecimiento de *V. harveyi* gracias a la producción de piocianina, un metabolito secundario con la capacidad de oxidar y reducir otras moléculas lo que puede resultar letal para otras bacterias (Pragana, *et al.*, 2022). Balakrishnan *et al.* (2022) también aislaron esta bacteria de un ambiente salobre y analizaron el efecto que tiene el pigmento piocianina contra bacterias de *Vibrio sp* sugiriendo su potencial uso como agente profiláctico en sistemas de acuicultura.

Leyton *et al.* (2014), evaluaron la actividad inhibitoria de *Bacillus pumilus* contra *V. cholerae* aislada de un ambiente marino.

Adicionalmente, el uso de *B. subtilis* en el cultivo de *Penaeus monodon* mejora el crecimiento y la resistencia a patógenos como *Vibrio* sp. (Nimrat *et al.*, 2013). Yun *et al.* (2019) demostraron que *Sphingomonas* sp. LPN080, aislada de un cultivo de *P. vannamei*, reduce efectivamente el amonio en 48 h con una tasa de eliminación del 96% y, para el nitrito, tuvo una tasa de eliminación de 87% en el mismo periodo, observó además una inhibición indirecta sobre *Vibrio* sp.

Basándonos en los antecedentes descritos, se adopta un enfoque que emplea el uso de bacterias heterótrofas como herramienta para abordar la problemática del aumento de compuestos nitrogenado y la inhibición de patógenos del género *Vibrio* en el cultivo de camarón blanco. Esta estrategia se presenta como una alternativa viable para explorar.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La intensificación de los cultivos acuícolas conlleva un aumento de efluentes que contienen altas cantidades de compuestos nitrogenados, como amonio total y nitrito. Estos compuestos se generan a partir de la oxidación de desechos orgánicos, como el alimento no consumido y las heces de los organismos en cultivo. Esta acumulación de compuestos nitrogenados no solo causa estrés en los organismos, sino que también aumenta su susceptibilidad a enfermedades.

Se han aislado bacterias heterótrofas de ambiente eutrofizado con capacidad de remoción de compuestos nitrogenados las cuales se han usado para mejorar la calidad del agua y han ganado popularidad debido a su capacidad para metabolizar amonio y otros compuestos nitrogenados presentes en sistemas de cultivo.

Además, estas bacterias producen metabolitos que han demostrado tener actividad inhibitoria contra microorganismos patógenos. Asimismo, se ha observado que mejoran la respuesta inmune de los organismos frente a situaciones de estrés.

En este contexto, el presente estudio tiene como objetivo comprender los efectos del uso de bacterias heterotróficas sobre la calidad de agua y su capacidad para inhibir diferentes patógenos bacterianos en la acuicultura.

4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Las bacterias heterótrofas aisladas de ambientes eutrofizados tienen la capacidad de remover amonio, nitritos y nitratos en un cultivo de juveniles de *Penaeus vannamei*, mejorando así la calidad del agua?

¿Las bacterias aisladas de ambientes eutrofizados presentan un efecto inhibitorio sobre patógenos como *V. parahaemolyticus*?

5. HIPÓTESIS

Las bacterias heterótrofas aisladas de ambientes eutrofizados, tienen la capacidad de eliminar el amonio, nitritos y nitratos en condiciones de cultivo intensivo de juveniles de *P. vannamei*, lo que conduce a una mejora en la calidad de agua. Además, se sugiera que estas bacterias, originarias de entornos eutrofizados, exhiben un efecto inhibitorio sobre patógenos como *V. parahaemolyticus*.

6. OBJETIVO GENERAL

- ✓ Analizar el efecto de bacterias heterótrofas sobre la respuesta productiva de los camarones, la mejora de la calidad de agua y el control de la bacteria patógena *V. parahemolyticus*, en un cultivo de juveniles de *P. vannamei*.

6.1. Objetivos específicos

1. Determinar *in vitro* la eficiencia en la remoción de compuestos nitrogenados de 6 cepas de bacterias heterótrofas y seleccionar las más eficientes.
2. Evaluar el efecto de las cepas seleccionadas en la remoción de amonio, nitrito y nitrato en un cultivo de juveniles de *P. vannamei*.
3. Analizar la resistencia de los camarones previamente tratados con las cepas seleccionadas frente a *V. parahaemolyticus* (*Vp_{AHPND-E9}*).

7. MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron 6 cepas previamente aisladas de dos ambientes estuarinos altamente eutrofizados, ubicados cerca de Mazatlán Sinaloa. En el Laboratorio de Estudios Camaronícolas de la Facultad Ciencias del Mar en Mazatlán, Sinaloa, México, se verificó la presencia de los genes desnitrificantes mediante la técnica de PCR punto final (Cárdenas-Canizalez y Guzmán-Hernández, 2020) (Tabla I).

Tabla I: Cepas previamente aisladas utilizadas en el bioensayo 1

Especie	Cepa
<i>Pseudomonas balearica</i>	14-ISDES1
<i>Shigella flexneri</i>	20-IRS1B
<i>Providencia sp.</i>	12A-AEDES1
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	13A-SIDES1
<i>Enterobacter huaxiensis</i>	26A-AELB1
<i>Pseudomonas sp.</i>	6-ISLB1

7.1.Determinación del efecto de las bacterias biocontrol en la calidad del agua en un ensayo *in vitro*.

7.1.1. Preparación de inóculos de bacterias de prueba.

Para los inóculos de las bacterias, se activaron las cepas seleccionadas en sus medios de cultivo en placa LB. Después de 24 horas de incubación a 35 °C; se tomaron de 2 a 3 colonias para inocularlas en el mismo medio de cultivo en caldo LB, y se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 35°C. Posteriormente, la biomasa se recolecto mediante centrifugación a 5334 xg en tubos estériles Falcón de 50 mL. La densidad óptica se ajustó a 1.0, leyendo a una longitud de onda de 540 nm para obtener una concentración de 1×10^9 UFC mL⁻¹ de acuerdo al estándar de McFarland y la fórmula: $C1V1 = C2V2$, corroborando con la cuenta

viable. A partir de la densidad 1.0 se hicieron diluciones en medio APA y se inoculó una concentración de 1×10^5 UFC mL⁻¹. (Pal *et al.*, 2015).

7.1.2. Bioensayo Calidad de agua

Con el propósito de evaluar la interacción y comportamiento de los metabolitos NO₂, NO₃ y NH₄, bajo la influencia de los microorganismos seleccionados, se llevó a cabo un bioensayo *in vitro* en tubos falcón de 50 mL con los siguientes medios desnitrificantes y nitrificantes.

Para determinar la eficiencia de la remoción del nitrito y nitrato, se transfirió 1 mL de cultivo líquido de cada cepa previamente aislada y seleccionada a una concentración de 1×10^5 UFC mL⁻¹ a 49 mL de medio desnitrificante líquido (MD) (5g NaCl, 4.72 g succinato de sodio, 0.05g NaNO₂, 1.5 g KH₂PO₄, 0.42 Na₂HPO₄, 1 g MgSO₄, 0.720g KNO₃, aforando a un litro, con un pH de 7.0 ± 0.2) (Takaya *et al.*, 2003).

Asimismo, para determinar la eficiencia en la remoción del amonio de las cepas seleccionadas, se añadió 1 mL de cultivo líquido a una concentración de 1×10^5 UFC mL⁻¹ en 49 mL de medio de nitrificación líquido (NM) (por litro: 5 g NaCl 7.0 g K₂HPO₄, 3.0 g KH₂PO₄, 0.1 g MgSO₄·7H₂O, 0.5. g (NH₄)₂SO₄, 0.05 g FeSO₄·7H₂O y 10 g CH₃COONa. pH 7.0 ± 0.2) (Pal *et al.*, 2015).

Cada tubo previamente inoculado con las cepas, se incubo a 35°C durante 72 h. Los controles consistieron en solo agregar 1 mL de agua destilada a los medios anteriores; todos los tratamientos se realizaron por triplicados. Los muestreos se realizaron a las 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 y 72 h después del inicio del experimento. Cada muestra se centrifugó a 8000 xg durante 10 min; el sobrenadante se resuspendió para medir la tasa de degradación del nitrito, nitrato y amonio.

Medición de NO₂⁻, NO₃⁻ y NH₄⁺

Para la medición de estos parámetros se utilizó el kit LYSA-NO₂ para nitritos, LYSA-NO₃ para nitratos, los cuales están basados en los métodos 4500-NO₃ y 4500-NO₂B respectivamente (Standard Methods, 2005), y LYSA-NH₄ para amonio, basado en el método del Fenato (Standard Methods, 4500-NH₃ F).

Se utilizaron 10 mL de muestra filtrada para evitar interferencia por el material suspendido, siguiendo las instrucciones del proveedor. La reacción se llevó a cabo en tubos falcón de 50 mL, para NO_2^- , NO_3^- y NH_4^+ , para posteriormente determinar la absorbancia con un espectrofotómetro Jenway 7305 a una longitud de onda de 540 nm (NO_2^- , NO_3^-) y 640 nm. (NH_4^+). La concentración de estos se calculó como se indica en las siguientes ecuaciones:

$$F = \frac{0.230 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{NO}_2}{\text{Abs prom est} - \text{Abs prom bco}}$$

$$\text{NO}_2 \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = (\text{Abs muestra} - \text{AbsBco}) * F * FD$$

$$F = \frac{0.360 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{NH}_4}{\text{Abs prom est} - \text{Abs prom bco}}$$

$$\text{NH}_4 \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = (\text{Abs muestra} - \text{AbsBco}) * F * FD$$

$$F = \frac{0.310 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{NO}_3}{\text{Abs prom est} - \text{Abs prom bco}}$$

$$\text{NO}_3 \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = (\text{Abs muestra} - \text{AbsBco}) * F * FD$$

Tabla II. Cepas bacterianas que dieron positivas a los genes *nirK*, *nirS*, *narG*, *napA* y *amoA* y el número de genes asociados al ciclo del Nitrógeno detectado por cepa.

Espece	Cepa	<i>nirK</i>	<i>nirS</i>	<i>narG</i>	<i>napA</i>	<i>amoA</i>	Origen	No genes expresados
<i>Pseudomonas balearica</i>	14- ISDES1	+	+	+	+	-	Infiernillo	4
<i>Shigella flexneri</i>	20-IRS1B	-	-	+	+	-	Infiernillo	2
<i>Providencia sp.</i>	12A- AEDES1	-	-	-	+	-	Infiernillo	1
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	13A- SIDES1	-	-	-	+	-	Infiernillo	1
<i>Enterobacter huaxiensis</i>	26A- AELB1	-	-	-	+	-	Escopama	1
<i>Pseudomonas sp.</i>	6-ISLB1	+	+	+	+	-	Escopama	1

En la Tabla II se muestran las cepas utilizadas en los análisis de calidad de agua *in vitro*, las cuales dieron positivas a los genes *nirK*, *nirS*, *narG*, *napA* y *amoA*, También se indica el número de genes asociados al ciclo del nitrógeno detectado por cepa y su zona de recolección. Las cepas con mejores resultados en la prueba *in vitro* se emplearon en el cultivo de juveniles de *P. vannamei*, estas fueron: *Pseudomonas sp.* (6-ISLB1), *Pseudomonas balearica* (14-ISDES1), *Pseudomonas stutzeri* (13A-SIDES1).

7.2. Evaluación del efecto de la adición de las cepas seleccionadas en un cultivo de juveniles de *P. vannamei*

7.2.1. Preparación de inóculos de bacterias de prueba

Para la preparación de los inóculos de las bacterias, se activaron las cepas seleccionadas en caldo TCB con una salinidad de 35 UPS como pre-inóculo. Después de 12 horas, las cepas 6-ISLB1 y 13A-SIDES1 alcanzaron una densidad óptica de 0.6, mientras que la cepa 14-ISDES1 alcanzó la misma densidad óptica a las 18 horas todas medidas a una longitud de onda de 540nm. Posteriormente, se inocularon 100µL en 30 ml de TCB. Después de las 6 horas, la cepa 6-ISLB1 alcanzó una densidad óptica de 0.885, la cepa 13A-SIDES1 alcanzó 0.728 a las 9 horas y la cepa 14-ISDES1 llegó a 0.757 a las 22 horas. Dado el diferente crecimiento observado en cada cepa, se realizó una cuenta viable en placas TCA para determinar la cantidad de bacterias presentes y ajustar la concentración de las cepas utilizadas en el bioensayo, con diluciones de 1×10^5 , 1×10^6 y 1×10^7 .

Las cepas fueron criopreservadas en caldo TCB con un 15% de glicerol a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso en el bioensayo.

7.2.2. Evaluación del efecto de la adición de las cepas seleccionadas en un cultivo de juveniles de *P. vannamei*.

Se llevó a cabo un bioensayo de 30 días en un cultivo de juveniles de *Penaeus vannamei*, en el cual se añadieron las cepas más efectivas según los resultados de la prueba *in vitro*. Estas cepas fueron *Pseudomonas* sp. (6-ISLB1), *Pseudomonas balearica* (14-ISDES1) y *Pseudomonas stutzeri* (13A-SIDES1).

Los juveniles, con una talla promedio de 8 ± 1 g, fueron mantenidos en tanques de 50 L de capacidad útil, los cuales se mantuvieron a temperatura ambiente. El agua utilizada fue de mar filtrada a $1\text{ }\mu\text{m}$ y se aseguró una aireación constante. La densidad de siembra fue de 10 juveniles por tanque, y no se realizó recambio de agua durante el experimento. Se

alimentaron con alimento comercial a una tasa del 3% de la biomasa total. A cada uno de los tratamientos se le añadieron las cepas a una concentración de 1×10^7 UFC mL⁻¹.

Los controles consistieron en no agregar ninguna de las cepas seleccionadas al cultivo. Todos los tratamientos se realizaron por cuadruplicado. Las bacterias fueron inoculadas cada 5 días. Semanalmente se determinó la supervivencia y el crecimiento mediante muestreos, y además se midió la concentración de amonio total, nitritos y nitratos cada tres días mediante espectrofotometría.

7.2.3. Cultivo de Bacterias patógenas

La cepa bacteriana patógena *Vp_{AHPND}*, utilizada para el reto bacteriano, se cultivó en medio TCB y se incubó a 30°C durante 24 horas. Se recuperó la biomasa bacteriana de cada uno de los matraces y se resuspendió en solución salina estéril al 3% de NaCl. Se determinó la densidad óptica a 580 nm utilizando un espectrofotómetro de luz visible (Jenway 7305), la cual se ajustó para alcanzar una absorbancia (ABS) de 1.0 y obtener una concentración de 1×10^9 UFC mL⁻¹. La concentración se corroboró mediante cuenta viable y, a partir de la muestra con una densidad de 1.0, se realizaron las diluciones necesarias para el reto bacteriano con juveniles de *Penaeus vannamei* contra *V. parahaemolyticus*.

7.2.4. Reto con *Vibrio parahaemolyticus*.

Para evaluar el efecto de la inclusión de las bacterias, se realizó una prueba de reto contra *Vibrio parahaemolyticus*, causante de AHPND (*Vp_{AHPND-E9}*), mediante un bioensayo de infección por inmersión, añadiendo el *Vibrio* al agua del mismo cultivo junto con los organismos previamente tratados. Los controles consistieron en tomar agua y organismos de los grupos de control donde no se les agregó ningún tratamiento adicional. Se inoculó la cepa bacteriana patógena a una concentración de 25,000 UFC mL⁻¹ a cada tratamiento y al grupo de control. Se registró la supervivencia a las 12, 24 y 48 horas después del inicio del reto. Se tomaron muestras del hepatopáncreas para extraer el ADN mediante el método CTAP, y posteriormente, se realizó qPCR para determinar la cantidad de vibrios que lograron colonizarlo después del tratamiento aplicado.

7.2.5. Extracción de ADN.

El proceso de extracción de ADN bacteriano se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se centrifugaron 1,5 mL de cultivo TSB+ a 10.000 xg durante 2 min para obtener un sedimento bacteriano. La extracción de ADN se realizó utilizando bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) siguiendo el protocolo descrito por Samarakoon *et al.* (2012) con modificaciones. Antes de iniciar la extracción, se agregó un 3% de CTAB (p/v) al buffer de lisis (NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,0), y se calentó a 60 °C hasta que el CTAB se disolvió completamente; luego se añadió 0,2% de 2-mercaptoetanol (v/v). Se agregaron 100 µL de buffer al sedimento bacteriano y se maceró con un mortero. Posteriormente se añadieron 200 µL adicionales de buffer y se incubó a 60 °C durante 10 min. Luego, se añadieron 15 µg de RNasa A (Promega, Madison, WI, EE. UU.) y se incubó a 37 °C durante 15 min. Después de esto, se añadieron 300 µL de solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezclaron y se centrifugaron a 13,000 xg durante 10 min.

El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y se agregó un volumen de isopropanol frío (-20 °C), se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, luego se centrifugó a 13,000 xg durante 8 min y se decantó el sobrenadante. El precipitado de ADN se lavó con 200 µL de etanol al 70%, se centrifugó a 13,000 xg durante 3 min, y decantó.

A continuación, el sedimento de ADN se secó y se resuspendió en 30 µL de agua ultrapura. La concentración de ADN se cuantificó en un NanoPhotometer (Pearl, Implen, Westlake Village, CA, EE. UU.). Los cocientes de absorbancia entre 1,8 y 2,0 a 260/280 nm se consideraron indicativos de calidad aceptable para las reacciones de PCR.

7.2.6. PCR en tiempo real con sonda TaqMan.

Con el propósito de determinar si los tratamientos aplicados tuvieron algún efecto frente a la posible invasión de *V_{PAHPND-E9}*, se hizo un análisis mediante la técnica de PCR en tiempo real con sonda TaqMan. Para esto, se utilizaron los ADN obtenidos previamente del hepatopáncreas (HP) como muestra.

Para crear una curva de calibración, se realizó un PCR convencional con 50 ng del ADN de *Vp_{AHPND-E9}* utilizando el método AP4, los primers (iniciadores) AP4-F1 y AP4-R1 los cuales amplifican una región de 1269 pb correspondiente a la secuencia del gen completo que codifica PirA y gran parte del gen PirB (tabla 3) (Dangtip *et al.*, 2015). El producto de PCR obtenido se visualizó en un gel de agarosa al 1% (teñido con bromuro de etidio) por 1 h y 20 min para verificar la amplificación. Posteriormente, se realizó el corte de la banda correspondiente y se procedió a la purificación utilizando un kit comercial (GENECLEAN MP Biomedicals®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se obtuvo una concentración de 14.4 ng/μL de ADN purificado, calculado a partir de la masa molecular del fragmento de 1269 pb y el número de Avogadro, para determinar el número de fragmentos por ng de ADN. A partir de esto, se realizaron las diluciones seriadas del ADN limpio desde 10⁹ a 10¹. Estas diluciones se utilizaron para las reacciones de qPCR, las cuales fueron analizadas por triplicado (Tabla 4).

Una vez obtenida la curva de calibración de *Vp_{AHPND-E9}*, se procedió a realizar un qPCR TaqMan con las muestras de ADN del hepatopáncreas a una concentración de 20 ng μL⁻¹ (Tabla 4). La expresión relativa se midió utilizando un termociclador de PCR en tiempo real CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.).

La cuantificación de *Vp_{AHPND-E9}* se llevó a cabo mediante la extrapolación del logaritmo natural del crecimiento de la curva de cada muestra hacia una curva estándar construida con un amplicón de cantidades conocidas (7.19 x10⁸ copias ng⁻¹ ADN) de acuerdo a la metodología reportada por Whelan *et al.* (2003).

Tabla III. Mezcla de reactivos para PCR convencional con AP4

Reactivos*	μL
Buffer 10X mix	2.5
MgCl ₂ 50mM	1.5
dNTPS 10mM	0.5
AP4-F1 10 μM	0.5
AP4-R1 10 μM	0.5
Taq DNApol 5U/ μL	0.3
ADN 50 ng/μL	2.0
Agua up	17.2

*Reactivos invitrogen®

Tabla IV. Mezcla de reactivos para curva de calibración de $V_{PAHPND-E9}$

Reactivos*	μL
Buffer 10X mix	1.5
MgCl ₂ 50mM	0.75
dNTPS 10mM	0.3
AP4-F1 10 μM	0.5
AP4-R1 10 μM	0.5
Sonda TaqMan 2 μM	1.0
Taq DNApol 5U/ μL	0.1
ADN 50 ng/μL	5.0
Agua up	5.35

*Reactivos Invitrogen®

8. Análisis estadísticos.

Los resultados se reportados como media \pm desviación estándar. Los porcentajes de supervivencia obtenidos se transformaron a raíz de arcoseno. Se verificaron los supuestos estadísticos de normalidad de Shapiro Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Barlett, previo al análisis de varianza de medidas repetidas de una vía (ONE WAY RM ANOVA). Para determinar diferencias entre grupos de camarones en cultivo con respecto a su respuesta productiva se realizó una comparación de medias mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey HSD ($P < 0.05$). Para el reto se llevó a cabo el mismo análisis estadístico ANOVA de una vía de medidas repetidas (RM ANOVA). Para evaluar, la tasa de degradación de nitrito-N y amonio, se realizaron las pruebas de rango múltiple de Duncan. Todos los análisis consideraron un nivel de significancia de $P < 0.05$. Los análisis estadísticos fueron realizados usando Sigmaplot 11.0 y JMP Trial 14.

9. RESULTADOS.

9.1. Bioensayo 1. Calidad de agua de manera *in vitro*.

Durante el desarrollo del experimento, la concentración de amonio en los tratamientos con las diferentes cepas fue significativamente menor en comparación con el control ($P < 0.05$) hasta las 72 horas. La concentración inicial de amonio que fue de $146 \pm 3.07 \text{ mg L}^{-1}$, mostro una tendencia a disminuir en todos los tratamientos. La cepa *Pseudomonas stutzeri* 13A-SIDES1 provocó una disminución mayor que las demás cepas, logrando remover $114 \pm 0.84 \text{ mg L}^{-1}$ de amonio total en 72 h., lo que represente alrededor del 78% de remoción. En segundo lugar, se encontró la cepa *Providencia* sp (12A-AEDES1) con una remoción de 90 mg L^{-1} del amonio, lo que equivale a aproximadamente el 68%. Se observaron diferencias significativas entre ellas ($t=10.237$, $P < 0.001$).

No se observaron diferencias significativas entre las cepas *Pseudomonas* sp (6-ISLB1) y *Pseudomonas balearica* (14-ISDES1) ($t= 2.104$, $P= 0.075$) ya que ambas removieron $70 \pm 3.87 \text{ mg L}^{-1}$ y $65 \pm 2.62 \text{ mg L}^{-1}$ de amonio respectivamente, con un porcentaje de remoción del 50% en 72 h. Del mismo modo, las cepas *Enterobacter huaxiensis* (26A-AELB1) y *Shigella flexneri* (20-IRS1B) tampoco mostraron diferencias significativas entre si al remover $54 \pm 0.80 \text{ mg L}^{-1}$ y $55 \pm 0.48 \text{ mg L}^{-1}$ respectivamente, lo que representa el 38% del amonio en 72 h ($t=.234$, $P=0.816$) (Figura 1).

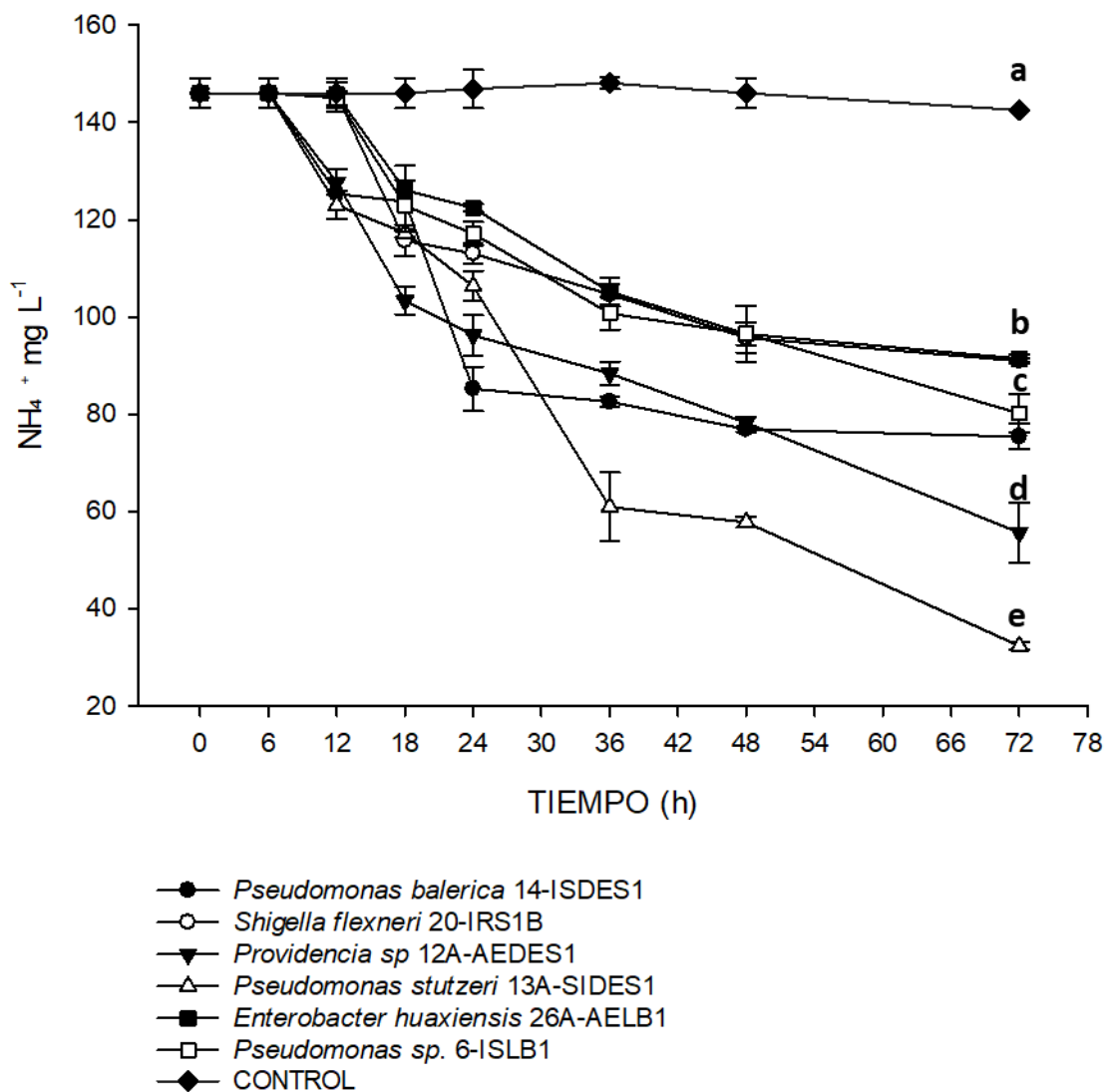


Figura 1. Concentración de amonio con 6 tratamientos y un control en un periodo de 72 horas. Las cepas utilizadas fueron ●14-ISDES1, ○20-IRS1B, ▼12A-AEDES1, △13A-SIDES1, ■26A-ELB1 □6-ISLB1. (media ± desviación estándar) Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamiento (F=75.415, P<0.001).

Las concentraciones de nitrato en el agua fueron significativamente menores en todos los tratamientos en comparación con el control ($P < 0.05$) hasta las 72 horas (Fig. 2). La concentración inicial de nitrato que fue de $469.945 \pm 6.68 \text{ mg L}^{-1}$, mostro una tendencia a disminuir en todos los tratamientos. Las cepas *Pseudomonas stutzeri* 13A-SIDES1, *Pseudomonas balearica* 14-ISDES1 y *Pseudomonas sp* 6-ISLB1 removieron el 100% de la concentración en 24 horas. Las cepas *Shigella flexneri* 20-IRS1B y *Enterobacter huaxiensis* 26A-AELB1 removieron también el 100%, pero en 36 horas. La cepa *Providencia sp* 12A-AEDES1 mostro una diferencia significativa a las 72 horas en comparación con los tratamientos anteriores ($t=50.356$ $P < 0.001$), removiendo $203.0 \pm 7.51 \text{ mg L}^{-1}$, es decir, el 43%.

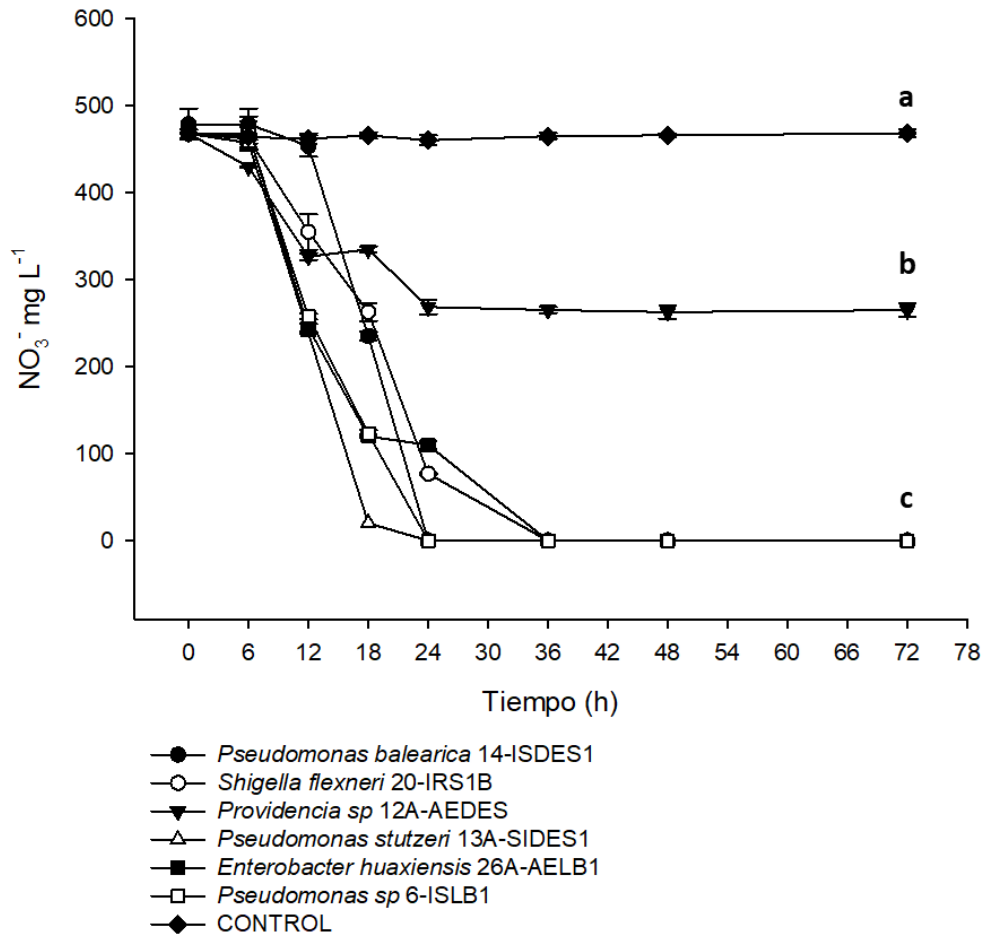


Figura 2. Concentración de nitratos con 6 tratamientos y un control en un periodo de 72 horas. Las cepas utilizadas fueron ●14-ISDES1, ○20-IRS1B, ▼12A-AEDES1, △13A-SIDES1, ■26A-ELB1 □6-ISLB1. (media ± desviación estándar). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamiento (F=602.857 P<0.001).

Las concentraciones de nitritos en todas las cepas fueron significativamente menores con respecto al control ($P < 0.05$), disminuyendo en el tiempo a partir del valor inicial de $344.80 \pm 4.97 \text{ mg L}^{-1}$. Las cepas *Pseudomonas stutzeri* 13A-SIDES1 y *Pseudomonas* sp 6-ISLB1 removieron el 100% de la concentración a las 48 h, mientras que las cepas *Pseudomonas balearica* 14-ISDES1 y *Shigella flexneri* 20-IRS1B lo hicieron a las 72 h. Por otro lado, la cepa *Providencia* sp. 12A-AEDES1 solo removió $145.33 \pm 7.56 \text{ mg L}^{-1}$ nitritos, lo que representa el 43 % en 72 h y la cepa *Enterobacter huaxiensis* 26A-AELB1 solo removió el $126.26 \pm 0.57 \text{ mg L}^{-1}$, equivalente al 37% de los nitritos. No se observaron diferencias significativas ($t=2.637$, $P=0.067$) entre ellos al finalizar el experimento (figura 3).

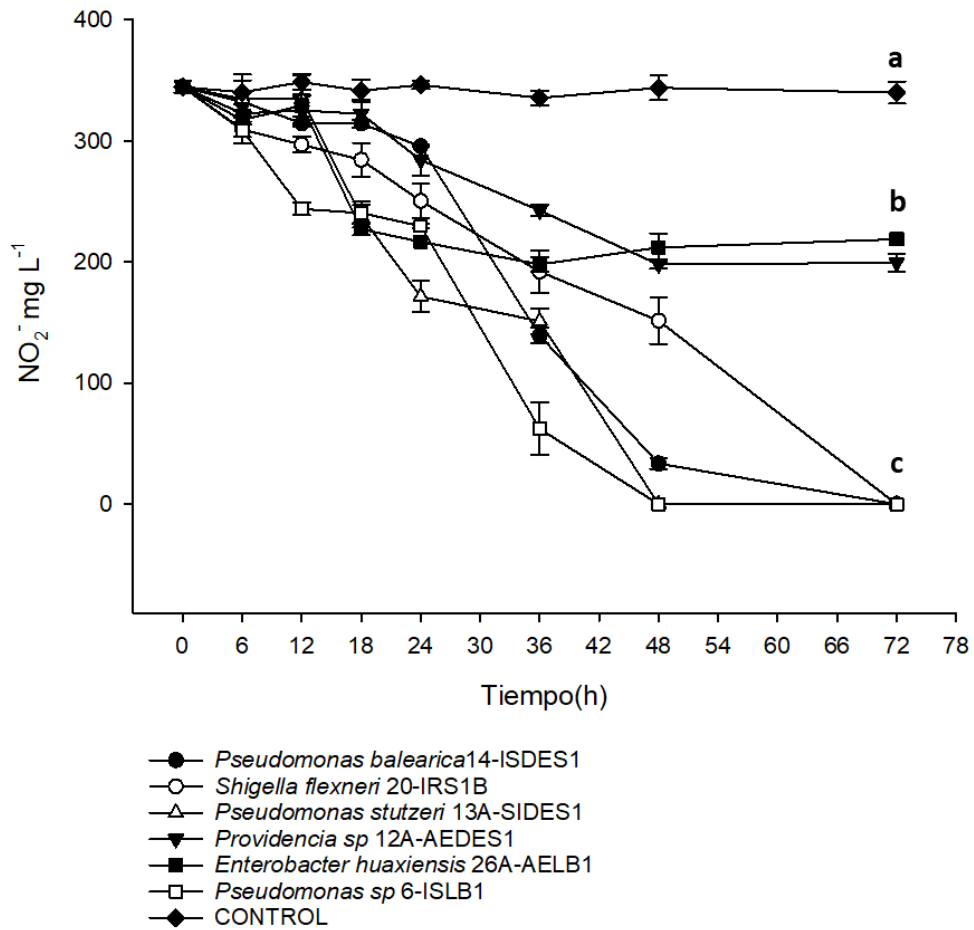


Figura 3. Concentración de nitritos con 6 tratamientos y un control en un periodo de 72 horas. Las cepas utilizadas fueron ●14-ISDES1, ○20-IRS1B, ▼12A-AEDES1, △13A-SIDES1, ■26A-ELB1 □6-ISLB1. (media \pm desviación estándar). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamiento (F= 154.246, P<0.001).

9.2. Bioensayo 2 Evaluación del efecto de la adición de las cepas seleccionadas sobre la respuesta productiva en un cultivo de juveniles de *P. vannamei*.

Después de los 30 días de experimento, se observó una supervivencia del 90% para la cepa *Pseudomonas* sp. 6-ISLB1, un 92.5% para las cepas *Pseudomonas stutzeri* 13A-SIDES1 y *Pseudomonas balearica* 14-ISDES1, sin diferencias significativas entre ellos ($t=1.028$ $P=0.675$; $t=0.828$, $P=0.657$; $t=.200$, $P=0.843$), mientras que en el control se registró una supervivencia del 57.5%, significativamente más baja en comparación con los tratamientos ($t=3.732$; $P=0.005$; $t=2.904$, $P=0.034$; $t=2.704$, $P=0.044$). (figura 4).

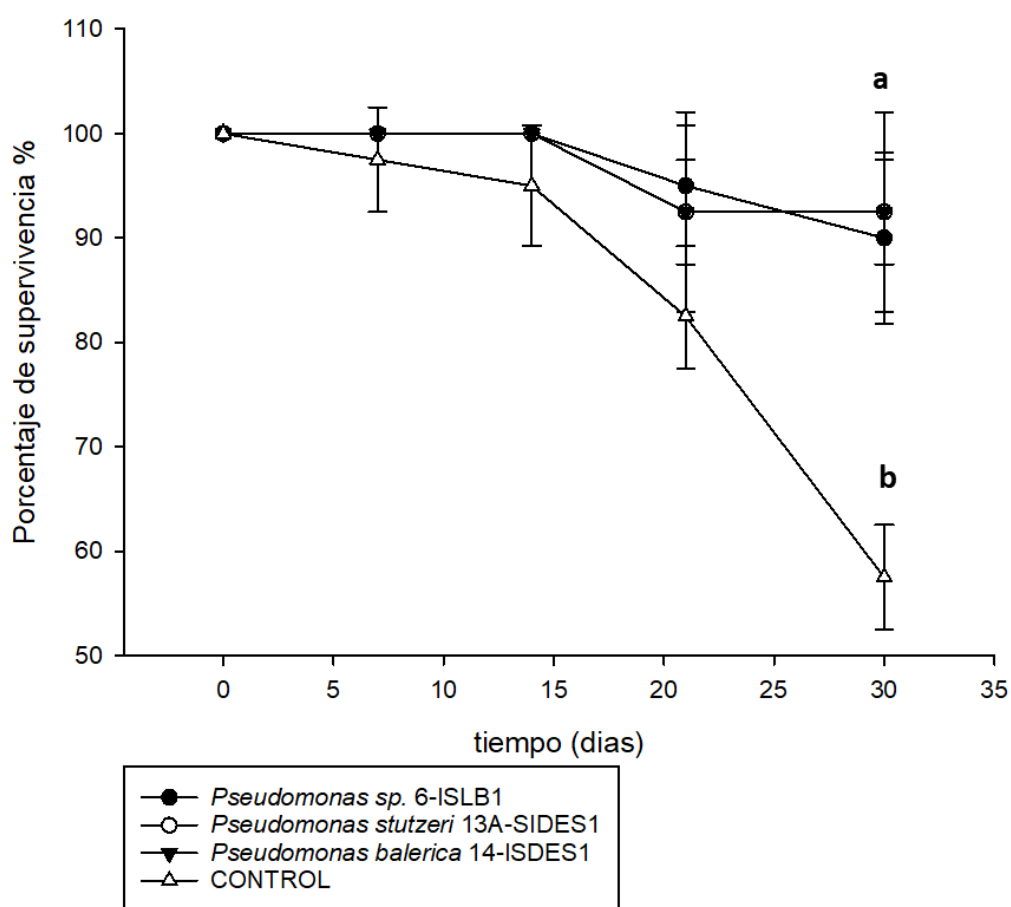


Figura 4. Porcentaje de supervivencia (%) con 3 tratamiento y un control en un periodo de 30 días. Las cepas utilizadas fueron. ▼14-ISDES1, ○13A-SIDES1, ●6-ISLB1. (media \pm desviación estándar) Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamiento.

Durante todo el experimento, no se registraron diferencias significativas en el crecimiento del camarón entre los tratamientos y tampoco con el control, iniciando con un peso promedio individual de 8.089 ± 0.519 y finalizando con 10.174 ± 0.293 ($t = 0.532$ $P = 0.974$) (figura 5).

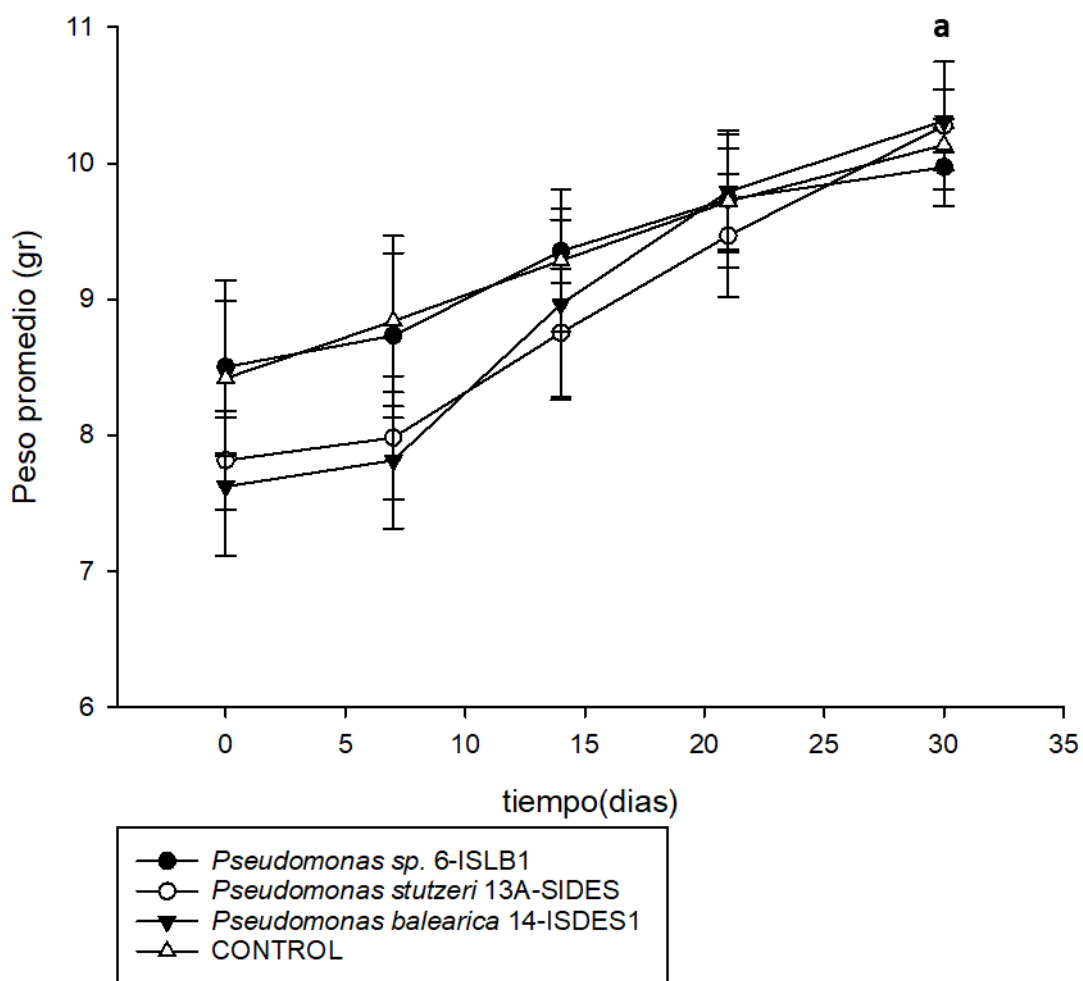


Figura 5 Peso promedio de los camarones (gr) con los 3 tratamiento y un control en un periodo de 30 días. Las cepas utilizadas fueron. ▼14-ISDES1, ○13A-SIDES1, ●6-ISLB1. (media \pm desviación estándar). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($F = 3.695$ $P = 0.050$).

Durante el experimento, se observaron diferencias significativas en los valores de calidad de agua especialmente en la relación con la concentración de nitratos. Estas diferencias se mantuvieron hasta los 30 días de estudio, partiendo de una concentración inicial promedio de $1.234 \pm 0.1248 \text{ mg L}^{-1}$. En el día 10, se registró un aumento notable en las concentraciones de nitratos en los tratamientos con las cepas *Pseudomonas stutzeri* 13A-SIDES1 y *Pseudomonas balearica* 14-ISDES1, alcanzando valores de 2.991 ± 0.1069 y $2.882 \pm 0.0619 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre estas cepas ($t = 0.944$, $P = 0.351$). Hasta el día 20, las concentraciones de nitratos en los tratamientos experimentales disminuyeron, a diferencia del grupo de control, donde se observó un aumento significativo ($t = 3.997$, $P < 0.001$) (Figura 6).

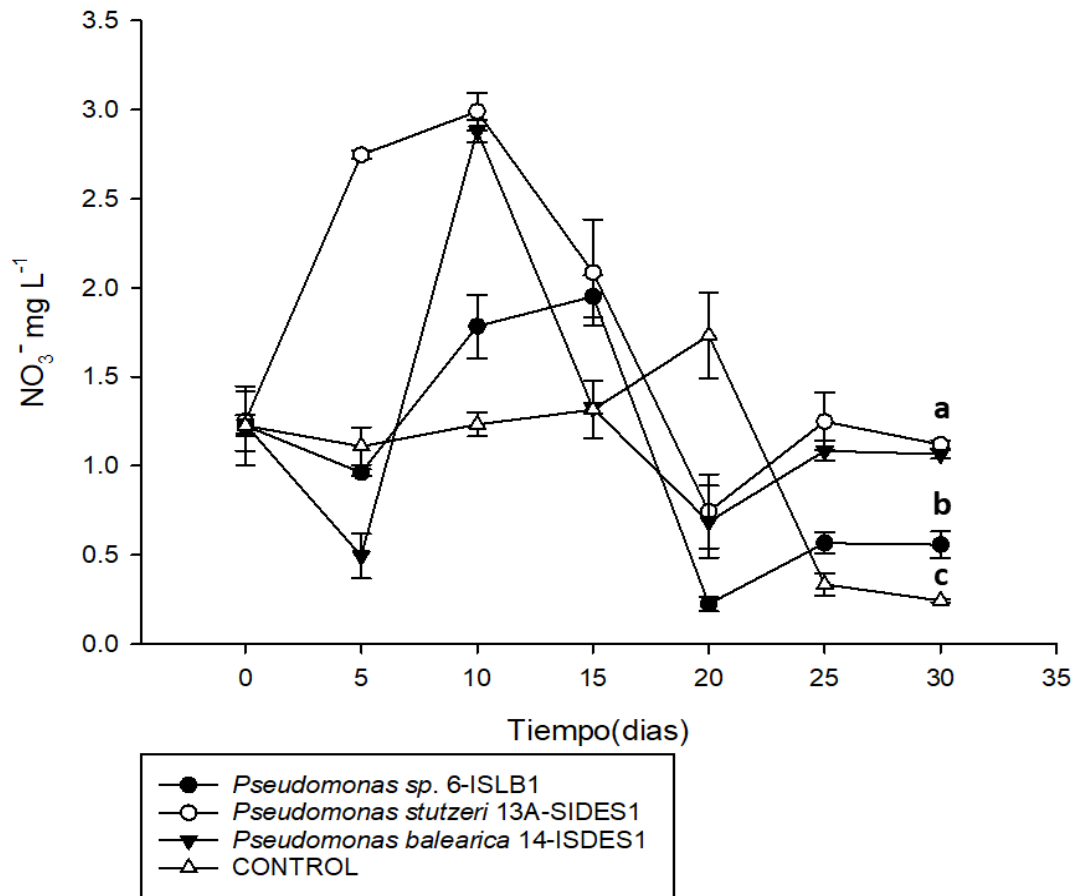


Figura 6: Concentración de nitratos con 3 tratamientos y un control en un periodo de 30 días. Las cepas utilizadas fueron. ▼14-ISDES1, ○13A-SIDES1, ●6-ISLB1. (media ± desviación estándar). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (F=44.616 P<0.001).

En el caso de los niveles de nitrito se observaron diferencias significativas entre todos los tratamientos y el grupo de control ($P < 0.05$) al finalizar los 30 días de experimento ($t = 7.577$ $P < 0.001$). Al inicio del experimento, la concentración promedio de nitrito fue de 0.1343 ± 0.0223 mg L⁻¹ NO₂. Durante los días 5, 10 y 15, las concentraciones en el grupo de control se mantuvieron constantes sin aumentar, lo que difirió significativamente de los tratamientos donde se registró un incremento en los niveles de nitrito ($t = 15.432$, $P < 0.001$). En los días siguientes las concentraciones de nitrito en el grupo del control aumentaron más que en los tratamientos manteniendo diferencias significativas hasta la finalización del experimento ($t = 7.577$ $P < 0.001$). (Figura 7).

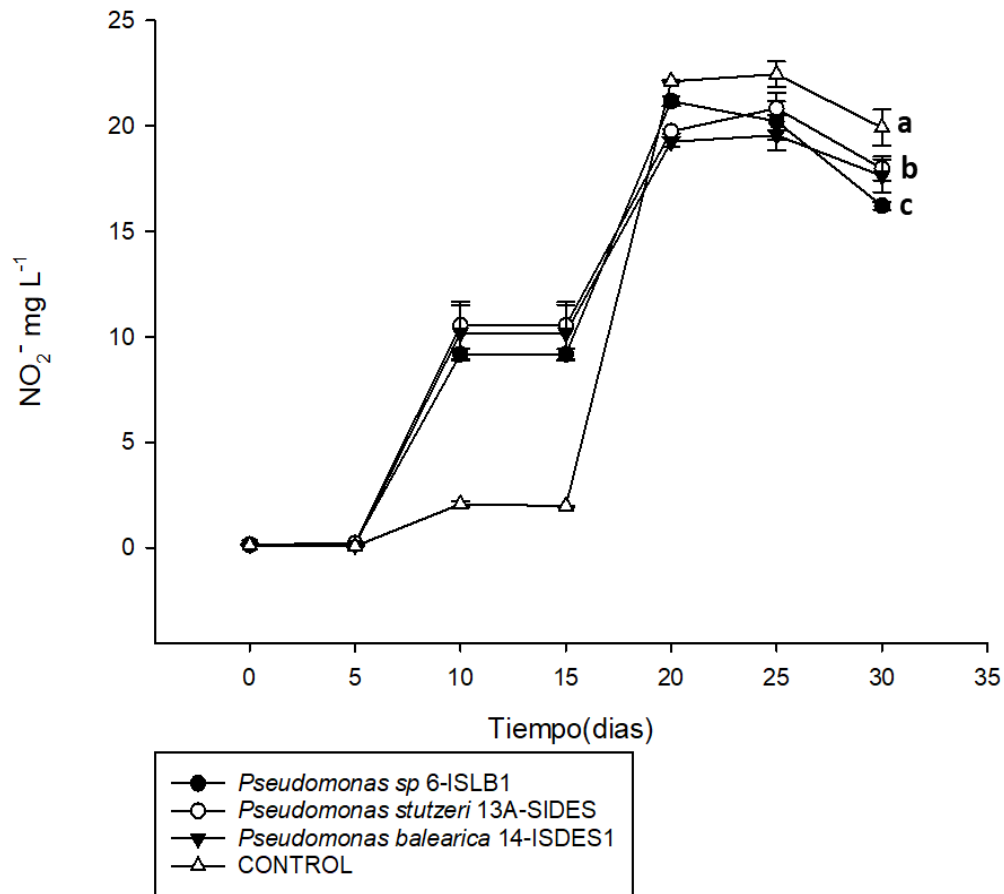


Figura 7: Concentración de nitritos con 3 tratamientos y un control en un periodo de 30 días. Las cepas utilizadas fueron. ▼ 14-ISDES1, ○ 13A-SIDES1, ● 6-ISLB1. (media \pm desviación estándar). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (F=40.694, P<0.001).

En cuanto las concentraciones de amonio, todas las cepas mostraron diferencias significativas con respecto al control al finalizar el experimento, iniciando con una concentración de $0.1840 \pm 0.0057 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_3$. En el día 15 del experimento, las concentraciones aumentaron en todos los tratamientos, así como en el control. Las cepas *Pseudomonas stutzeri* 13A-SIDES1, *Pseudomonas* sp 6-ISLB1 y *Pseudomonas balearica* 14-ISDES1, mostraron diferencias significativas con respecto al control ($t= 19.045$, $P<0.001$; $t= 5.942$, $P<0.001$; $t=11.962$, $P<0.001$), registrando una menor concentración.

Para el día 20, las concentraciones en el control se elevaron en comparación con los tratamientos, donde disminuyeron significativamente ($t= 25.458$, $P<0.001$; $t= 25.340$, $P<0.001$; $t= 25.065$, $P<0.001$). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en este día ($t=0.393$, $P=0.972$; $t=0.275$ $P=0.954$; $t=0.118$ $P=0.907$).

Después del día 20 y hasta la conclusión del experimento en el día 30, las concentraciones de amonio en los tratamientos no mostraron aumentos significativos, a diferencia del grupo de control, donde se observó un incremento en el día 25. Esto se reflejó con diferencias significativas entre los tratamientos y el control, que mantuvo sus niveles elevados durante todo el período restante del estudio ($t=15.188$, $P<0.001$; $t=14.165$, $P<0.001$; $t=13.851$, $P<0.001$). Además, no se encontraron diferencias significativas al comparar los tratamientos entre sí durante este período ($t=1.338$, $P=0.465$; $t=1.023$, $P=0.527$; $t=0.315$, $P=0.755$) (ver Figura 8).

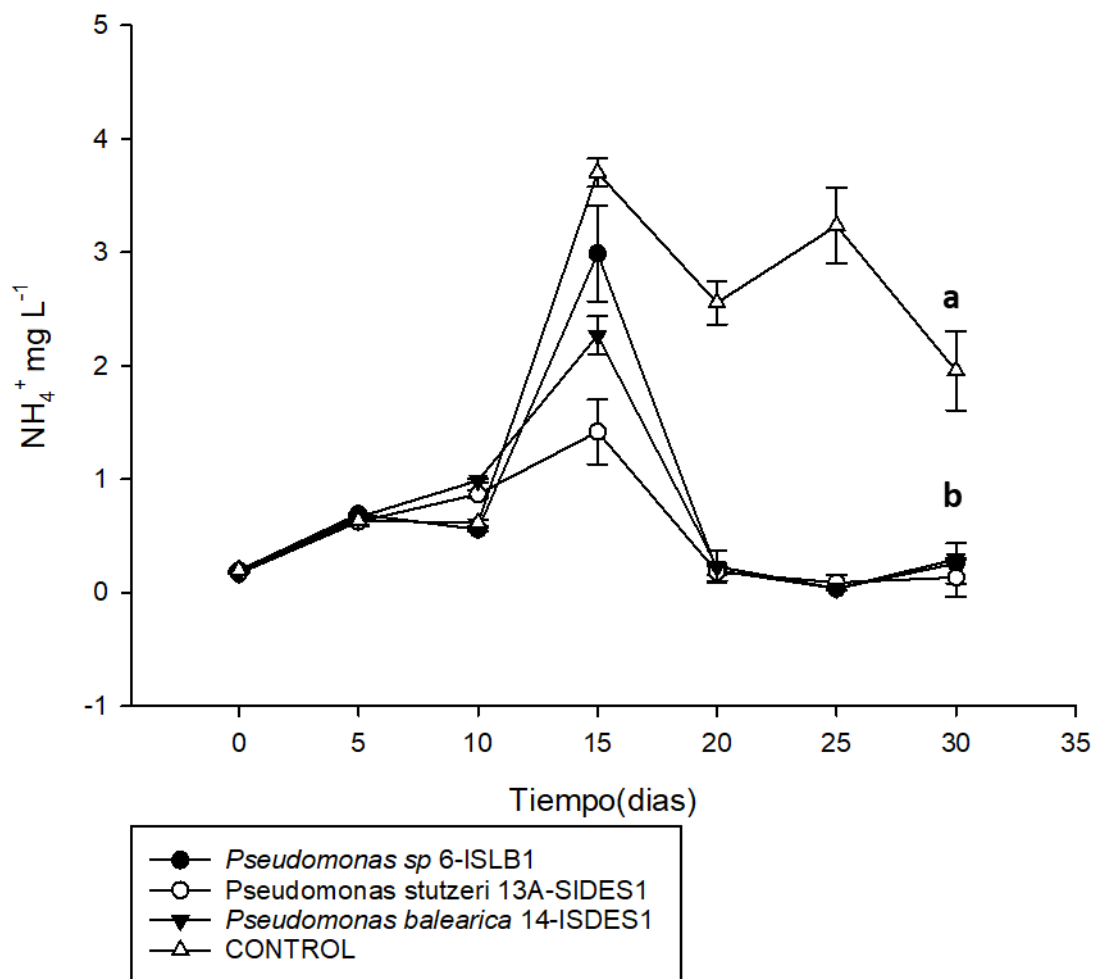


Figura 8: Concentración de amonio con 3 tratamientos y un control en un periodo de 30 días. Las cepas utilizadas fueron. ▼14-ISDES1, ○13A-SIDES1, ●6-ISLB1. (media \pm desviación estándar). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (F= 64.410, P<0.001).

9.3. Bioensayo III Reto con *Vibrio parahaemolyticus*.

Al finalizar las 48 h del reto, se encontraron 3 organismos muertos en el grupo control mientras que en los tratamientos no se observó ninguna mortalidad.

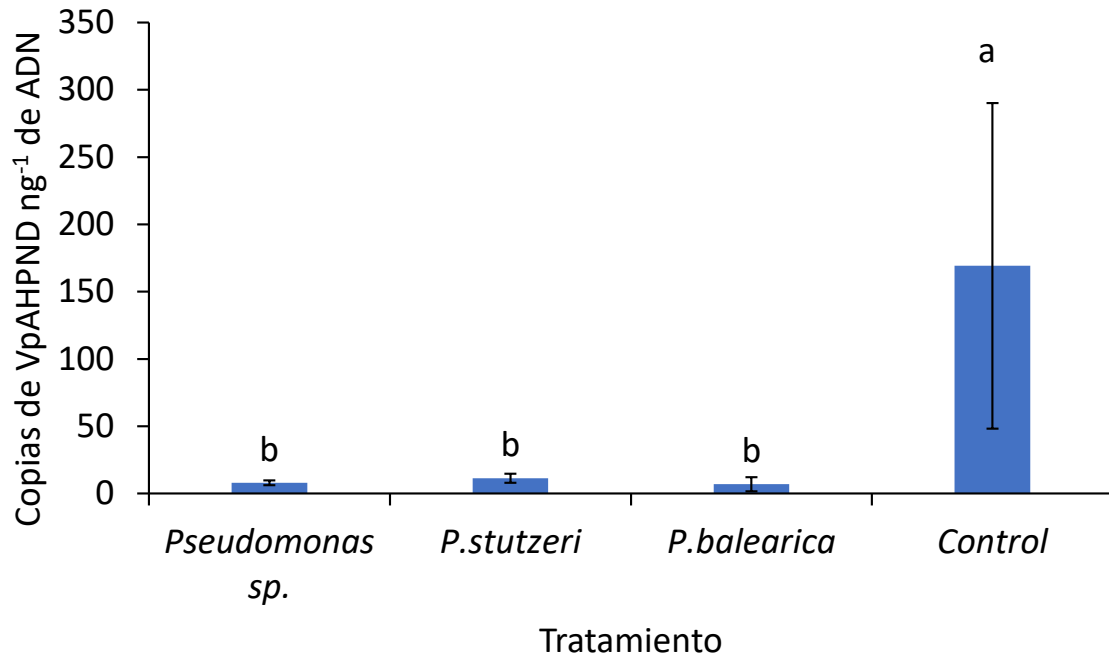


Figura 9. Cuantificación del amplicón PirA en *Vp_{AHPND-E9}* durante la cinética de crecimiento bajo diferentes tratamientos. Las diferencias significativas entre tratamientos para cada momento de muestreo se indican con letras diferentes. La significancia estadística se calculó mediante ANOVA de una vía ($F=8.754$ $p < 0,05$). Las barras de error representan la desviación estándar de la media.

En el tratamiento *Pseudomonas* sp **6-ISLB1** se observó un promedio de 8.03 ± 1.85 de número de copias de V_{pAHPND} ng⁻¹ de ADN; para la cepa *Pseudomonas stutzeri* **13ASIDES1** hubo un promedio de 11.41 ± 3.40 número de copias de V_{pAHPND} ng⁻¹ de ADN y para la cepa *Pseudomonas balearica* **14ISDES1** se observó un promedio de 6.96 ± 5.22 número de copias de V_{pAHPND} ng⁻¹ de ADN. En el caso del control, el promedio del número de copias de V_{pAHPND} ng⁻¹ de ADN fue de 169.25 ± 120.95 .

No se encontraron diferencias significativas en el número de copias de V_{pAHPND} ng⁻¹ de ADN entre los tratamientos al compararlos entre sí (*Pseudomonas stutzeri* vs *Pseudomonas balearica*, $t=0.116$, $P=0.999$; *Pseudomonas stutzeri* vs *Pseudomonas* sp, $t=0.879$, $P=0.995$; *Pseudomonas* sp vs *Pseudomonas balearica*, $t=0.0278$, $P=0.978$). Sin embargo, al comparar cada tratamiento con el control, se encontraron diferencias significativas (Control vs *Pseudomonas balearica*, $t=4.231$, $P=0.007$; Control vs *Pseudomonas* sp, $t=4.203$, $P=0.006$; Control vs *Pseudomonas stutzeri*, $t=4.115$, $P=0.006$) (Figura 9).

10. DISCUSIÓN

10.1. Bioensayo 1. Calidad de agua de manera *in vitro*

Para avanzar hacia una acuicultura sostenible a través de la biorremediación, es necesario usar microorganismos capaces de remover especies tóxicas de nitrógeno para mejorar la calidad del agua (Song *et al.*, 2011). Un ejemplo destacado es el uso de bacterias desnitrificantes aeróbicas, ya que algunas cepas tienen capacidad de convertir el amonio en nitrógeno gaseoso en condiciones aeróbicas, lo que representa una ventaja sobre los métodos convencionales de eliminación de amonio (Robertson *et al.* 1989).

Las cepas utilizadas en este estudio poseen los genes que codifican las enzimas responsables de los procesos de desnitrificación, como la nitrito reductasa y la nitrato reductasa. Estas cepas, identificadas como *Pseudomonas balearica* (14-ISDES1), *Shigella flexneri* (20-IRS1B), *Providencia* sp. (12A-AEDES1), *Pseudomonas stutzeri* (13A-SIDES1), *Enterobacter huaxiensis* (26A-AELB1), *Pseudomonas* sp. (6-ISLB1) (Cárdenas-Canizalez y Guzmán-Hernández, 2020), fueron aisladas del Estero del Infiernillo. Este estero se caracteriza por ser un sistema altamente eutrofizado debido a la contaminación antropogénica, lo que mantiene activo los mecanismos de reciclaje de nitrógeno orgánico disponibles (Flores-Mireles, 2005).

El aislamiento de estas cepas autóctonas es de gran importancia, ya que, por su origen, se espera que tengan una excelente capacidad para eliminar nitrógeno y una amplia adaptación a la salinidad, lo que las hace ideales para su uso en entornos acuícolas.

Una de las bacterias heterótrofas más estudiadas por su actividad desnitrificante en la remoción de amonio es *Pseudomonas stutzeri*, la cual se encuentra comúnmente en suelos y aguas contaminadas (Sacca, 2014). Silva *et al.* (2020) observaron que esta bacteria removía hasta el 57.2% de amonio a las 24 horas y el 100% a las 48 horas. En nuestro estudio, la máxima remoción (78%), con esta especie de bacteria fue a las 72 horas. Esto posiblemente se debió a la diferencia de las cantidades iniciales de $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ que se utilizó en el medio nitrificante, que fue de 0.66 g en el estudio mencionado, mientras que en el presente trabajo

se utilizó 500 mg L^{-1} . Otra posible causa fue el uso de diferente fuente de carbono, ya que en el presente trabajo se usó acetato de sodio mientras que Silva *et al.* (2020) utilizaron piruvato de sodio. En general, la eficiencia de eliminación de nitrito, nitrato y amonio está fuertemente relacionado con el contenido y fuente de carbono ya que este sirve como donante de electrones y proporciona energía para las bacterias (Ruan *et al.*, 2020). La mayoría de los organismos que tienen esta capacidad de remoción, tienen preferencia por fuentes de carbono directamente relacionadas con el ciclo de ácidos tricarbónicos como el succinato, el acetato y el citrato, (Chen *et al.*, 2012). Es posible que en futuros proyectos sea necesario analizar diferentes fuentes de carbono para tener una información más viable sobre estas cepas.

Li *et al.* (2021) aislaron y evaluaron *Pseudomonas stutzeri* ADP-19, observando una degradación del 96.5 % de amonio (NH_4Cl) en 24 horas, comenzando con una concentración de 100 mg L^{-1} . En contraste, en nuestro estudio, iniciamos con una concentración de $146 \pm 3.07 \text{ mg L}^{-1}$ y logramos una remoción máxima del 78% a las 72 h. *Pseudomonas stutzeri* SDU10 ha sido utilizado para el tratamiento de agua residuales, logrando una disminución del 78.5% de nitrato en el agua a partir de una concentración inicial de 100 mg L^{-1} en 32 h (Chen *et al.*, 2020). Según la literatura, estos microorganismos utilizan aproximadamente el 40% del amonio removido para la producción de biomasa, mientras que el 60% se transforma en nitrógeno gaseoso (Jin *et al.*, 2015, Chen *et al.* 2012., Ren *et al.*, 2014). Dado que estas bacterias no utilizan el amonio como fuente de electrones para la producción de energía, suponemos que este compuesto es tóxico para ellas y su remoción ocurre como un mecanismo de desintoxicación del medio. (Silva *et al.*, 2020).

La cepa de *Pseudomonas stutzeri* utilizada en el nuestro estudio resultó muy efectiva para la remoción de nitratos, ya que comenzamos con una concentración de $469.95 \pm 6.68 \text{ mg L}^{-1}$ eliminando el 100 % del nitrato en 24 h.

En relación a la remoción de nitritos, Chen *et al.* (2020) utilizaron esta misma cepa, observando una remoción del 97.9% en 24 h a partir de una concentración inicial de 100 mg L^{-1} , siendo indetectable la presencia de nitritos después de este tiempo. En nuestro caso, la remoción fue del 100 % después de las 36 h con una concentración inicial de $344.80 \pm 4.97 \text{ mg L}^{-1}$.

Ye *et al.* (2016) utilizaron la cepa *Providencia rettgeri* (YL) para remover el amonio total a una temperatura de 25°C y un pH de 8.0, observando una remoción del 79% en 48 horas, en contraste, en nuestros resultados, la cepa *Providencia* sp. (12A-AEDES1) removió el 68% del amonio, pero a un pH constante de 7.0 y una temperatura de 35°C. Esto posiblemente pudo afectar el crecimiento bacteriano, ya que la temperatura y el pH son variables importantes que afectan el crecimiento bacteriano y la eficiencia de remoción del amonio.

La cepa *Enterobacter huaxiensis* utilizada en nuestro experimento *in vitro* resultó muy efectiva, removiendo el 100% de nitratos en el agua a las 36 horas, a diferencia de lo que sucedió con los nitritos, ya que esta cepa solo removió el 37%. Datos similares fueron obtenidos por Zhang *et al.* (2019), quienes aislaron dos cepas identificadas como *Enterobacter huaxiensis* (Z1) y *Klebsiella* sp. (Z2), obteniendo buenos resultados en la remoción de compuestos nitrogenados. Por ejemplo, el nitrato se eliminó completamente después de 12 horas a partir de una concentración inicial de 78 mg L⁻¹. En cuanto al nitrito, estas cepas lograron una remoción del 67% en 60 horas de experimento iniciando a una concentración de 82 mg L⁻¹ es decir, removieron 55 mg L⁻¹.

Otra especie de gran importancia y con potencial para desnitrificación aeróbica en la acuicultura es la bacteria *Pseudomonas balearica* (Yunjie-Ruan *et al.*, 2020). En el presente estudio, la cepa 14-ISDES1 de *Pseudomonas balearica* tuvo una remoción del 100% del nitrato en 24 horas. Yunjie-Ruan *et al.* (2020) informaron que la especie *Pseudomonas balearica* cepa RAD-17, es portadora del gen nitrato reductasa y también mostro un alto rendimiento en la desnitrificación aeróbica, con una reducción de nitratos de 99.02% en 8 horas, comenzando con una concentración de 301.43 ± 1.06 mg L⁻¹. En nuestro estudio, la concentración de nitrato fue mayor (479.16 ± 18.1), lo que resultó en una mayor duración para la remoción del nitrato por parte de la cepa.

En cuanto al nitrito, en nuestro trabajo la cepa *Pseudomonas balearica* removió el 100% en 72 h. Resultados similares fueron obtenidos por Yunjie-Ruan *et al.* (2020), quienes observaron una remoción del 99% en 36 horas, utilizando concentraciones similares a las de nuestro estudio.

Respecto al amonio, la cepa *Pseudomonas balearica*, removió 63.4 ± 1.04 mg L⁻¹ en 36 h, comenzando con una concentración de 146 ± 3.07 mg L⁻¹, mientras que en el estudio de Yunjie-Ruan *et al.* (2020), su cepa removió el 100% del amonio a partir de una concentración de 77.73 ± 2.35 mg L⁻¹ en 32 horas. La literatura indica que el aumento de la concentración de amonio en el medio afecta directamente su eliminación, lo que sugiere que la eficiencia de remoción de cada cepa depende de la dosis inicial de amonio, considerando también que diferentes microorganismos responden de manera única a diversos factores físico-químicos (Silva *et al.*, 2020; Lei *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2012; Duan *et al.*, 2015).

En nuestro estudio, al iniciar con una concentración 146 ± 3.07 mg L⁻¹, nuestra cepa ya había removido 63.4 ± 1.04 de amonio a las 36 horas. Si consideramos la concentración inicial utilizada por Yunjie-Ruan *et al.* (2020), nuestra cepa hubiera removido el 85%.

10.2. Bioensayo II Evaluación del efecto de la adición de las cepas seleccionadas en un cultivo de juveniles de *P. vannamei*

No observaron diferencias significativas en el peso promedio de los organismos entre los tratamientos y el control. Sin embargo, se registraron diferencias significativas en la supervivencia ya que el control mostró una menor supervivencia que los tratamientos en los 30 días de experimento. Datos similares fueron obtenidos por Dou *et al.* (2021) al utilizar las cepas *Vibrio* sp. AB15 y *Pseudomonas fluorescens* cepa NB14 en un sistema de biofloc, donde no se observaron diferencias significativas ni en el peso ni en la supervivencia entre el control y los tratamientos en un experimento de 21 días. En nuestro estudio, tampoco se observaron diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia entre los tratamientos y el control a los 21 días.

En cuanto la capacidad de degradación de amonio y nitrito, Dou *et al.* (2021) indicaron que estas dos cepas, a concentraciones límite de 1×10^5 y 1×10^8 UFC mL⁻¹, podrían ser aplicados en estanques de cultivo de camarón para degradar el amonio y nitrito, siendo inofensivos para el camarón blanco. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en nuestro estudio, donde utilizando tres cepas diferentes de *Pseudomonas* a una concentración de 1×10^7 UFC mL⁻¹ por tratamiento, observamos que degradaban eficientemente el amonio en un cultivo de

camarón, sin afectar el crecimiento ni la supervivencia de este, y siendo inofensivas para el camarón.

Su *et al.* (2021), al utilizar la cepa *Pseudomonas* sp. GZWN4 en un cultivo de camarón *P. vannamei* a una densidad de 1×10^5 y 1×10^6 UFC mL⁻¹ proporcionadas cada tres días, observaron que no hubo diferencias significativas en el peso final, en el peso ganado ni en la supervivencia con respecto al control a los 14 días. Resultados similares fueron obtenidos en nuestro trabajo, donde con una concentración de 1×10^7 UFC mL⁻¹ y con una aplicación de los tratamientos cada 5 días, no se observaron diferencias significativas en el peso ni en la supervivencia con respecto al control a los 14 días.

En cuanto a la eficiencia para degradar los compuestos nitrogenados, en el estudio de Su *et al.* (2021) observaron que la cepa tiene una excelente capacidad de eliminación de nitrógeno en un cultivo real, y, además, para adaptarse en un entorno de cultivo. Cuando se evaluó la eficiencia de la cepa en agua con las tres fuentes de nitrógeno (NO₂, NO₃, NH₄), observaron que cuando disminuye el amonio, aumentan los nitratos y nitritos. Las bacterias tuvieron mayor eficiencia cuando la relación carbono nitrógeno fue de 10 o más, eliminando muy bien el NO₂. Los datos fueron similares a los del presente estudio, ya que nuestros tres tratamientos tuvieron alta eficiencia en la eliminación de amonio comparados con el control, en el que el amonio se mantuvo alto después del día 15. Esto indica que estas cepas tienen una alta eficiencia de eliminación después de los 15 días de cultivo manteniendo las concentraciones de amonio bajas.

En el caso del nitrato, como lo explican diversos autores, cuando la fuente de nutriente prioritaria es el amonio, las bacterias lo transforman a nitrato acumulándose en el agua (Ruan *et al* 2020, Su *et al.*, 2021). Esto tiene sentido, ya que en nuestro experimento se registró un aumento de nitrato después de los 15 días, manteniéndolo más alto que el control. Respecto al nitrito, se observaron algunas diferencias significativas con el control, aunque fueron mínimas al finalizar el experimento ya que como menciona Su *et al.* (2021), la relación C/N debe ser mayor a 10, ya que si es 0-5, la eficiencia de degradación de nitrito de este tipo de bacterias es muy pobre. Otra razón por la que esto pudo pasar, es que las bacterias dieron prioridad a la utilización de amonio por ser la primera fuente de nitrógeno en el agua.

Además, según la literatura, algunas cepas podrían acumular el nitrito en lugar de degradarlo completamente, lo que significa que las bacterias podrían contribuir a su acumulación en el agua. Este fenómeno podría deberse a una incapacidad de algunas cepas para eliminar completamente el nitrito (Zou *et al.*, 2014). Se ha documentado que el nitrito puede inhibir el proceso de desnitrificación y causar toxicidad en ciertas cepas, limitando así el efecto de la aplicación práctica de las mismas (Soto *et al.*, 2007). Se deben realizar más estudios con este tipo de cepas para comprender mejor su comportamiento con estas fuentes de nitrógeno.

10.3. Bioensayo III Reto con *Vibrio parahaemolyticus*.

Vibrio parahaemolyticus es una bacteria patógena responsable de la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), anteriormente conocida como enfermedad de la mortalidad temprana por la alta mortalidad (EMS) en los primeros 20 a 30 días de cultivo (Tran *et al.*, 2013). La AHPND se caracteriza por una atrofia severa del hepatopáncreas (HP). Este patógeno también conocido como *Vp_{AHPND}*, alberga genes de toxinas llamados *pirA Vp* y *pirB Vp* (Tran *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2015). Estudios más recientes han demostrado la presencia de *Vp_{AHPND}* en varios tejidos de camarones, incluyendo el hepatopáncreas, el estómago, los intestinos y las branquias (Chen *et al.*, 2017; Khimmakthong y Sukkarun, 2017).

Las pruebas del reto del presente estudio muestran que los genes que participan en la virulencia de AHPND presentaron una menor abundancia en el hepatopáncreas de los camarones de los tratamientos con las cepas bacterianas probadas, registrando una supervivencia del 100 %, mientras que en el tratamiento control la mortalidad observada fue del 37 %.

La naturaleza de *Pseudomonas* sp es producir biopelículas para competir por los nutrientes y espacio en superficies y en la columna de agua, teniendo así un efecto antagónico contra *Vp_{AHPND}* (Lalucat *et al.*, 2006). Esta interacción entre las bacterias que fueron usadas como tratamiento y el *Vp_{AHPND}*, podría haber sido un factor que influyó en la baja virulencia del patógeno en los camarones (Prachumwat *et al.*, 2019).

Aunque no se conoce el mecanismo específico de acción de estas cepas, se ha observado que otros tipos como la aislada por Essén *et al.* (2007) *Pseudomonas stutzeri* produce sideróforos, compuestos que actúan como quelantes de hierro en aguas para limitar su disponible y así inhibir el desarrollo de bacterias patógenas. Por otro lado, en otros estudios se ha informado que la especie *Pseudomonas balearica* produce pigmentos antimicrobianos como la melanina que contribuyen a la inhibición del crecimiento de algunos patógenos (Zerrad *et al.*, 2014).

Los resultados de la cuantificación de Vp_{AHPND} en el hepatopáncreas indicaron que la cantidad de copias de Vp_{AHPND} fue muy baja en los tres tratamientos en comparación al control, donde fue relativamente alta. Datos similares fueron obtenidos por Wang *et al.* (2018), quienes evaluaron *Pseudoalteromonas* sp como posible agente biocontrol en la supervivencia del camarón blanco contra Vp_{AHPND} . Observaron que las cepas CDM8 y CDA22 tenían capacidad inhibidora contra este patógeno, registrándose un bajo número de copias del gen Pir A Vp en las branquias de los organismos. Concluyendo que estas cepas, debido a su naturaleza tienen la capacidad de reducir la microbiota competidora.

11. CONCLUSIÓN

Bioensayo 1.

- Todas las cepas utilizadas demostraron capacidad para remover el amonio, nitrito y nitrato *in vitro*.
- Las cepas que mostraron mejores resultados en la remoción de amonio fueron *Pseudomonas stutzeri* (13A-SIDES1) y *Providencia* sp (12A-AEDES1).
- Las Cepas más eficaces para remover el nitrito fueron *las Pseudomonas stutzeri* (13A-SIDES1) y *Pseudomonas* sp (6-ISLB1).
- Las cepas con mejores resultados para remover el nitrato fueron 13A-SIDES1, 14-ISDES1 y 6-ISLB1, identificadas como *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas balearica* y *Pseudomonas* sp.
- Las cepas, *Pseudomonas* sp. (6-ISLB1), *Pseudomonas balearica* (14-ISDES1), *Pseudomonas stutzeri* (13A-SIDES1), tienen el potencial para ser usadas en la remoción de amonio, nitrito y nitrato en acuicultura.

Bioensayo 2.

- Las cepas que utilizadas en este bioensayo mostraron un efecto positivo en la remoción de amonio después de los 15 días de cultivo.
- Los tratamientos demostraron una alta bioseguridad para *P. vannamei* con una concentración de 1×10^7 , es decir, el tratamiento no afectó ni el crecimiento ni la mortalidad de los organismos.
- Los tratamientos con bacterias heterótrofas no solo aseguraron el desempeño y el bienestar de los camarones, sino que también mejoraron su rendimiento en el cultivo. Esto sugiere que las bacterias heterótrofas desempeñaron un papel positivo en la respuesta productiva del cultivo, manteniendo condiciones óptimas para el crecimiento y la supervivencia de los camarones.

Bioensayo 3.

- Las cepas utilizadas en este bioensayo demostraron una capacidad para inhibir la colonización de vibrios en el hepatopáncreas.

- Se demostró que, al usar estos tratamientos, hubo mayor supervivencia que en el control cuando se inoculó el patógeno en el agua.

12. BIBLIOGRAFIA.

- Abdel-Latif, H. M., Yilmaz, E., Dawood, M. A., Ringø, E., Ahmadifar, E., & Yilmaz, S. (2022). Shrimp vibriosis and possible control measures using probiotics, postbiotics, prebiotics, and synbiotics: A review. *Aquaculture*, 551, 737951.
- Asche, F., Anderson, J. L., Botta, R., Kumar, G., Abrahamsen, E. B., Nguyen, L. T., & Valderrama, D. 2021. The economics of shrimp disease. *Journal of invertebrate pathology*, 186, 107397.
- Balakrishnan, S., Ameer, A., Pazhur Mohandas, S., Maliyekkal Sajeevan, A. K., Bhaskaran Sathyabhama, A., & Singh, B. 2022. Pyocyanin as a safe aquaculture drug for the control of vibriosis in shrimp recirculating aquaculture system (RAS). *Aquaculture International*, 30(4), 2129-2144.
- Barik, P., Ram, R., Haldar, C., & Vardia, H. K. 2018. Study on nitrifying bacteria as bioremediator of ammonia in simulated aquaculture system. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(3), 1200-1206.
- Cárdenas-Canizalez A. y Guzmán Hernández O.A. 2020. Aislamiento de bacterias nitrificantes y denitrificantes para la mejora de la calidad del agua en la acuicultura. Tesis Licenciatura Biólogo Acuacultor. Facultad de Ciencias del Mar. Universidad Autónoma de Sinaloa Mazatlan, Sinaloa 66 pp.
- Chen, J. C., & Kou, Y. Z. 1992. Effects of ammonia on growth and molting of *Penaeus japonicus* juveniles. *Aquaculture*, 104(3-4), 249-260.
- Chen, Q., & Ni, J. 2012. Ammonium removal by *Agrobacterium* sp. LAD9 capable of heterotrophic nitrification–aerobic denitrification. *Journal of bioscience and bioengineering*, 113(5), 619-623.
- Chen, P., Li, J., Li, Q. X., Wang, Y., Li, S., Ren, T., & Wang, L. 2012. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by bacterium *Rhodococcus* sp. CPZ24. *Bioresource technology*, 116, 266-270.

- Chen, X., Wang, W., Ye, F., Xiao, H.Z. 2014. Impact resistance of different factors on ammonia removal by heterotrophic nitrification–aerobic denitrification bacterium *Aeromonas* sp. HN-02. *Bioresour. Technol.* 167, 456–461.
- Chen, W. Y., Ng, T. H., Wu, J. H., Chen, J. W., & Wang, H. C. 2017. Microbiome dynamics in a shrimp grow-out pond with possible outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease. *Scientific reports*, 7(1), 1-12.
- Chen, L., Lin, J., Pan, D., Ren, Y., Zhang, J., Zhou, B., ... & Lin, J. 2020. Ammonium removal by a newly isolated heterotrophic nitrification–aerobic denitrification bacteria *pseudomonas stutzeri* SDU10 and its potential in treatment of piggery wastewater. *Current Microbiology*, 77, 2792-2801.
- Cho SH, Jeon GH, Kim HS, Kim DS, y Kim C. 2013. Effects of dietary *Scutellaria baicalensis* extract on growth, feed utilization and challenge test of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 26, 90–96.
- Correa Galeote, D. 2016. Biodiversidad y ecología funcional de bacterias desnitrificantes. Tesis Doctoral Universidad de Granada.
- CONAPESCA Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. 2022. Gobierno de Mexico. Mexico City. <https://datos.gob.mx/busca/dataset/produccion-pesquera>.
- Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P., and Verstraete, W. 2007 Nitrogen removal 401 techniques in aquaculture for a sustainable production *Aquaculture* 270, 1.
- Cutting S. M. 2011. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol* 28(2):214–220.
- Dangtip, S., Sirikharin, R., Sanguanrut, P., Thitamadee, S., Sritunyalucksana, K., Taengchaiyaphum, S., Mavichak, R., Proespraiwong, P., Flegel, T.W. 2015. AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Reports*. 2:158-162.

- Decamp, O., Moriarty, D. J. W., Lavens, P. 2009. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. *Aquaculture Research*, 39(4): 334–338.
- Dong, L., Shi, R.Z., Shuai, L., Hui, P.Z., Jie, Z., 2019. The nitrogen removal of autotrophic and heterotrophic bacteria in aerobic granular reactors with different feast/famine ratio. *Bioresour. Technol.* 272, 370–378.
- Dou, L., Chen, W., Pan, L., & Huang, F. 2021. Characterization of *Vibrio sp.* strain AB15 and *Pseudomonas fluorescens* strain NB14 from the biofloc of shrimp culture ponds capable of high ammonia and nitrite removal efficiency. *Journal of the World Aquaculture Society*.
- Duan, J., H. Fang, B. Su, J. Chen, and J. Lin. 2015. Characterization of a halophilic heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium and its application on treatment of saline wastewater. *Bioresour. Technol.* 179: 421–428.
- El-Sayed, A. F. M. 2021. Use of biofloc technology in shrimp aquaculture: a comprehensive review, with emphasis on the last decade. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 676-705.
- Essén, S. A., Johnsson, A., Bylund, D., Pedersen, K., & Lundström, U. S. 2007. Siderophore production by *Pseudomonas stutzeri* under aerobic and anaerobic conditions. *Applied and environmental microbiology*, 73(18), 5857-5864.
- FAO. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. La sostenibilidad en acción. <http://www.fao.org/3/ca9229es/ca9229es.pdf>.
- FAO. 2020 The state of world Fisheries and Aquaculture, in. Interactive story. <http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture>.
- FAO 2022 El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022- - <https://www.fao.org/3/cc0461es/online/sofia/2022/world-fisheries-aquaculture-production.html>.
- Flores-Mireles, A. L. 2005. Bacterias diazotróficas y desnitrificantes asociadas a raíces del mangle negro: caracterización de las comunidades a nivel molecular y su producción de moléculas señal tipo acilo homoserina lactonas. Tesis de Maestría en ciencias.

- Centro de investigaciones Biologicas Del Noroeste, SC. La Paz, Baja California Sur.
No de paginas 132.
- Frías-Espéricueta, M. G., Harfush-Melendez, M., Páez-Osuna, F. 2000. Effects of Ammonia on Mortality and Feeding of Postlarvae Shrimp *Litopenaeus vannamei* Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 65(1), 98.
- GB7493–87, 1987. Water quality-Determination of nitrogen (nitrite)-Spectrophotometric.
- GOAL. Global shrimp production review 2019.
<https://www.aquaculturealliance.org/advocate/goal-2019-global-shrimp-production-review/>
- Grajeda-Gutiérrez, M. A., Lopez-Zavala, A.A. 2019. Sobreexpresión recombinante de la mutante Ser153: Gly de la hemolisina termolábil dependiente de lecitina de *Vibrio parahaemolyticus*. (Tesis de licenciatura) Universidad de Sonora.
- GSA. Global Shrimp Aquaculture Production Survey and Forecast. Gorjan Nikolik, Rabobank, 2022
https://issuu.com/aquacultureasiapacific/docs/aq23186_aap_mar_apr_23_fa/s/21297044
- Gupta, S. 1999. Molecular interactions among PAP-1, SPHs and proPO in activation of prophenoloxidase. Tesis de Maestría en Ciencias en Acuicultura. Oklahoma State University.
- Guo, D. J., Li, D. P., Chen, Z. D., Yang, B., Verma, K. K., Singh, R. K., ... & Li, Y. R. 2023. Effect of endophytic diazotroph *Enterobacter roggenskampii* ED5 on nitrogen-metabolism-related microecology in the sugarcane rhizosphere at different nitrogen levels. *Frontiers in Microbiology*, 14.
- Habaki, H., Tajiri, S., Egashira, R., & Sato, K. 2011. Uptake Rate of Ammonia-nitrogen With Sterile *Ulva* sp. for Water Quality Control of Intensive Shrimp Culture Ponds in Developing Countries. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 25(3), 341-349.

- Hamad, M. N., Marrez, D. A., & El-Sherbieny, S. M. 2020. Toxicity evaluation and antimicrobial activity of purified pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biointerface Res Appl Chem*, 10(6), 6974-90.
- Hashihama, F., Kanda, J., Tauchi, A., Kodama, T., Saito, H., & Furuya, K. 2015. Liquid waveguide spectrophotometric measurement of nanomolar ammonium in seawater based on the indophenol reaction with o-phenylphenol (OPP). *Talanta*, 143, 374-380.
- He, T.X., Zhen, L.L., Quan, S., Yi, X., Qing, Y., 2016. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Pseudomonas tolaasii* Y-11 without nitrite accumulation during nitrogen conversion. *Bioresour. Technol.* 200, 493–499.
- Hellemans, J.G., Mortier G., De Paepe A., Speleman F. y J. Vandesompele. 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8: R19.
- Hernández Gurrola, J. A. 2016. Caracterización de la calidad de agua en un sistema intensivo de cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, en condiciones de alta salinidad con recambio de agua limitado. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. Las Paz, México.
- Hong, X.P., Lu, L.Q., Xu, D., 2016. Progress in research on acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquacult. Int.* 24, 577–593.
- Huang, F., Pan, L., Lv, N., & Tang, X. 2017. Characterization of novel *Bacillus* strain N31 from mariculture water capable of halophilic heterotrophic nitrification–aerobic denitrification. *Journal of bioscience and bioengineering*, 124(5), 564-571.
- Jennings, S., Stentiford, G. D., Leocadio, A. M., Jeffery, K. R., Metcalfe, J. D., Katsiadaki, I., . & Peeler, E. J. 2016. Aquatic food security: insights into challenges and solutions from an analysis of interactions between fisheries, aquaculture, food safety, human health, fish and human welfare, economy and environment. *Fish and Fisheries*, 17(4), 893-938.

- Ji, B.; Yang, K.; Wang, H.; Zhou, J.; Zhang, H. 2015. Aerobic denitrification by *Pseudomonas stutzeri* C3 incapable of heterotrophic nitrification. *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, 38, 407–409.
- Jin, R., Liu, T., Liu, G., Zhou, J., Huang, J., & Wang, A. 2015. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the marine origin bacterium *Pseudomonas* sp. ADN-42. *Applied biochemistry and biotechnology*, 175(4), 2000-2011.
- Jory, D. 2023. Global shrimp production forecast of 5.6 million metric tons is slightly lower for this year. <https://www.globalseafood.org/advocate/annual-farmed-shrimp-production-survey-a-slight-decrease-in-production-reduction-in-2023-with-hopes-for-renewed-growth-in-2024/>
- John, E. M., Krishnapriya, K., Sankar, T. V. 2020. Treatment of ammonia and 60 nitrite in aquaculture wastewater by an assembled bacterial consortium. *Aquaculture*, 735390.
- Joo, H. S., Hirai, M., & Shoda, M. 2007. Improvement in ammonium removal efficiency in wastewater treatment by mixed culture of *Alcaligenes faecalis* No. 4 and L1. *Journal of bioscience and bioengineering*, 103(1), 66-73.
- Justo, S., Churasacari, T., Elías, C., & Guerra, A. 2014. Efecto antibiótico de piocianina de *Pseudomonas aureginosa* sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. *Revista de ciencias*, 10.
- Kankariya, R. A., Chaudhari, A. B., Gavit, P. M., & Dandi, N. D. 2019. 2, 4-Diacetylphloroglucinol: a novel biotech bioactive compound for agriculture. *Microbial Interventions in Agriculture and Environment: Volume 1: Research Trends, Priorities and Prospects*, 419-452.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y. & Morishima, K. 2016 KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic acids res.* 45, D353–D361.
- Khimmakthong, U., & Sukkarun, P. 2017. The spread of *Vibrio parahaemolyticus* in tissues of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* analyzed by PCR and histopathology. *Microbial pathogenesis*, 113, 107-112.

- Kim, K., Hur, J. W., Kim, S., Jung, J. Y., & Han, H. S. 2020. Biological wastewater treatment: Comparison of heterotrophs (BFT) with autotrophs (ABFT) in aquaculture systems. *Bioresource technology*, 296, 122293.
- Kim, M., Jeong, S. Y., Yoon, S. J., Cho, S. J., Kim, Y. H., Kim, M. J., & Lee, S. J. 2008. Aerobic denitrification of *Pseudomonas putida* AD-21 at different C/N ratios. *Journal of bioscience and bioengineering*, 106(5), 498-502.
- Krishnani, K. K. 2013. Heterotrophic nitrifying and oxygen tolerant denitrifying bacteria from greenwater system of coastal aquaculture. *Applied biochemistry and biotechnology*, 169(6), 1978-1992.
- Lananan F, Hamid SHA, Din WNS, Khatoon H, Jusoh A, Endut A., 2014 Symbiotic bioremediation of aquaculture wastewater in reducing ammonia and phosphorus utilizing effective microorganism (EM-1) and microalgae (*Chlorella* sp.). *Int Biodeterior Biodegradation* 95:127–134.
- Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., García-Valdés, E., & Palleroni, N. J. 2006. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 70(2), 510-547.
- Lee, C. T., Chen, I. T., Yang, Y. T., Ko, T. P., Huang, Y. T., Huang, J. Y., ... & Lo, C. F. 2015. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(34), 10798-10803.
- Lei, Y., Wang, Y., Liu, H., Xi, C., & Song, L. 2016. A novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium, *Zobellella taiwanensis* DN-7, can remove high-strength ammonium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(9), 4219-4229.
- Leyton, Y., Pohl, K., & Riquelme, C. 2014. Inhibición de la cepa patogénica de *Vibrio cholerae* (tor1) por *Bacillus pumilus* aislados del ambiente marino. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(3), 595-600.
- Li, C., Yang, J., Wang, X., Wang, E., Li, B., He, R., & Yuan, H. 2015. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification–aerobic denitrification of a phosphate accumulating bacterium *Pseudomonas stutzeri* YG-24. *Bioresource technology*, 182, 18-25.

- Li, B., Jing, F., Wu, D., Xiao, B., & Hu, Z. 2021. Simultaneous removal of nitrogen and phosphorus by a novel aerobic denitrifying phosphorus-accumulating bacterium, *Pseudomonas stutzeri* ADP-19. *Bioresource Technology*, 321, 124445.
- Lian, C., Xiang, J., Cai, H., Ke, J., Ni, H., Zhu, J., ... & Yang, W. 2024. Microalgae Inoculation Significantly Shapes the Structure, Alters the Assembly Process, and Enhances the Stability of Bacterial Communities in Shrimp-Rearing Water. *Biology*, 13(1), 54.
- Liang, Z., Liu, R., Zhao, D., Wang, L., Sun, M., Wang, M., & Song, L. 2016. Ammonia exposure induces oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hepatopancreas of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish & shellfish immunology*, 54, 523-528.
- Limbu, S. M., Zhou, L., Sun, S. X., Zhang, M. L., & Du, Z. Y. 2018. Chronic exposure to low environmental concentrations and legal aquaculture doses of antibiotics cause systemic adverse effects in Nile tilapia and provoke differential human health risk. *Environment international*, 115, 205-219.
- Lin HL, Shiu YL, Chiu CS, Huang SL, y Liu CH. 2017. Screening probiotic candidates for a mixture of probiotics to enhance the growth performance, immunity, and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch), against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 60, 474–482.
- Lin, Y. C., Chen, J. C. 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 259(1), 109-119.
- Method. The State Environmental Protection Administration of China, pp. 144–148.
- Manan, H., Zhong, J. M. H., Othman, F., & Ikhwanuddin, M. H. D. 2015. Histopathology of the hepatopancreas of pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* from none early mortality syndrome (EMS) shrimp ponds. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 10(6), 562.

- Martínez-Córdova, L. R., Emerenciano, M., Miranda-Baeza, A., & Martínez-Porchas, M. 2015. Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: an updated review. *Reviews in Aquaculture*, 7(2), 131-148.
- Motta-Escobar, S., Salazar Cabezas, L. D., & Sánchez Leal, L. C. 2022. Perspectiva del uso de *Pseudomonas* spp. como biocontrol de fitopatógenos en cultivos de hortalizas en Colombia: una revisión sistemática.
- Murugapiran, S. K., Huntemann, M., Wei, C.-L., Han, J., Detter, J. C., Han, C. S., Hedlund, B. P. 2013. Whole Genome Sequencing of *Thermus oshimai* JL-2 and *Thermus thermophilus* JL-18, Incomplete Denitrifiers from the United States Great Basin. *Genome Announcements*, 1(1).
- Nadella, R. K., Panda, S. K., Rao, B. M., Prasad, K. P., Raman, R. P., & Mothadaka, M. P. 2021. Antibiotic resistance of culturable heterotrophic bacteria isolated from shrimp (*Penaeus vannamei*) aquaculture ponds. *Marine Pollution Bulletin*, 172, 112887.
- Nimrat S, P Tanutpongpalin, K Sritunyalucksana, T Boonthai & V Vuthiphandchai. 2013. Enhancement of growth performance, digestive enzyme activities and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) postlarvae by potential probiotics. *Aquaculture International* 21: 655-666.
- Pal, R. R., Khardenavis, A. A., & Purohit, H. J. 2015. Identification and monitoring of nitrification and denitrification genes in *Klebsiella pneumoniae* EGD-HP19-C for its ability to perform heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Functional & integrative genomics*, 15(1), 63-76.
- Padhi, S. K., Tripathy, S., Sen, R., Mahapatra, A. S., Mohanty, S., & Maiti, N. K. 2013. Characterisation of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 strain for bioremediation of wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 78, 67-73.
- Patel, A. B., Mahala, K., Jain, K., & Madamwar, D. 2018. Development of mixed bacterial cultures DAK11 capable for degrading mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Bioresource technology*, 253, 288-296.

- Prachumwat, A., Taengchaiyaphum, S., Mungkongwongsiri, N., Aldama-Cano, D. J., Flegel, T. W., & Sritunyalucksana, K. 2019. Update on early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease by April 2018. *Journal of the World Aquaculture Society*, 50(1), 5-17.
- Pragana, L. G., Norat, C. E. T., Dias, D. S. B., de Moura Kretzschmar, E. A., de Almeida Travassos, R., & Vasconcelos, U. 2022. Summary of the role of pyocyanin in the transformation and biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Conjecturas*, 22(15), 405-429.
- Priyaja P, Jayesh P, Correya NS, Sreelakshmi B, Sudheer NS, Philip R, Singh ISB, 2014 Antagonistic effect of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from various ecological niches on *Vibrio* species pathogenic to crustaceans. *J Coast Life Med* 2:76–84.
- Priyaja, P., Jayesh, P., Haseeb, M., Jose, B., Philip, R., Singh, I. S. B. 2016. Evaluation of pyocyanin toxicity in various life stages of *Penaeus monodon* and in nitrifying bacterial consortia for their safe application in recirculating aquaculture systems (RAS) to abrogate pathogenic vibrios. *Aquaculture International*, 25(2): 743–753.
- Ramírez C y Romero J. 2017. Fine flounder (*Paralichthys adspersus*) microbiome showed important differences between wild and reared specimens. *Front. Microbiol.* 8, 271.
- Ray, A. J., Drury, T. H., & Cecil, A. 2017. Comparing clear-water RAS and biofloc systems: Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production, water quality, and biofloc nutritional contributions estimated using stable isotopes. *Aquacultural Engineering*, 77, 9-14.
- Read, P., y Fernandes, T. 2003 Management of environmental impacts of marine aquaculture in Europe. *Aquaculture* 226, 139-163.
- Ren, Y. X., Yang, L., & Liang, X. 2014. The characteristics of a novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium, *Acinetobacter junii* YB. *Bioresource Technology*, 171, 1-9.
- Reyes-Mero, A. J. 2021. Principales agentes infecciosos asociados al cultivo del camarón blanco *Penaeus vannamei* reportados en Ecuador durante el periodo 2010-2021 (Bachelor's thesis, La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2021).

- Robertson, L. A., Cornelisse, R., De Vos, P., Hadjioetomo, R., & Kuenen, J. G. 1989. Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers. *Antonie van Leeuwenhoek*, 56(4), 289-299.
- Ruiz, P., Vidal, J. M., Sepulveda, D., Torres, C., Villouta, G., Carrasco, C., & Urrutia, H. 2020. Overview and future perspectives of nitrifying bacteria on biofilters for recirculating aquaculture systems. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1478-1494.
- Ruan, Y., Taherzadeh, M. J., Kong, D., Lu, H., Zhao, H., Xu, X., ... & Cai, L. 2020. Nitrogen removal performance and metabolic pathways analysis of a novel aerobic denitrifying halotolerant *Pseudomonas balearica* strain RAD-17. *Microorganisms*, 8(1), 72.
- Rurangwa, E., y Verdegem, M. C. 2015. Microorganisms in recirculating aquaculture systems and their management. *Reviews in aquaculture*, 7(2), 117-130.
- Sacca, M.L., Fajardo, C., Martinez-Gomariz, M., Costa, G., Nande, M., Martin, M., 2014. Molecular stress responses to nano-sized zero-valent Iron (nZVI) particles in the soil bacterium *Pseudomonas stutzeri*. *PLoS One* 9 (2), e89677.
- Samarakoon, S. A., Balasuriya, A., Rajapaksha, R. G., & Wickramarachchi, W. A. 2012. Molecular detection and partial characterization of Tomato Yellow Leaf Curl Virus in Sri Lanka. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 15(18), 863-870.
- Sedlacek CJ, Nielsen S, Greis KD, Haffey WD, Revsbech NP, Ticak T *et al.* 2016 Effect of bacterial community members on the proteome of the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas* sp. Is79. *Applied and Environmental Microbiology* 82: 4776–4788.
- Silva, L. C. F., Lima, H. S., de Oliveira Mendes, T. A., Sartoratto, A., Sousa, M. P., de Souza, R. S., Silva, C. C. 2020. Physicochemical characterization of *Pseudomonas stutzeri* UFV5 and analysis of its transcriptome under heterotrophic nitrification/aerobic denitrification pathway induction condition. *Scientific reports*, 0100(1), 1-13.
- Schock TB, Duke J, Goodson A, Weldon D, Brunson J, Leffler JW, Bearden DW., 2013 Evaluation of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) health during a superintensive aquaculture growout using NMR-based metabolomics. *PLoS One* 8:e59521.

- Shao, S., Hu, Y., Cheng, J., & Chen, Y. 2019. Action of oxytetracycline (OTC) degrading bacterium and its application in Moving Bed Biofilm Reactor (MBBR) for aquaculture wastewater pre-treatment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 171, 833-842.
- Song Z. F., An J., Fu G.H., Yang X.L. 2011. Isolation and characterization of an aerobic denitrifying *Bacillus* sp. YX-6 from shrimp culture ponds. *Aquaculture* 319 (1-2), 188-193.
- Soto, O., Aspé, E., & Roeckel, M. (2007). Kinetics of cross-inhibited denitrification of a high load wastewater. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1627-1634.
- Su, Z., Li, Y., Pan, L., He, Z., Dou, L., Liu, L., & Zhang, M. 2021. Nitrogen removal performance, quantitative detection and potential application of a novel aerobic denitrifying strain, *Pseudomonas* sp. GZWN4 isolated from aquaculture water. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44(6), 1237-1251.
- Su, J. J., Liu, B. Y., & Liu, C. Y. 2001. Comparison of aerobic denitrification under high oxygen atmosphere by *Thiosphaera pantotropha* ATCC 35512 and *Pseudomonas stutzeri* SU2 newly isolated from the activated sludge of a piggery wastewater treatment system. *Journal of applied microbiology*, 90(3), 457-462.
- Takaya, N., Antonina, M., Catalan-Sakairi, M.A., Sakaguchi, Y., Kato, I., 2003. Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3152–3157.
- Tienda-Serrano, S. 2021. Impacto sobre las poblaciones microbianas y análisis de genes destacados durante las interacciones multitróficas de *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 en la rizosfera de aguacate.
- Thurlow C.M., Williams A.M., Carrias A., Ran C., Newman M., Tweedie J., Allison E., Jescovithc L.N., Wilson A.E., Terhune J.S., Liles M.R. 2019. *Bacillus velezensis* API93 exerts probiotic effects in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and reduces aquaculture pond eutrophication. *Aquaculture* 503:347-356.
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohney, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., & Lightner, D. V. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute

- hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of aquatic organisms*, 105(1), 45-55.
- Tu, P. T., Hai, V. H., Lien, N. T., & Diep, D. X. 2022. Evaluation of short-term toxicity of ammonia and nitrite on the survival of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* juveniles. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh* 0792-156X.
- Valencia-Castañeda, G., Frías-Espericueta, M. G., Vanegas-Pérez, R. C., Pérez-Ramírez, J. A., Chávez-Sánchez, M. C., & Páez-Osuna, F. 2018. Acute toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae in low-salinity water. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 101, 229-234.
- Wang, H., Wang, C., Tang, Y., Sun, B., Huang, J., & Song, X. 2018. *Pseudoalteromonas* probiotics as potential biocontrol agents improve the survival of *Penaeus vannamei* challenged with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)-causing *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, 494, 30-36.
- Wang, J. H., Lu, J., Zhang, Y. X., Wu, J., Zhang, C., Yu, X., ... & Wang, W. H. 2018. High-throughput sequencing analysis of the microbial community in coastal intensive mariculture systems. *Aquacultural Engineering*, 83, 93-102.
- Wang, M., Wu, Y., Zhu, J., Wang, C., Zhu, Y., & Tian, Q. 2018. The new developments made in the autotrophic and heterotrophic ammonia oxidation. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 178, No. 1, p. 012016). IOP Publishing.
- Whelan J.A., Russell N.B., Whelan M.A. 2003 A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J Immunol Meth* 278:261–269.
- Xiao, J., Li, Q. Y., Tu, J. P., Chen, X. L., Chen, X. H., Liu, Q. Y., & Wang, H. L. 2019. Stress response and tolerance mechanisms of ammonia exposure based on transcriptomics and metabolomics in *Litopenaeus vannamei*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 180, 491-500.
- Yang, X.-P., Wang, S.-M., Zhang, D.-W., & Zhou, L.-X. 2011. Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying–denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1. *Bioresource Technology*, 102(2), 854–862.

- Yunjie Ruan, Taherzadeh, Kong, Lu, Zhao, Xu, Yu Liu, and Lei Cai. 2020. Nitrogen removal performance and metabolic pathways analysis of a novel aerobic denitrifying halotolerant *Pseudomonas balearica* strain RAD-17. *Microorganisms*, 8(1): 72.
- Yun, L., Yu, Z., Li, Y., Luo, P., Jiang, X., Tian, Y., Ding, X. 2019. Ammonia nitrogen and nitrite removal by a heterotrophic *Sphingomonas* sp. strain LPN080 and its potential application in aquaculture. *Aquaculture*, 500: 477–484.
- Zeng, S., Khoruamkid, S., Kongpakdee, W., Wei, D., Yu, L., Wang, H., ... & Satapornvanit, K. 2020. Dissimilarity of microbial diversity of pond water, shrimp intestine and sediment in Aquamimicry system. *AMB Express*, 10, 1-11.
- Zermeño-Cervantes, L. A., Barraza, A., González-Ponce, H. A., Martínez-Díaz, S. F., & Cardona-Félix, C. 2023. *Penaeus vannamei* challenged with a *Vibrio parahaemolyticus* AHPND strain shows hepatopancreatic microbiota imbalance. *Ciencias Marinas*.
- Zerrad, A., Anissi, J., Ghanam, J., Sendide, K., & El Hassouni, M. 2014. Antioxidant and antimicrobial activities of melanin produced by a *Pseudomonas balearica* strain. *J Biotechnol Lett*, 5(1), 87-94.
- Zhang, H., Zhao, Z., Li, S., Chen, S., Huang, T., Li, N., y Zhang, X. 2019. Nitrogen removal by mix-cultured aerobic denitrifying bacteria isolated by ultrasound: Performance, co-occurrence pattern and wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal*, 372, 26-36.
- Zhang, Y., Xu, Z., Li, J., Liu, D., Yuan, Y., Chen, Z., Wang, G. 2019. Cooperation between two strains of *Enterobacter* and *Klebsiella* in the simultaneous nitrogen removal and phosphate accumulation processes. *Bioresource Technology*, 291, 121854.
- Zhao, B., He, Y. L., Hughes, J., & Zhang, X. F. 2010. Heterotrophic nitrogen removal by a newly isolated *Acinetobacter calcoaceticus* HNR. *Bioresource Technology*, 101(14), 5194-5200.
- Zhou, Y., Zhu, Y., Zhu, J., Li, C., & Chen, G. 2023. A comprehensive review on wastewater nitrogen removal and its recovery processes. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(4), 3429.

- Zorriehzahra, M. J., y Banaederakhshan, R. 2015. Early mortality syndrome (EMS) as new emerging threat in shrimp industry. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 3(2S), 64-72.
- Zou, S., Yao, S., & Ni, J. 2014. High-efficient nitrogen removal by coupling enriched autotrophic-nitrification and aerobic-denitrification consortiums at cold temperature. *Bioresource Technology*, 161, 288-296.