



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DEL SALVADO
DE ARROZ FERMENTADO CON CEPAS
PROBIÓTICAS PARA REDUCIR LOS NIVELES DE
AMONIO EN ACUICULTURA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

PRESENTA

SALVADOR GONZÁLEZ RUBIO GAVARAIN

LA PAZ, B.C.S., AGOSTO DE 2019



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 24 del mes de Junio del 2019 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

"EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DEL SALVADO DE ARROZ FERMENTADO
CON CEPAS PROBIÓTICAS PARA REDUCIR LOS NIVELES DE AMONIO EN ACUICULTURA

Presentada por el alumno:

GONZÁLEZ RUBIO
Apellido paterno

CAVARAIN
materno

SALVADOR
nombre(s)

Con registro:

B	1	7	0	7	1	2
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

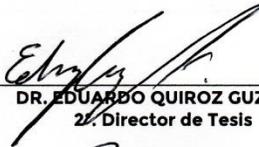
MAESTRIA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

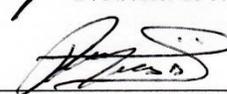
LA COMISION REVISORA

Directores de Tesis


DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ
Director de Tesis


DR. EDUARDO QUIROZ GUZMÁN
Director de Tesis


DR. RENATA PEÑA MARTÍNEZ


DR. MAURICIO MUÑOZ OCHOA


DRA. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 26 del mes de Junio del año 2019

El (la) que suscribe ING. SALVADOR GONZALEZ RUBIO GAVARAIN Alumno (a) del Programa

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro B170712 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DIAZ Y DR. EDUARDO QUIROZ GUZMÁN

y cede los derechos del trabajo titulado:

"EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DEL SALVADO DE ARROZ FERMENTADO

CON CEPAS PROBIÓTICAS PARA REDUCIR LOS NIVELES DE AMONIO EN ACUICULTURA"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la

siguiente dirección: elshaba@gmail.com - sergiofranciscomartinez@gmail.com -
eduardoquirozguzman9@gmail.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

ING. SALVADOR GONZÁLEZ RUBIO GAVARAIN

Nombre y firma del alumno

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del IPN; con el financiamiento de los proyectos:

2018 “Evaluación de la aplicación de arroz fermentado en cultivos de camarón sobre los parámetros de calidad ambiental” SIP 20181316

2017 “Evaluación de la capacidad de microorganismos probióticos como reguladores de la microbiota de estanques y como agentes de biorremediación durante la producción comercial de camarón” SIP 20172253

2016 PEI CONACyT Granmar. “Sistema super-intensivo para la producción de camarón basado en regímenes continuos de reactivación microbiana”. Proyecto: 231864.

"Sólo hay una pequeña parte del universo de la que sabrás con certeza que puede ser mejorada, y esa parte...eres tú".

Aldous Huxley

DEDICATORIA

A mi madre, por su esfuerzo y sacrificio, para darnos a mis hermanos y a mí siempre lo mejor de ella, por ser quien siempre ha estado, está y estará incondicionalmente en los tiempos gratos sin importar los malos momentos...

...Sin duda alguna el logro también es de ella.

A mi papá, tú ejemplo sigue siendo faro en mi trayecto.

A mi hermana Ibó Majibén... ¡ERES UN ÁNGEL!

A mis hermanos... ¡LOS MEJORES!

Y a mis sobrinos, vamos... ¡ALCÁNCENME!

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional (IPN) y al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada, con clave 637586.

Al CICIMAR, por las instalaciones proporcionadas para el desarrollo del presente trabajo. En especial al Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular por facilitar los espacios, materiales y equipos requeridos.

A mis directores de tesis Dr. Sergio F. Martínez Díaz y Dr. Eduardo Quiroz Guzmán a quienes sigo sin poder dimensionar su entrega a la investigación, su pasión por la enseñanza y más aún, su paciencia hacia mi persona, sin duda alguna, las personas que han dejado una huella en mi vida y son un ejemplo a seguir.

A mi comité tutorial, conformado por: Dr. Mauricio Muñoz Ochoa, Dr. Renato Peña Martínez y Dra. Bárbara González Acosta, por sus observaciones, comentarios y sugerencias en la realización de este documento, de una manera ampliada, como maestros en las materias que impartieron y asistí, su manera de conducirse, digna de imitación y mi admiración.

A las Dras. Ruth Noemí Águila Ramírez y Claudia Judith Hernández Guerrero, así como al Dr. Cesar Salvador Cardona Félix, por su tiempo, charlas y mis "...me podría prestar..." me salvaron...más de 3 veces.

A la M. en C. Diana Barajas Sandoval, por su paciencia y ser mi primer acercamiento al área de laboratorio; a Angélica, Lina, Juan Pablo, Zule, Estrella, Diana, Erika y demás compañeros y amigos ¡increíble lo que pueden hacer!

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS.....	IV
LISTA DE FIGURAS	IV
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	V
RESUMEN.....	6
ABSTRACT	7
I. INTRODUCCIÓN	8
I.1 Comunidades microbianas en ciclo del nitrógeno en acuicultura	9
I.2 Control de los niveles de nitrógeno tóxico en el cultivo de camarón.	11
I.3 Dependencia del carbono en la asimilación microbiana del amonio.....	13
II. ANTECEDENTES	15
II.1 Perspectivas del uso del salvado de arroz fermentado (FRB) en los sistemas de producción de acuícola.	17
III. JUSTIFICACIÓN.....	18
IV. HIPÓTESIS	18
V. OBJETIVO GENERAL	19
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	20
Fuente de Carbono.....	20
Fuente de enzima.....	20
Bacterias usadas en el presente estudio.....	20

7.1	Efecto de la concentración de enzimas sobre la disponibilidad de azúcares reductores del salvado de arroz.....	22
7.1.1	Efecto de la temperatura sobre la liberación de azucares reductores del salvado de arroz mediante tratamiento enzimático	24
7.1.2	Evaluación de diferentes presentaciones de una mezcla comercial de enzimas sobre la liberación de azúcares reductores del salvado de arroz	24
7.2	Selección de cepas probióticas con alta capacidad de asimilación de amonio.....	25
7.2.1	Evaluación de la capacidad de cepas de <i>Bacillus</i> para asimilar amonio como única fuente de nitrógeno.....	25
7.2.2	Evaluación del crecimiento de las cepas de <i>Bacillus</i> con amonio como única fuente de nitrógeno.....	26
7.2.3	Cinética de consumo de amonio por cepa seleccionada.	26
7.2.4	Efecto del tamaño de inóculo sobre el consumo de amonio.....	26
7.3	Integración de digestión enzimática y fermentación bacteriana del salvado de arroz	27
7.3.1	Modelo I. Fermentación de salvado de arroz con <i>Bacillus subtilis</i>	27
7.3.2	Modelo II. Consorcio de <i>Bacillus</i> spp en la fermentación de salvado de arroz.....	28
7.4	Evaluación de los factores que modifican la capacidad de asimilación de amonio con salvado de arroz fermentado.....	29
7.4.1	Efecto del pretratamiento enzimático del salvado de arroz.....	29
7.4.2	Efecto de temperatura	30
7.4.3	Efecto de salinidad.....	31
7.4.4	Efecto de la adición de otras fuentes suplementarias de carbono a FRB sobre la asimilación de amonio.....	31
7.4.5	Efecto de la concentración de melaza	32
VIII.	RESULTADOS.....	33
8.1.1	Efecto de la concentración de enzimas sobre la disponibilidad de azúcares reductores del salvado de arroz.....	33
8.1.3	Efecto de la temperatura sobre la liberación de azucares reductores del salvado de arroz mediante tratamiento enzimático	34
8.1.4	Evaluación de diferentes presentaciones de una mezcla comercial de enzimas sobre la liberación de azúcares reductores del salvado de arroz	36
8.2.1	Capacidad de cepas de <i>Bacillus</i> para asimilar amonio como única fuente de nitrógeno	37
8.2.2	Evaluación del crecimiento de las cepas de <i>Bacillus</i> con amonio como fuente de nitrógeno	38
8.2.3	Cinética de consumo de amonio por cepa seleccionada.	39
8.2.4	Efecto del tamaño de inóculo sobre el consumo de amonio.....	40
8.3	Integración de digestión enzimática y fermentación bacteriana del salvado de arroz	42
8.3.1	Modelo 1. Fermentación de salvado de arroz con <i>Bacillus subtilis</i>	42
8.3.2	Capacidad de asimilación de amonio por salvado de arroz fermentado por <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC).....	43
8.3.3	Modelo 2. Fermentación de salvado de arroz con un consorcio de <i>Bacillus</i> spp	44
8.5	Evaluación de los factores que modifican la capacidad de asimilación de amonio con salvado de arroz fermentado	45

8.5.2 Efecto de temperatura	49
8.5.3 Efecto de salinidad.....	50
8.5.4 Efecto de la adición de otras fuentes suplementarias de carbono a FRB sobre la asimilación de amonio.....	51
IX. DISCUSIÓN	53
X. CONCLUSIONES	58
XI RECOMENDACIONES.....	59
XII. BIBLIOGRAFÍA	60
XIII. APENDICE 1.....	69

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Cepas usadas el estudio	21
Tabla 2: Tratamientos utilizados para la evaluación.	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo del nitrógeno en sistemas de producción acuícola	11
Figura 2: Curva patrón de glucosa	23
Figura 3: Cinéticas de producción de azúcares reductores	34
Figura 4: Cinéticas de producción de azúcares reductores a partir de una suspensión de salvado de arroz	35
Figura 5: Cinéticas de la producción de azúcares reductores con enzimas	36
Figura 6: Niveles de asimilación de amonio por cepas de <i>Bacillus</i> spp cultivadas	37
Figura 7: Crecimiento de diferentes cepas de diferentes cepas de <i>Bacillus</i> spp	38
Figura 8: Cinética de la concentración de amonio en un medio definido inoculado con diferentes cepas de <i>Bacillus</i> spp.....	39
Figura 9: Asimilación de amonio a partir de una concentración inicial = 10 mg· L ⁻¹	40
Figura 10: Asimilación de amonio a partir de una concentración inicial = 10 mg· L ⁻¹ por las cepas seleccionadas	41
Figura 11: Disponibilidad de azúcares reductores durante el tratamiento de salvado de arroz con una mezcla enzimática y fermentada con la cepa Bs.	42
Figura 12: Comportamiento de la concentración de amonio en agua de mar.....	43
Figura 13: Comportamiento de la disponibilidad de azucares reductores.....	44
Figura 14: Tendencia liberación de glucosa durante la fermentación de salvado de arroz con un consorcio de <i>Bacillus</i> spp.....	46
Figura 15: Carga bacteriana en una suspensión de salvado de arroz.....	47
Figura 16: Asimilación de amonio en una suspensión de agua de mar tratada con salvado de arroz fermentado.	48
Figura 17: Asimilación de amonio en una suspensión de agua de mar tratada con salvado de arroz fermentado a diferentes temperaturas.	49
Figura 18: Asimilación de amonio en una suspensión de agua a diferentes salinidades tratada con salvado de arroz fermentado.....	50
Figura 19: Asimilación de amonio, llevada a cabo por FRB más diferentes fuentes de carbono.....	51
Figura 20: Asimilación de amonio con pruebas de FRB con diferentes concentraciones de melaza	52
Figura 21: Curva patrón para factor F, método LYSA	69

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

UBE	Unidad Básica de enzima. Cantidad de enzima que sacarifica el salvado de arroz soluble a una velocidad de 1 mg por minuto
mgr. L-1	Miligramos por litro
NH₄⁺	Amonio
NH₃	Amoniaco no ionizado
NO₂⁻	Nitrito
NO₃⁻	Nitrato
N₂	Nitrógeno
UV	Ultravioleta
RAS	Sistema de acuicultura recirculante (siglas en inglés)
C:N	Relación Carbono: Nitrógeno
ATP	Adenosín Trifosfato
NADH	Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina (forma reducida)
NADPH	Dinucleotido de Nicotinamida y Adenina Fosfato
FRB	Fermentad Rice Bran (salvado de arroz fermentado, por sus siglas en inglés).
RPM	Revoluciones por minuto
µL	Microlitro
nm	Nanómetro
ATCC	American Type Culture Collection
UFC/mL	Unidad Formadora de Colonia por militro
UPS	Unidades Prácticas de Salinidad
mg/mL	Miligramos por mililitro
ANOVA	Análisis de Varianza
HSD	Honesta Significant Difference
Post hoc	Expresión del latín = “después de”
gr. L-1	Gramos contenidos en un litro
UBE	Unidades Básicas de Enzima

RESUMEN

El salvado de arroz es un residuo agro-industrial con alto contenido de carbono en forma de almidón y fibra. En acuicultura se utiliza como sustituto de melaza para equilibrar el balance de Carbono: Nitrógeno y promover la actividad heterotrófica de las comunidades microbianas. Uno de los efectos esperados es la reducción en los niveles de amonio en el agua, mediante su asimilación por bacterias heterotróficas. Sin embargo, se ha determinado que su capacidad para promover la asimilación de amonio es baja debido a que el carbono no está del todo disponible y se ha sugerido que se requiere un tratamiento que ayude a solubilizar los compuestos del salvado para mejorar su efectividad. En este estudio se evaluó el efecto de un pretratamiento enzimático y fermentación microbiana del salvado como estrategia para incrementar su efecto sobre la asimilación de amonio. Para ello se seleccionó un consorcio de bacterias del género *Bacillus* spp. con capacidad de asimilar amonio y se usó para la fermentación del salvado de arroz. Se analizó el efecto del pretratamiento enzimático sobre el proceso de fermentación y su capacidad para asimilar amonio. Se establecieron las condiciones para inducir la liberación enzimática de azúcares reductores a partir de salvado de arroz en agua de mar; se obtuvo un rendimiento de $13.99 \pm 0.019 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de azúcares reductores en 4 h partir de una suspensión de $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de salvado de arroz. Se realizó la fermentación microbiana con un consorcio selecto de 7 cepas de *Bacillus* spp. capaces de asimilar amonio. La digestión enzimática y subsecuente fermentación microbiana se realizaron a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, en agitación constante en agua de mar a 35 UPS y pH de 8.2. En condiciones controladas se obtuvo una reducción de amonio del 98.75 % en 20 horas con el salvado de arroz fermentado a partir de una suspensión de $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de amonio. Lo anterior sugiere que el salvado de arroz fermentado con *Bacillus* spp. es una herramienta prometedora para el control de los compuestos nitrogenados originados durante la producción acuícola intensiva.

ABSTRACT

Rice bran is an agro-industrial waste with high carbon content in the form of starch and fiber. In aquaculture it is used as a molasses substitute to balance the Carbon: Nitrogen balance and promote the heterotrophic activity of microbial communities. One of the expected effects is the reduction in ammonium levels in water, through its assimilation by heterotrophic bacteria. However, it has been determined that its ability to promote the ammonium assimilation is limited because the carbon molecules are not entirely available and it has been suggested that a treatment that helps solubilize bran compounds is required to improve its effectiveness. In the present study, the effect of an enzymatic pretreatment and microbial fermentation of the rice bran was evaluated as a strategy to increase its effect on the ammonium assimilation. A consortium of *Bacillus* spp. capable of assimilating ammonium was used to ferment rice bran. The effect of enzymatic pretreatment on the fermentation process and its ability to assimilate ammonium was analyzed. The conditions to induce the enzymatic release of reducing sugars from rice bran in seawater were established; a yield of $13.99 \pm 0.019 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ of reducing sugars was obtained in 4 h from a suspension of $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ of rice bran. Microbial fermentation was performed with a select consortium of seven strains of *Bacillus* spp. able to assimilate ammonium. Enzymatic digestion and subsequent microbial fermentation were performed in seawater at 35 UPS and pH 8.2 at 30°C , under constant stirring. Under controlled conditions, an ammonium reduction of 98.75 % in 20 hours was obtained with fermented rice bran from a suspension of $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ammonium. The above suggests that rice bran fermented with *Bacillus* spp. is a promising tool for the control of toxic nitrogen compounds originated during intensive aquaculture production.

I. Introducción

Gracias al desarrollo de la acuicultura se ha hecho posible incrementar la disponibilidad y el consumo de organismos marinos, tan solo de 1961 a 2016 el aumento anual medio del consumo de pescados y mariscos (3.2 %) superó el crecimiento de la población (1.6 %) y fue mayor que el consumo de carne de animales terrestres (2.8 %) (FAO, 2018). El crecimiento del sector acuícola se atribuye principalmente a la intensificación de la producción, lo que implica un aumento de densidad de siembra y permite incrementar el rendimiento de las unidades productivas, sin embargo, ese proceso también conlleva mayores retos en el manejo de calidad de agua, sobre todo en lo que concierne a los desechos nitrogenados (Romano & Kumar, 2018). Considerando que la mayor parte del alimento que se suministra a los organismos cultivados no es aprovechado, los residuos tienden a acumularse en los estanques, y causa el deterioro de la calidad del agua del cultivo (Tacon & Foster, 2003; Gutierrez-Wing & Malone, 2006); lo que hace a los organismos cultivados más vulnerables a los patógenos oportunistas del medio (Crab *et al.*, 2007).

En la mayoría de las especies marinas el amonio no ionizado y el nitrito pueden causar mortalidades masivas cuando se acumulan en el agua, otras formas inorgánicas del nitrógeno que tienden a acumularse en los cultivos, incluyen el nitrato (NO_3^-) y gas nitrógeno (N_2), y las formas orgánicas incluyen aminoácidos, aminas, polipéptidos y proteínas las cuales en altas concentraciones también pueden ser dañinos para los cultivos (Frías-Espéricueta & Páez-Osuna, 2001).

La mayor parte de compuestos nitrogenados en los sistemas de producción acuícola provienen de la excreción de los organismos cultivados y tienen su origen en el metabolismo de las proteínas, de ellos el amonio es el que requiere más cuidado ya que su acumulación genera condiciones de alta toxicidad, aparentemente asociados al deterioro del metabolismo energético, existen estudios en los que se ha determinado que cuando los camarones son expuestos a más de $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de amonio, la difusión de amonio de la hemolinfa al agua se invierte, y que la muerte ocurre cuando se alcanzan niveles por arriba de $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en hemolinfa (Frías-Espéricueta & Páez-Osuna, 2001).

En camarones, la exposición aguda a concentraciones altas de amonio causa aumento en ventilación de las branquias, hiper-excitabilidad, pérdida del equilibrio, convulsiones y la muerte, mientras que exposiciones crónicas causan daño del tejido, inhibición del crecimiento y disminución en la capacidad reproductiva de los camarones, además de incremento en la susceptibilidad a las enfermedades y finalmente la muerte, por su parte el nitrito es un producto intermedio del proceso natural de nitrificación; la exposición prolongada o en concentraciones altas causa que la hemolinfa y/o sangre se torne café y causa dificultad para asimilar el oxígeno del agua, finalmente, el nitrato es la forma más oxidada del nitrógeno en la naturaleza, y es relativamente inocua para la mayoría de los organismos acuáticos, sin embargo, cuando la concentración de nitrato es superior a los $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, se puede volver en un serio problema por la promoción del crecimiento excesivo de algas (Gan Quin *et al.*,2005).

I.1 Comunidades microbianas en ciclo del nitrógeno en acuicultura

Los microorganismos tienen un papel fundamental en la transformación, uso y eliminación de las diferentes formas en que se presenta el nitrógeno en los sistemas de cultivo, se pueden identificar grupos microbianos altamente especializados en procesos de oxidación, asimilación, amonificación, nitrificación, desnitrificación, fijación de nitrógeno, y oxidación anaerobia del amonio (Andrade Ochoa *et al.*,2015).

En acuicultura la transformación del amonio generalmente es conceptualizada como un proceso de dos etapas, en el primer paso un grupo de bacterias oxidan el amonio (NH_4^+) como fuente de energía, produciendo nitrito (NO_2^-) como subproducto, las bacterias oxidantes de amonio incluyen los géneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* y *Nitrosovibrio*, en el segundo paso un grupo de bacterias oxida nitrito a nitrato (NO_3^-), estas bacterias son conocidas como nitrito-oxidantes y típicamente pertenecen a los géneros *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* y *Nitrospina* (Figura 1) (Timmons & Ebeling, 2007; Prosser, 1989; Kowalchuk & Stephen, 2001; Caffrey *et al.*,2007).

Una ruta alterna de oxidación del amonio ocurre vía anaeróbica y es realizada por *Planctomycetes* (Strous *et al.*,1999), se denomina Anammox y, en algunos casos es de importancia en el ambiente (Sliemers *et al.*,2002), sin embargo, se desconoce la importancia de este proceso dentro de los sistemas de producción acuícola.

Otra forma de transformación del amonio es mediante la asimilación heterotrófica, el cual consiste en una transformación del amonio a glutamina o glutamato las cuales pueden ser incorporadas en la ruta de síntesis de proteína. Las bacterias que lo realizan presentan la siguiente reacción metabólica que incluyen la descomposición del amonio para transformarlo en biomasa bacteriana:



El balance estequiométrico de esta reacción indica que para remover 1 g de amonio, el consumo de carbohidratos será igual a 15.2 g, alcalinidad de 3,6 g y oxígeno de 4,7 g, produciendo sólidos en suspensión volátiles (SSV) de 8 g y CO₂ de 9,7 g, dicho en otros términos por cada gramo de nitrógeno amoniacal total producido en un tanque de cultivo, es necesario añadir aproximadamente 15 g de hidratos de carbono (C: N de 15:1) (Avnimelech, 1999), una consecuencia directa de la adición de carbohidratos para lograr estas proporciones es el aumento de la demanda de oxígeno disuelto, atribuido a las reacciones químicas propias de las bacterias heterótrofas (Schveitzer *et al.*, 2013).

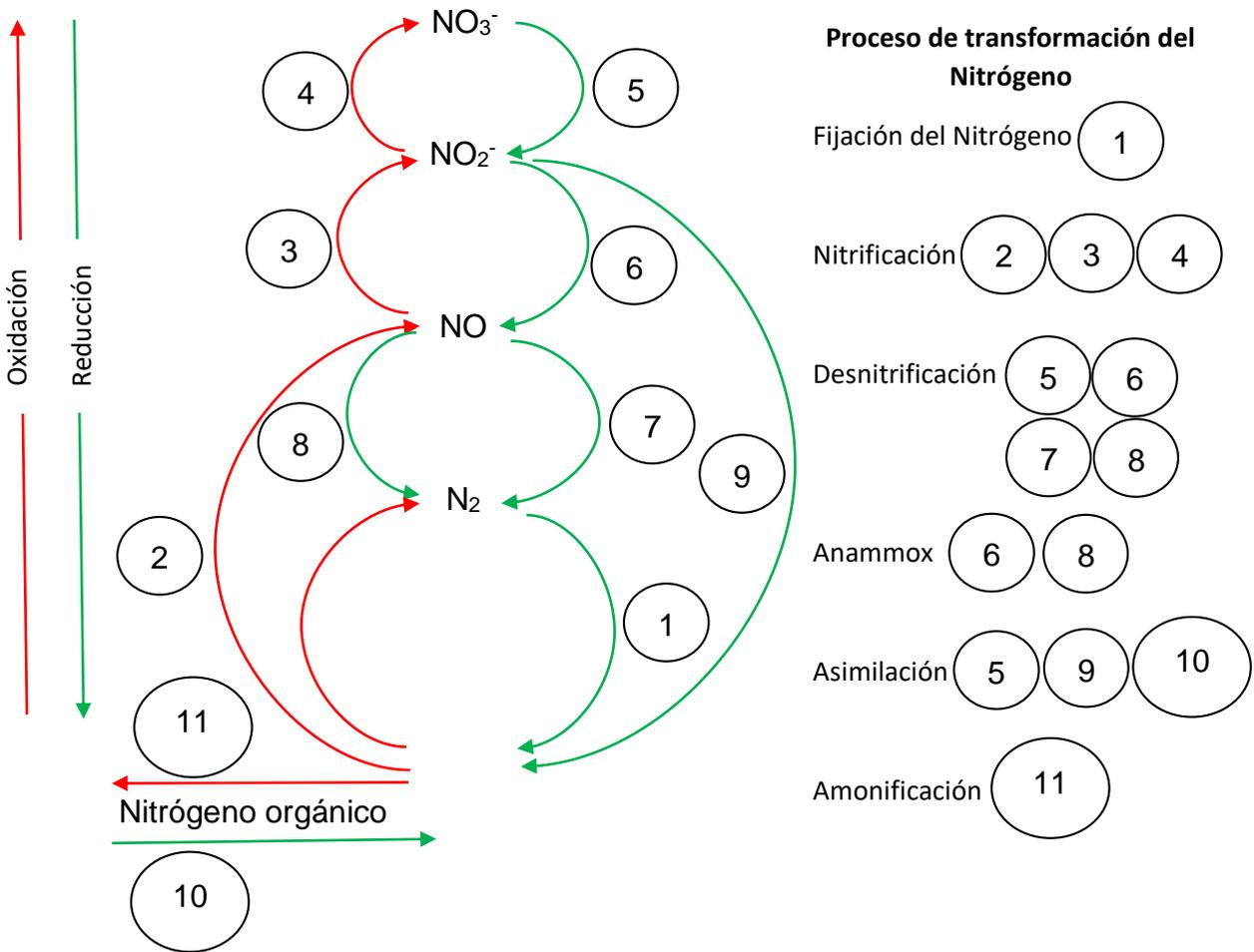


Figura 1: Ciclo del nitrógeno en sistemas de producción acuícola (modificado de Kuypers et al., 2018)

I.2 Control de los niveles de nitrógeno tóxico en el cultivo de camarón.

Actualmente existen diversas técnicas que permiten reducir los niveles de nitrógeno tóxico en los cultivos de camarón manteniendo al mismo tiempo otros parámetros de calidad del agua dentro de niveles aceptables (Crab *et al.*, 2007). La mayoría están diseñados para descartar desechos del cultivo y muchos de ellos tienen un impacto en los costos debido a la necesidad de espacio exclusivamente destinado para la sedimentación de los sólidos (Hargreaves, 2007). O por el uso de filtros mecánicos, que en general van seguidos de la separación de sólidos y fraccionadores de espuma, filtros

biológicos y desinfección con luz UV y ozono (Gutiérrez-Wing & Malone, 2006; Crab *et al.*,2007).

Las técnicas de producción acuícola se clasifican en tres tipos: extensivo, semi-intensivo e intensivo, cuya tecnificación va de menor a mayor (Martínez-Córdova, 1993; Thakur & Foster, 2003; Samocha *et al.*,2007). La intensificación de los sistemas de acuicultura esta inherentemente asociada con el manejo del agua con respecto al amonio y otros tipos de nitrógeno inorgánico, la gestión de tales sistemas depende del método desarrollado para eliminar estos compuestos del estanque, una de las soluciones comunes utilizadas para eliminar el exceso de nitrógeno es frecuentemente el recambio de agua, pero este se busca limitar debido a i) las regulaciones ambientales, ii) el riesgo de introducir patógenos y iii) los costos asociados (Avnimelech, 1999):

Recientemente, se ha generado para la gestión del amonio en acuicultura:

1. Cultivo en sistemas foto-autótrofos (agua verde): El cual, mediante la oxidación a nitrato mediante una combinación de procesos autótrofos, impulsados por bacterias nitrificantes y procesos foto-autotróficos (normalmente microalgas), asimilan el amonio del sistema de producción.
2. Cultivo en sistemas heterótrofos denominado bioflocs o agua oscura, que busca promover la transformación del amonio en biomasa microbiana mediante el proceso de asimilación.

En este último, el amonio es transformado por bacterias heterótrofas, a formas orgánicas de nitrógeno, las cuales son incorporadas a la biomasa microbiana, la cual potencialmente representa una fuente directa o indirecta de alimento para los organismos cultivados (Burford *et al.*,2003). Esto se logra ya sea usando suspensión activa en estanques “donde fuerte aireación y la mezcla inducen la formación y el crecimiento de flóculos microbianos en la columna de agua, o por medio de la adición al estanque de sustratos sumergidos que sirven para la promoción del crecimiento de matrices mixtas de bacterias” (Avnimelech, 2007; Crab *et al.*,2007).

En la actualidad se buscan estrategias de cultivo que sean económicamente más eficientes y que permitan reducir el impacto de la acuicultura sobre el ambiente (Hargreaves, 2007). En este sentido, la biotransformación es considerada una eficiente estrategia para disminuir los efectos negativos que producen las elevadas concentraciones de nitrógeno amoniacal, sin embargo, la capacidad de biotransformación microbiana depende de la tasa metabólica de los grupos microbianos implicados en el proceso, en este sentido, la asimilación heterotrófica de amonio es considerablemente más rápida que el proceso de nitrificación y a diferencia de este, tiene una menor dependencia de la disponibilidad del oxígeno (Frías-Espéricueta & Páez-Osuna, 2001).

I.3 Dependencia del carbono en la asimilación microbiana del amonio

La asimilación heterotrófica de amonio requiere de un suministro energético, de modo que en acuicultura se suplementa el agua de los cultivos con una fuente de carbono para estimular el proceso asimilatorio. En teoría, cualquier carbohidrato puede utilizarse como una fuente de carbono para acuicultura, sin embargo, la melaza de caña de azúcar es el carbohidrato más comúnmente utilizado y la aplicación suele hacerse de manera directa a los estanques (Samocha *et al.*, 2007).

Existen diversas fuentes de carbono que potencialmente pueden sustituir el uso de melaza en acuicultura, sin embargo, la factibilidad de aplicación depende de la disponibilidad, costo y efectos sobre el cultivo (Wei, Liao, & Wang, 2016). En este sentido los salvados de cereal son ampliamente disponibles y por ser un subproducto de desecho su costo es bajo (Tacon, Metian, & Hasan, 2009).

En la práctica la aplicación de una fuente suplementaria de carbono se realiza mediante el cálculo del balance Carbono:Nitrógeno (C:N), es decir se ajusta la cantidad de carbono adicionado al cultivo, considerando el suministro de nitrógeno a través del alimento, al adecuar el balance de C: N a niveles de 15:1 (15 moléculas de carbono por cada molécula de nitrógeno); las bacterias heterotróficas en los sistemas de producción

comienzan a usar nitrógeno amoniacal, nitritos, nitratos y fosfatos, transformándolas en formas químicas menos tóxicas y haciéndolos aprovechables por las microalgas, hongos, otras bacterias y organismos filtradores, Lo cual es aprovechado en los sistemas de biofloc (Avnimelech, 1999).

II. Antecedentes

El arroz es una de las mayores fuentes generadoras de residuos agrícolas, su refinación (pulido) genera entre 5 y 8% de salvado de arroz, por lo que anualmente se producen alrededor de 48 millones de toneladas de este subproducto (Danielski *et al.*, 2005), el salvado de arroz contiene entre 11 y 13 % de proteína, 12 % fibra cruda, hasta 20% de su peso en aceite, almidón, así como componentes antioxidantes y funcionales. (Silva *et al.*, 2006). Debido a sus características nutricionales, es sujeto actualmente a investigaciones en las áreas de alimentos, extracción de aceites, extracción de proteínas y debido a su bajo costo y abundancia, tiene un alto potencial para ser usado en procesos biotecnológicos para generar metabolitos de interés (Oliveira *et al.*, 2010)

En acuicultura el salvado de arroz es ampliamente utilizado como suplemento alimenticio y de acuerdo con Ranjan *et al.*, (2018), la suplementación del salvado con enzimas mejora significativamente el crecimiento de peces, en este mismo sentido, se sabe que la fermentación del salvado de arroz con *Bacillus amyloliquefaciens* y sustancias húmicas incrementa su valor nutricional, reduce el contenido de fibra cruda y aumenta el contenido de proteína cruda (Supriyati *et al.*, 2015). Mientras que la fermentación con *Rhizopus oryzae* produce un incremento en el contenido de fosfolípidos y ácidos grasos insaturados, mientras que la grasa total y los ácidos grasos saturados disminuyen (Oliveira *et al.*, 2011). Por lo que parece evidente que la fermentación con microbios específicos puede aumentar el valor de los subproductos agrícolas (Ranjan *et al.*, 2018).

El salvado de arroz también ha sido considerado una fuente de carbono para la tecnología de biofloculación, sin embargo, su utilidad aparentemente puede ser limitada por las características de los carbohidratos y polisacáridos que contiene, se sabe que el tipo de fuente de carbono usado en un sistema de biofloc determina la productividad y el valor nutritivo del mismo, así como la calidad del agua y el impacto sobre el rendimiento de los organismos cultivados, el uso de carbohidratos complejos conduce a mejor crecimiento de *Litopenaeus vannamei* y *Penaeus monodon*, lo que es explicado por un aparente mayor valor nutricional de los flóculos producidos (Kumar *et al.* 2017; Serra *et al.*, 2015).

Por otro lado, los azúcares simples o el glicerol son más efectivos para eliminar el amonio en los sistemas basados en biofloculación que los carbohidratos complejos (Dauda *et al.*, 2017; Khanjani *et al.*, 2017; Serra *et al.*, 2015). Por ejemplo, en el cultivo de peces, la aplicación de salvado de arroz condujo a niveles excesivos de amonio, debido a un consumo más lento de esta fuente de carbono (Dauda *et al.*, 2017). Por lo anterior se ha sugerido que se puede lograr una mejor gestión de la calidad del agua si se mejora la solubilidad del salvado de arroz mediante tratamientos previos con microorganismos, enzimas y/o fermentación (Dauda *et al.*, 2017; Ekasari *et al.*, 2014).

Actualmente existen enzimas microbianas disponibles, así como microorganismos capaces de producir enzimas hidrolíticas que pueden ayudar a reducir el contenido de fibra de los carbohidratos complejos y mejorar la solubilidad en agua, por lo que parece viable que el tratamiento previo del salvado de arroz pueda mejorar su solubilidad en agua al reducir el contenido de fibra y por lo tanto aumentar su potencial como fuente de carbono en los sistemas basados en biofloculación, si tiene éxito, esto podría permitir una mayor flexibilidad en la elección de las fuentes de carbono, que en el caso del salvado de arroz es un subproducto agrícola de bajo costo que está fácilmente disponible (Romano *et al.*, 2018).

La selección de cepas para fermentación de cereales actualmente juega un papel relevante al tratar de introducir comunidades con funciones específicas para el tratamiento de agua (Shih *et al.*, 2005). Y por lo mismo, resulta relevante buscar una comunidad con alta capacidad de asimilación de amonio que adicionalmente cumpla otras funciones dentro de la acuicultura (Dittman *et al.*, 2017). Por lo tanto, las bacterias heterotróficas aerobias pueden ser más adecuadas para disminuir la acumulación de compuestos del nitrógeno en la industria de la acuicultura (Huang *et al.*, 2017). Las cepas probióticas que son capaces de realizar la asimilación de amonio pueden ser candidatos más idóneos para los cultivos marinos, además de que pueden ser más efectivas y seguras para la aplicación en la industria de acuicultura, pero pocos estudios han detallado las capacidades asimilatorias de cepas de *Bacillus* aisladas de ambientes acuícolas y su seguridad para los animales acuáticos (Huang *et al.*, 2017). La aplicación junto con el salvado como fuente de carbono puede resultar en beneficios múltiples para el cultivo.

Este concepto es relativamente nuevo y actualmente se evalúa si las partículas de salvado de arroz colonizadas con probióticos pueden actuar como un simbiótico y estas al comportarse como un coloide pueden sustituir a los sistemas basados en biofloc, en cuyo caso su capacidad de remoción de amonio puede ser una clave de su mayor eficiencia.

II.1 Perspectivas del uso del salvado de arroz fermentado (FRB) en los sistemas de producción de acuícola.

Dentro de las tecnologías en base a la biorremediación, se encuentra la denominada “bio-shrimp”, la cual consiste en la inclusión de fermento de uno o más cereales lo cual, al ser una fuente de carbono con proteínas, carbohidratos y lípidos conformados en cadenas más simples (puras) que las que se puedan suministrar a los tanques de cultivo a través de solamente el salvado de los mismos (Romano, 2017).

Se encuentran reportes como los de Romano *et al.*, (2018) donde concluyen “El uso de salvado de arroz fermentado como fuente de carbono en un sistema basado en biofloc eliminó de manera efectiva el amonio, produjo bioflóculos con un alto contenido de proteínas y mejoró significativamente las eficiencias de crecimiento y alimentación de *Clarias Gariepinus*”, el cual amplía la capacidad de uso del FRB sobre especies marinas cultivables. La inclusión de enzimas es una de las características que más resalta en los resultados obtenidos de digestión enzimática, donde Yanto *et al.*, (2018) obtuvieron un promedio de actividad de α -amilasa de $\sim 21 \text{ u}\cdot\text{mg}^{-1}$ en 6 tratamientos diferentes, la cual, les llevó a un alza del 30 % como eficiencia en la alimentación del salvado de arroz fermentado que solamente utilizar el salvado de arroz en el cultivo de *Leptobarbus hoevenii*.

III. Justificación

En acuicultura es indispensable tener mecanismo de control de amonio, ya que este compuesto nitrogenado tiene una gran influencia en el desarrollo óptimo de los organismos (Caipang & Aguana, 2011), las altas concentraciones de los compuestos nitrogenados causan estrés en el camarón y favorecen la proliferación de patógenos, provocando infecciones, lento crecimiento o la muerte de los organismos (Carroza *et al.*, 2012). De tal manera que el proceso de biotransformación es una eficiente estrategia para disminuir los efectos negativos que producen las elevadas concentraciones de compuestos nitrogenados (Lawson, 2011). Llevado a cabo por la microbiota inducida con características probióticas sobre el cultivo de interés, de tal manera que la capacidad de biotransformación depende de la tasa metabólica de los grupos microbianos. La inclusión de fermento de cereales, como una fuente de carbono con proteínas, carbohidratos y lípidos conformados en cadenas más simples que los salvados, puede ayudar al establecimiento de consorcios microbianos heterótrofos asimiladores de compuestos nitrogenados.

IV. Hipótesis

Considerando que existen bacterias que poseen una mayor capacidad de asimilación de amonio y que el salvado de arroz puede ser una fuente de carbono disponible para promover la ruta asimilatoria. La fermentación de salvado con un consorcio de bacterias selectas, promoverá un control más eficiente de los compuestos nitrogenados generados durante la producción intensiva de especies acuícolas.

V. Objetivo general

Evaluar el potencial del salvado de arroz fermentado con bacterias probióticas para reducir los niveles de amonio en la acuicultura.

VI. Objetivos específicos

1. Seleccionar un consorcio de bacterias probióticas con capacidad de asimilar amonio.
2. Evaluar las condiciones de fermentación de salvado de arroz
3. Evaluar la capacidad de asimilación de amonio del fermento de salvado de arroz y los factores ambientales que lo modifican
4. Evaluar la suplementación del salvado de arroz fermentado con una fuente de carbono suplementaria para potenciar la capacidad de asimilación de amonio.

VII. Materiales y métodos

Fuente de Carbono

En el presente trabajo, se evaluó el uso de salvado de arroz como fuente de carbono. El salvado fue proporcionado por la empresa Larvas Gran Mar S.A. de C.V., este fue tamizado a 200 μm y fue almacenado en refrigeración hasta su uso. Para la experimentación, el salvado fue preparado en suspensión con agua de mar, y posteriormente digerido enzimáticamente con el propósito de aumentar la disponibilidad de azúcares reductores antes de iniciar la fermentación microbiana.

Fuente de enzima

En el presente trabajo, se utilizó α -amilasa de origen microbiano y una suspensión enzimática denominada Biozyme 1, usadas actualmente en la producción comercial de camarón. De acuerdo con el proveedor, la enzima α -amilasa es una carbohidrasa alcalina producida por *Bacillus amyloliquefaciens* la cual hidroliza aleatoriamente, los enlaces glucosídicos dentro de las cadenas del almidón, es activa a pH de 4.0 a 8.5 y temperaturas de 25 a 80 °C y fue proporcionada en una suspensión con $7 \cdot 10^6$ UBE \cdot L⁻¹. La mezcla Biozyme 1 contiene: $1.2 \cdot 10^6$ FIP \cdot L⁻¹ de Lipasa, $7 \cdot 10^6$ UBE \cdot L⁻¹ de α -amilasas, $3.34 \cdot 10^6$ U \cdot L⁻¹ de hemicelulasa y $1.21 \cdot 10^8$ DU \cdot L⁻¹ de proteasas.

Bacterias usadas en el presente estudio

Para el presente estudio se utilizaron diferentes cepas de *Bacillus* spp que están depositadas en la colección de CICIMAR IPN, las cuales fueron aisladas de organismos acuáticos y sedimentos marinos; la fuente de su aislamiento e identificación se resumen en la Tabla 1. Adicionalmente se utilizó la cepa *Bacillus subtilis* (6051) de la colección

American Type Culture Collection (ATCC). Todas las cepas fueron mantenidas a -80 °C con 50 % de glicerol y cultivadas en placas de agar marino (Agua de mar filtrada 1 L, extracto de levadura 1 g, peptona de carne 5 g y agar bacteriológico 17 g); e incubadas a 30 °C por 24 h. Para los experimentos las cepas fueron re suspendidas en solución salina al 2.5 % NaCl ajustadas a densidad óptica de 1 a 585 nm ($DO_{585} = 1$) en un (Spectroquant 118 MERCK) y la densidad de bacterias en cada suspensión fue determinado como el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mL. Para ello, se realizaron diluciones seriales de cada bacteria en solución salina al 2.5 % NaCl, y se inocularon por triplicado alícuotas de 10 μ L en placas de Agar Marino de acuerdo con el método descrito por Herigstad *et al.*, (2001) y se incubaron a 30 °C por 24 horas. El número de colonias en con cada dilución fue contabilizado y el número de bacterias se calculó mediante la ecuación:

$$y = a/(10^x)$$

donde "x" es dilución; "y" el número de UFC· mL⁻¹ a esa dilución y "a" (ordenada al origen) que representa el número de UFC mL⁻¹ en la suspensión sin diluir. "a" fue calculada en el programa STATISTICA 10 (StatSoft) para Windows.

Tabla 1: Cepas usadas para la evaluación de la capacidad de asimilación de amonio.

Cepa	Clave	Especie	Fuente
1	Bs	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6051)	Cepa tipo
2	BSB	<i>Bacillus subtilis</i>	Larvas de camarón
3	Be12Ch	<i>Bacillus aerophilus</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>
4	4	<i>Bacillus megaterium</i>	Sedimento marino
5	Cblta	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>
6	Be12G	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>
7	C10ltaG	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>
8	C10ltaCh	<i>Bacillus tequilensis</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>
9	139.1	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Crassostrea gigas</i>
10	Cc	<i>Bacillus oceanisedimentis</i>	Sedimentos marinos

7.1 Efecto de la concentración de enzimas sobre la disponibilidad de azúcares reductores del salvado de arroz

El efecto de distintas concentraciones de enzimas sobre la disponibilidad de azúcares reductores del salvado de arroz fue evaluado *in vitro*. Para ello, una suspensión de salvado de arroz 1:40 (salvado de arroz: agua de mar a 35 UPS) fue colocada por triplicado en tubos de plástico de 50 mL (45 mL de agua de mar y 1.125 gr de salvado de arroz por tubo) y esterilizada en autoclave (121 °C y 15 psi durante 15 minutos). A los tubos se agregaron diferentes volúmenes de Biozyme 1 (50, 100, 300 y 1000 µL) partiendo de una suspensión ajustada a 5950 UBE·100 mL⁻¹ y se incubaron a 30 °C con agitación continua usando un TUBE shaker (Labquake, Barnstead-Thermolyne) a 150 RPM. Para evaluar la cantidad de azúcares reductores, de cada tubo se tomaron muestras de 200 µL cada 60 minutos por un periodo de cuatro horas.

Para medir los azúcares reductores en las muestras se utilizó una modificación del método de Miller (1959). Para ello, se preparó de ácido dinitrosalicílico (DNS) (ácido 3,5 dinitrosalicílico 10 g, KNaC₄H₄O₆·4H₂O 300 g, NaOH 0.5 N 800 mL, aforado en 1 L de agua destilada), de cada muestra, se extrajeron 200 µL, se mezcló con 200 µL de reactivo DNS, la mezcla se homogeneizó y se calentó a 100 °C por 10 minutos, posteriormente a cada mezcla de reacción se agregaron 1000 µL de agua de mar estéril. Para determinar la concentración de azúcares por muestra, el valor de absorbancia de cada muestra a 540 nm; fue introducido al modelo de regresión de la curva patrón de glucosa (D-glucosa: C₆H₁₂O₆) construida con 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, y 2 gr. L⁻¹ (Figura 2). En los casos que el valor de la lectura fue superior al de la curva patrón, se procedió a realizar diluciones

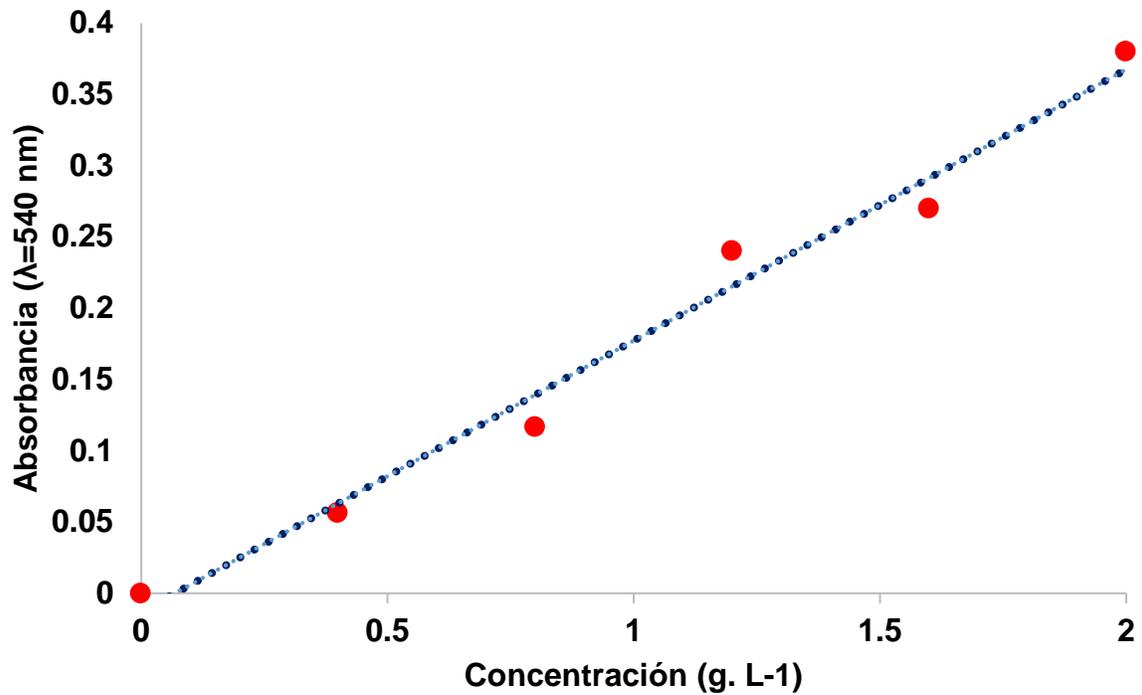


Figura 2: Curva patrón de glucosa utilizada para la determinación de azúcares reductores en los experimentos con ecuación $y=0.1902x - 0.013$ y un $r = 0.9812$.

Los valores de azúcares reductores obtenidos durante la experimentación fueron analizados para determinar si cumplían con normalidad y homocedasticidad (D'Agostino & Pearson), posteriormente fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias entre tratamientos se analizaron mediante un análisis de comparaciones múltiples por medio de Tukey (HSD). Para los análisis se utilizó el software STATISTICA 10 (Statsoft).

7.1.1 Efecto de la temperatura sobre la liberación de azúcares reductores del salvado de arroz mediante tratamiento enzimático

El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática determinó mediante el procedimiento descrito en el apartado 7.1. Brevemente, en diferentes tubos con suspensión de salvado de arroz previamente esterilizados se agregaron 100 μL de α -amilasa [equivalentes a 5950 UBE.100 mL^{-1}]. Los tubos fueron incubados a 25, 30 y 35 $^{\circ}\text{C}$. Se determinó la concentración de azúcares reductores mediante la técnica de azúcares reductores totales a los 0, 20, 40, 60, 120, 180 y 240 minutos de incubación. Cada temperatura fue analizada por triplicado.

7.1.2 Evaluación de diferentes presentaciones de una mezcla comercial de enzimas sobre la liberación de azúcares reductores del salvado de arroz

Se evaluaron diferentes formas de presentación de la mezcla enzimática Biozyme 1 para descartar que la actividad enzimática determinada en el presente estudio estuviera influenciada por contaminación durante los ensayos de actividad. Para ello se prepararon tres presentaciones a) Suspensión líquida (presentación comercial), b) Suspensión líquida esterilizada mediante filtración por membrana de 0.22 μm (PVDF de baja afinidad de proteínas) y c) Enzimas liofilizadas y rehidratada en agua estéril. Cada una de las presentaciones de la enzima se evaluó en matraces de 250 mL. En cada matraz se colocaron 150 mL de la suspensión de salvado de arroz en agua de mar a una relación de 1:40 (3.75 g de salvado de arroz y 150 mL de agua de mar). Los matraces fueron esterilizados en autoclave (121 $^{\circ}\text{C}$ y 15 psi, durante 15 minutos). A los matraces se les aplicó 375 μL de la mezcla de enzimas y se pusieron a incubar a 30 $^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. De cada matraz se tomaron muestras en condiciones estériles a las 0, 2, 4, 6, 12 y 24 h, para determinar la concentración de azúcares reductores. Las muestras se fijaron con 375 μL de ácido tricloroacético al 10% y posteriormente se determinó la cantidad de azúcares disponibles mediante la técnica de DNS. Cada condición se evaluó por triplicado y simultáneamente se colocaron controles sin enzimas.

7.2 Selección de cepas probióticas con alta capacidad de asimilación de amonio

7.2.1 Evaluación de la capacidad de cepas de *Bacillus* para asimilar amonio como única fuente de nitrógeno

La capacidad de asimilar amonio se evaluó en un medio definido usando cloruro de amonio y glucosa como únicas fuentes de nitrógeno y carbono respectivamente. Se partió de una concentración de 4 mg· L⁻¹ de amonio, considerando que es una concentración elevada para cultivo de camarón blanco (Valencia-Castañeda *et al.*, 2018).

Para la evaluación, cultivos de 24 h en placas de agar marino fueron cosechados y suspendidos en solución salina al 2.5 % de NaCl, a una DO₅₈₅ = 1 en espectrofotómetro MERCK SQ118 (equivalente a 1.2·10⁹ UFC. mL⁻¹). Las suspensiones de cada bacteria fueron inoculadas en tubos de ensaye a una tasa de 1 mL por tubo con 10 mL de medio de prueba a 4 mg· L⁻¹ de amonio (0.0119 g· NH₄Cl y 10 g·D-glucosa en 1 L de agua de mar). Los tubos se incubaron por 24h a 30 °C con agitación continua en un TUBE shaker (Labquake, Barnstead-Thermolyne).

A las 24 horas, se determinó la concentración de amonio en cada tubo, utilizando el Kit LYSA® conforme a las indicaciones del proveedor (Apéndice 1). Cada cepa se evaluó por triplicado y durante el experimento se mantuvo un tubo sin inocular como control. El valor de asimilación para cada cepa se calculó con la siguiente ecuación:

$$[\text{NH}_4]_{\text{Asimilado}} = [\text{NH}_4]_{\text{inicial}} - [\text{NH}_4]_{\text{final}}$$

Las cepas con mayor capacidad de asimilación de amonio fueron seleccionadas para experimentos sucesivos.

7.2.2 Evaluación del crecimiento de las cepas de *Bacillus* con amonio como única fuente de nitrógeno.

El crecimiento de las cepas con mayor capacidad de asimilación de amonio y se registró como con el colorimétrico API® y se aumentó la concentración de amonio utilizando fosfato monobásico de amonio [10 mg· L⁻¹] en cada una de las muestras. El crecimiento se evaluó en 24 h conforme a la metodología descrita en el apartado 7.2.

7.2.3 Cinética de consumo de amonio por cepa seleccionada.

Para cada una de las cepas seleccionadas se determinó la capacidad de asimilar amonio en un periodo de 24 h. Para tal efecto se aumentó la concentración de amonio en el medio de cultivo a 10 mg· L⁻¹ y la evaluación se realizó en matraces Erlenmeyer con 200 mL de medio, la evaluación se realizó por triplicado para cada una de las cepas seleccionadas. Los matraces fueron inoculados con 1 mL de una suspensión de bacterias a una DO₅₈₅ = 1 y fueron incubados en un shaker a 30 °C. A las 0, 3, 6, 12 y 24 h, se tomaron 5 mL de cada matraz en condiciones asépticas y la concentración de amonio en cada muestra se determinó usando el kit API® conforme las instrucciones del proveedor.

7.2.4 Efecto del tamaño de inóculo sobre el consumo de amonio

Para determinar el efecto del tamaño del inóculo sobre la asimilación de amonio de cada bacteria y la relación con el crecimiento celular, cada cepa se preparó en suspensión a una DO₅₈₅ = 2 con cultivos de 24 h, y se realizaron cuatro diluciones seriadas al 50 % con solución salina estéril al 2.5 % NaCl. Cada dilución fue inoculada en matraces de 500 mL con 200 mL de medio de amonio-glucosa a 10 mg· L⁻¹ de amonio. Los matraces fueron incubados a 30 °C y mantenidos en aireación constante. A las 0, 3, 6 y 12 h, se tomaron muestras de 5 mL en condiciones asépticas y se determinó la concentración de

amonio mediante el kit de API® siguiendo las instrucciones del proveedor, el crecimiento celular en cada condición se determinó como el cambio en absorbancia a 585 nm con un espectrofotómetro MERCK SQ118.

7.3 Integración de digestión enzimática y fermentación bacteriana del salvado de arroz

Se analizó el efecto conjunto de la digestión enzimática y fermentación microbiana del salvado de arroz sobre la dinámica de liberación de azúcares reductores, el crecimiento bacteriano y la capacidad del salvado de arroz fermentado para reducir el amonio bajo condiciones que emulan las de un sistema acuícola. Para ello inicialmente se seleccionó la cepa de referencia *Bacillus subtilis* ATCC (Modelo I) y posteriormente se analizó el efecto del uso de todas las cepas seleccionadas en forma de consorcio (Modelo II).

7.3.1 Modelo I. Fermentación de salvado de arroz con *Bacillus subtilis*

La fermentación del salvado de arroz se realizó en tubos de 50 mL con 40 mL de una suspensión estéril de salvado de arroz (1 g de salvado de arroz en 40 mL de agua de mar). Se agregaron 100 µL de enzimas digestivas Biozyme 1 y se incubaron durante 4 horas a 30 °C a 150 RPM en un TUBE shaker (Labquake, Barnstead-Thermolyne). Posteriormente cada tubo fue inoculado con 1 mL de una suspensión de células de 24 h de cultivo a $DO_{585} = 1$ de *Bacillus subtilis* (ATCC 6051) y se mantuvieron en incubación a 30 °C en agitación constante por 72 h. En condiciones asépticas se tomaron muestras de cada tubo a las 0, 12, 24, 48 y 72 h de incubación. De cada muestra se determinó la concentración de azúcares reductores mediante la técnica de DNS, se cuantificó el número de bacterias mediante diluciones seriales y siembra en placa.

La capacidad de asimilar amonio del salvado de arroz fermentado se evaluó en matraces de 200 mL con 98 mL de agua de mar estéril, los matraces se prepararon a 100, 50, 20, 10, 5 y 1 mg·L⁻¹ de amonio ajustando con una solución estéril de fosfato de amonio

monobásico ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$). A cada matraz se les añadió 1 mL de salvado de arroz fermentado. Los matraces fueron colocados con aireación constante y fueron incubados por 72 h a 30 °C. De cada matraz se tomaron asépticamente muestras de 5 mL a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 h de incubación, se centrifugaron a 3000 RPM para eliminar los sólidos suspendidos y se determinó la concentración de amonio mediante el kit de API® conforme las especificaciones del proveedor. Cada concentración de amonio se ensayó por triplicado y se colocaron controles sin amonio bajo las mismas condiciones de experimentación.

7.3.2 Modelo II. Consorcio de *Bacillus* spp en la fermentación de salvado de arroz

Para la evaluación conjunta de las cepas seleccionadas; se prepararon suspensiones de cada cepa en solución salina estéril al 2.5 % a partir de cultivos de 24 h de las cepas BS; Be12Ch; Cblta; Be12G; C10ltaG; C10ltaCh y 189.1; cada suspensión se ajustó a $\text{DO}_{585} = 1$ en espectrofotómetro MERCK SQ118. La fermentación del salvado de arroz se realizó en matraces de 1 L con 500 mL de una suspensión estéril de salvado de arroz (12.5 g de salvado de arroz en 500 mL de agua de mar). A cada matraz se le agregaron 1.25 mL de enzimas digestivas Biozyme 1 y se incubaron por 4 h a 30 °C en agitación constante. Posteriormente se le agregó 1 mL de suspensión de cada bacteria y se incubó por 48 h a 30 °C en agitación constante. De cada matraz se tomaron asépticamente muestras de 200 μL a las 0, 1, 2, 3, 4, 12, 24 y 48 h. Cada muestra fue fijada con 200 μL ácido-tricloroacético TCA al 10 % y centrifugada a 3000 RPM para eliminar los sólidos suspendidos, se cuantificó la concentración de azúcares reductores mediante la técnica de DNS. Para determinar la carga bacteriana total, de cada matraz se tomaron muestras asépticamente a las 0, 12, 24 y 48 h y se hicieron diluciones decimales y se sembraron en placas de agar marino. Las placas fueron incubadas a 30 °C por 24 h y contabilizados el número de colonias para determinar los cambios durante el proceso de fermentación, conforme a lo descrito en el Apartado VII.

7.4 Evaluación de los factores que modifican la capacidad de asimilación de amonio con salvado de arroz fermentado

Se analizó el efecto de factores que pueden afectar la eficacia del salvado de arroz como mecanismo de control del amonio en la producción acuícola. Para ello en cada caso se partió de condiciones estándar de fermentación. Brevemente, se usaron matraces de 500 mL con 150 mL de suspensión estéril de salvado de arroz (3.75 g de salvado de arroz en 150 mL de agua de mar). A cada matraz se agregaron 375 μ L de la mezcla enzimática Biozyme 1 y se incubaron por 4 h a 30 °C con aireación continua. Posteriormente a cada matraz se le agregó 1 mL de la suspensión en solución salina de las cepas BS; Be12Ch; Cblta; Be12G; C10ltaG; C10ltaCh y 189.1 preparadas a partir de cultivos de 24 h. Los matraces se incubaron a 30 °C con aireación continua. A las 24 h se cosechó el producto y fue usado para evaluar cada una de los factores que se especifican a continuación. Se especifican los casos donde fue necesario algún cambio este proceso estándar.

7.4.1 Efecto del pretratamiento enzimático del salvado de arroz

El efecto del pretratamiento enzimático del salvado de arroz se evaluó en las condiciones descritas previamente. Para este experimento se consideraron tratamientos con enzimas y sin enzimas y simultáneamente se colocaron controles sin bacterias y blancos sin bacterias ni enzimas conforme se presenta en la tabla 2.

Tabla 2: Tratamientos utilizados para la evaluación.

No.	Tratamiento	Descripción de tratamiento
1	Enzima + bacteria	Con enzimas, con Bacterias
2	Control sin enzimas	Sin enzimas, con Bacterias
3	Control sin bacterias	Con enzimas, sin bacterias
4	Blanco	Sin enzimas, sin bacterias.

Todos los tratamientos se incubaron con agitación a 30 °C y a los tratamientos con enzimas (ver Tabla 3) se le agregaron 375 µL de la mezcla de enzimas (Biozyme 1). A las 4 horas a los tratamientos con bacterias (ver Tabla 2) se le agregó 1 mL de la suspensión de cada bacteria a $DO_{575} = 1$ y se mantuvieron en incubación con aireación continua durante 24 h. En los tratamientos sin enzimas o bacterias, el volumen agregado fue sustituido por solución salina estéril al 2.5% de NaCl. Cada condición fue evaluada por triplicado.

De cada matraz, asépticamente se tomaron muestras de 200 µL a las 0, 1, 2, 3, 4, 12 y 24 h. Cada muestra fue fijada con 200 µL ácido-tricloroacético TCA al 10 % y centrifugada a 3000 RPM para eliminar los sólidos suspendidos, la concentración de azúcares reductores se cuantificó mediante la técnica de DNS. El número de bacterias se evaluó en cada matraz a los 0, 4, 12 y 24 h para ello se tomaron muestras de 1 mL, se diluyeron decimalmente en solución salina estéril 2.5 % NaCl y se sembraron en placas de agar marino. El número de células en cada placa se contabilizó para determinar la carga bacteriana en UFC en cada muestra.

Se determinó la capacidad de asimilación de amonio en matraces con 100 mL de agua de mar estéril a 20 mg· L⁻¹ de amonio (ajustada como se describe previamente). A cada matraz se agregó 1 mL de los productos de cada tratamiento (Tabla 2) y se los matraces se incubaron a 30 °C con aireación continua. De cada matraz se extrajeron muestras de 5 mL a las 0, 4, 12 h para cuantificar el amonio mediante el kit de API®.

7.4.2 Efecto de temperatura

Se colocaron matraces de 200 mL con 100 mL de agua de mar estéril a 10 mg· L⁻¹ de amonio y se les agregó 1 mL de salvado de arroz fermentado. Los matraces se colocaron incubaron a 20, 25, 30, 35, 40 °C con aireación continua. Cada temperatura se evaluó por triplicado. De cada matraz se extrajeron asépticamente muestras de 5 mL a las 0, 6, 12 y 24 h, y se determinó la concentración de amonio mediante el kit API®.

7.4.3 Efecto de salinidad

Se colocaron matraces de 200 mL con 100 mL de solución de fosfato monobásico de amonio [10 mg. L⁻¹] estéril a 5, 15, 25, 35 y 45 UPS previamente esterilizados con autoclave. A cada matraz se inoculó con 1 mL de salvado de arroz fermentado y se colocaron a 30 °C con aireación continua. De cada matraz se extrajeron muestras de 5 mL a las 0, 6, 12 y 24 h para determinar la concentración de amonio. La determinación de amonio se realizó con el método colorimétrico API®.

7.4.4 Efecto de la adición de otras fuentes suplementarias de carbono a FRB sobre la asimilación de amonio

Se evaluó el efecto de la adición suplementaria de melaza, glucosa, inulina y fécula de maíz sobre la eficacia de asimilación de amonio con salvado de arroz fermentado. En matraces de 200 mL con 98 mL de agua de mar estéril a cada matraz se le agregó 1 mL de solución de fosfato monobásico de amonio [4mg. L⁻¹] esterilizada por filtración. Por separado los matraces fueron suplementados con 40 mg de a) melaza, b) glucosa, c) inulina y d) fécula de maíz. Todos los matraces fueron inoculados con 1 mL de salvado de arroz fermentado y se colocaron a 30 °C con aireación continua. De cada matraz se extrajeron muestras de 5 mL a las 0, 6, 12 y 24 h para determinar la concentración de amonio. La determinación de amonio se realizó con el método colorimétrico API®.

7.4.5 Efecto de la concentración de melaza

Para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de fuente de carbono adicional con salvado de arroz fermentado, se seleccionó melaza. Para ello se midió la cantidad de azúcares contenidos en este polisacárido, el cual se realizó mediante la evaluación del coeficiente total de materia seca contenido en ella en grados Brix (°Bx) en un refractómetro HI-96801 (Hanna Instruments), así también, evaluó su efecto durante la asimilación de amonio. Para ello se colocaron matraces de 200 mL con 98 mL de agua de mar estéril, a cada matraz se le agregó 1 mL de solución de fosfato monobásico de amonio [ajustado a 10 mg. L⁻¹] esterilizada por filtración. Por separado los matraces fueron suplementados con melaza a 100, 200, 400 y 600 mg. Todos los matraces fueron inoculados con 1 mL de salvado de arroz fermentado y se colocaron a 30 °C con aireación continua. Cada concentración de melaza se evaluó por triplicado y se colocó un control sin suplementación de melaza. De cada matraz se extrajeron muestras de 5 mL a las 0, 12 y 24 y 48 h para determinar la concentración de amonio. La determinación de amonio se realizó con el método colorimétrico API® conforme las indicaciones del proveedor.

VIII. RESULTADOS

8.1.1 Efecto de la concentración de enzimas sobre la disponibilidad de azúcares reductores del salvado de arroz

El salvado de arroz sin ningún tratamiento enzimático, contiene de manera natural $\sim 1.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de azúcares reductores. Este valor se mantuvo prácticamente sin cambios a lo largo de una incubación de 4 h a 30°C en agua de mar. Se observa que al aplicar un volumen de $50 \mu\text{L}$ de enzimas se generan $\sim 6.5 \pm 0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de azúcares reductores, mientras que con 100 , 300 y $1000 \mu\text{L}$ de enzima, existe una liberación de $\sim 13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de azúcares reductores a los 240 minutos azúcares, en todos los casos el comportamiento en la liberación de azúcares sigue una tendencia típica en la generación de producto dentro de una reacción enzimática (Figura 3). Al realizar un análisis de varianza con los valores finales de cada tratamiento, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.001$), al realizar comparaciones múltiples (Tuckey HSD) se encontró que en todos los casos en que se aplicaron enzimas, la concentración final de azúcares reductores fue mayor y que a concentraciones de 100 , 300 y $1000 \mu\text{L}$ de enzimas no hay diferencia en el resultado final a las 4 horas de incubación.

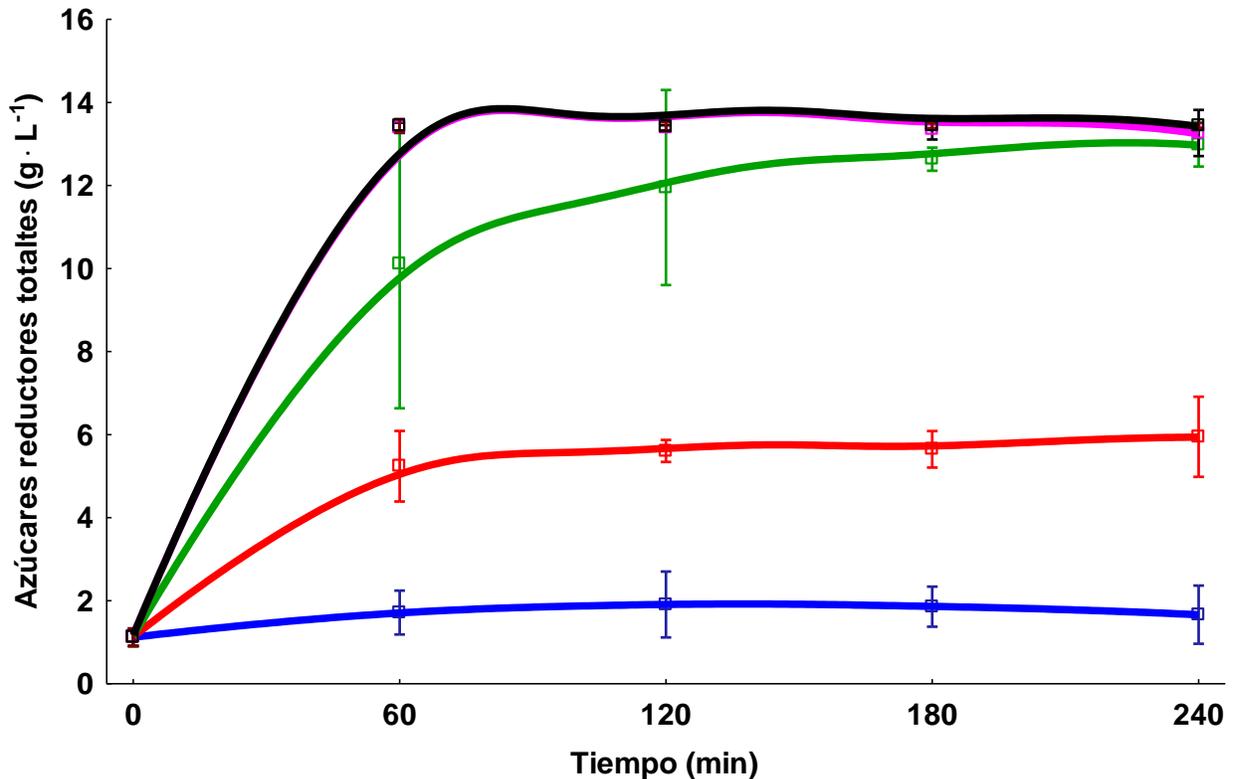


Figura 3: Cinéticas de producción de azúcares reductores a partir de una suspensión de salvado de arroz, con diferentes concentraciones de enzimas (■=0; ■=50; ■=100; ■=300 y ■= 1000 μL). Los datos son la media y a la desviación estándar ($n = 3$) y la línea representa la línea de tendencia en cada condición.

8.1.3 Efecto de la temperatura sobre la liberación de azúcares reductores del salvado de arroz mediante tratamiento enzimático

Se observó que a baja temperatura ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) las enzimas usadas en el presente estudio prácticamente no tienen actividad (Fig. 4) y el valor máximo alcanzado de azúcares reductores es $\sim 2.7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, el cual no es estadísticamente diferente del control sin enzima ($P > 0.05$). Por el contrario, se observa que, a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, las enzimas usadas liberan $\sim 13\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de azúcares reductores en 4 h. Al evaluar mediante un análisis múltiple de varianza, se encontraron diferencias significativas ($p > 0.001$) entre los tratamientos con

y sin enzimas, y la temperatura afectó significativamente la liberación de azúcares reductores se encontraron diferencias significativas entre todos los tratamientos con enzimas a las diferentes temperaturas ($P < 0.001$) pero no se registraron diferencias en el rendimiento final obtenido con enzimas a 30 y 35 °C.

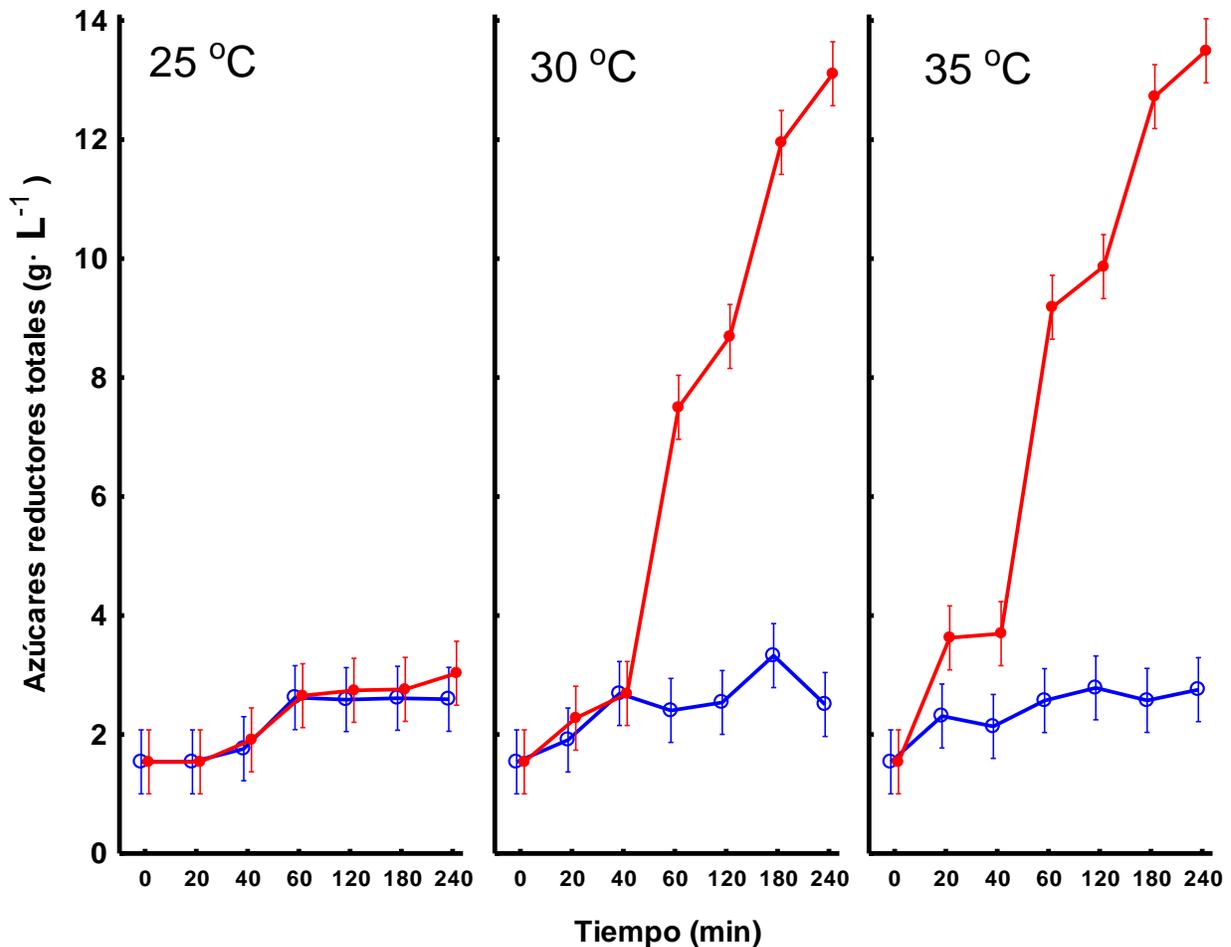


Figura 4: Cinéticas de producción de azúcares reductores a partir de una suspensión de salvado de arroz tratado con una mezcla de enzimas e incubada a diferentes temperaturas. En cada temperatura se evaluó un tratamiento enzimático (■) y un control sin enzimas (□). Los datos son la media y a la desviación estándar ($n = 3$).

8.1.4 Evaluación de diferentes presentaciones de una mezcla comercial de enzimas sobre la liberación de azúcares reductores del salvado de arroz

Se observaron diferencias significativas en la liberación de azúcares reductores totales con las diferentes presentaciones de enzimas ($P < 0.05$). Con las enzimas liofilizadas y rehidratadas se determinó un rendimiento final de $12.41 \pm 0.007 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de azúcares reductores, mientras que con las enzimas líquidas y líquidas esterilizadas por filtración se obtuvo un rendimiento final de $13.89 \pm 0.016 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ y $13.99 \pm 0.018 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ respectivamente, sin haber diferencias significativas entre las líquidas esterilizadas y no esterilizadas ($P > 0.05$). En el control sin enzimas se determinó una concentración final de $\sim 2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de azúcares reductores (Fig. 5).

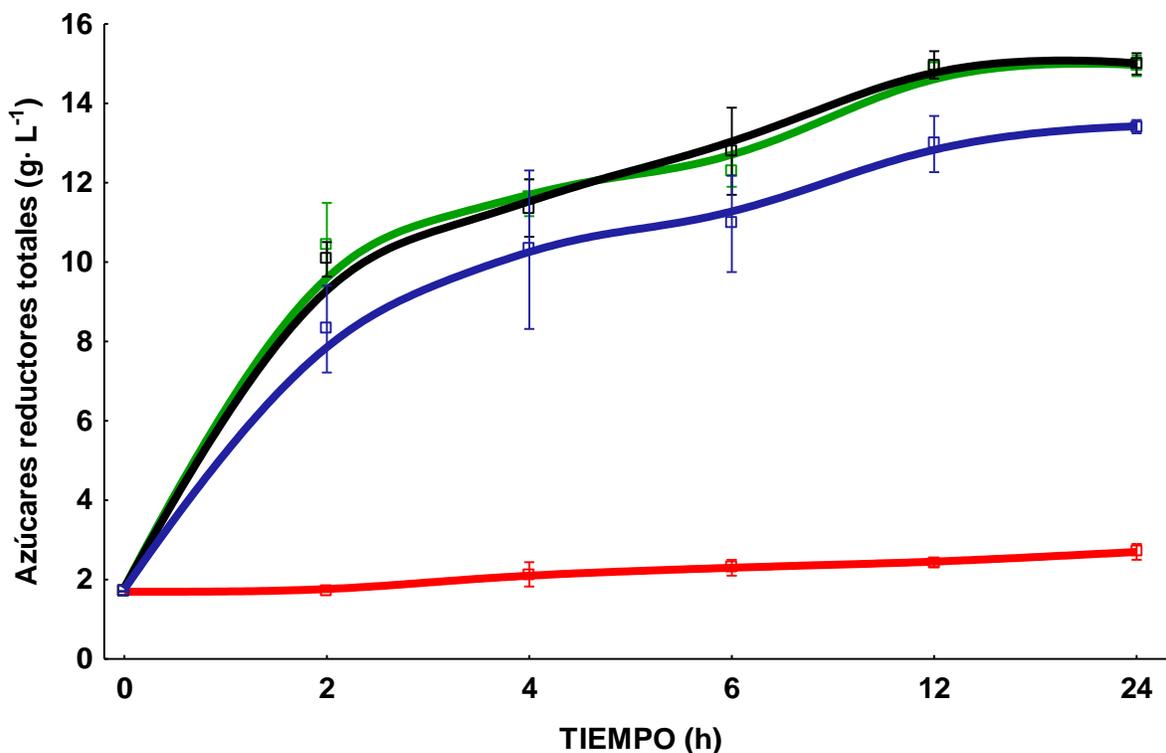


Figura 5: Cinéticas de la producción de azúcares reductores con enzimas hidrolíticas sobre una suspensión de salvado de arroz. Las curvas corresponden a enzimas líquidas sin esterilizar (■); esterilizadas por ultrafiltración (■) liofilizadas (■); y un control sin enzimas (■), los datos son la media y a la desviación estándar ($n = 3$).

8.2.1 Capacidad de cepas de *Bacillus* para asimilar amonio como única fuente de nitrógeno

Aparentemente todas las cepas probadas son capaces de usar el amonio como única fuente de nitrógeno. A excepción de la cepa BSB la cual aparentemente genera un incremento en los niveles de amonio en el medio. Las cepas que presentaron un nivel mayor de asimilación de amonio fueron las cepas BS, Be12Ch, Cblta, Be12G, C10ltaG, C10ltaCh, 139.1. Las cuales tuvieron una asimilación de amonio mayor a 3 mg en 24 h (>75%) (Figura 6).

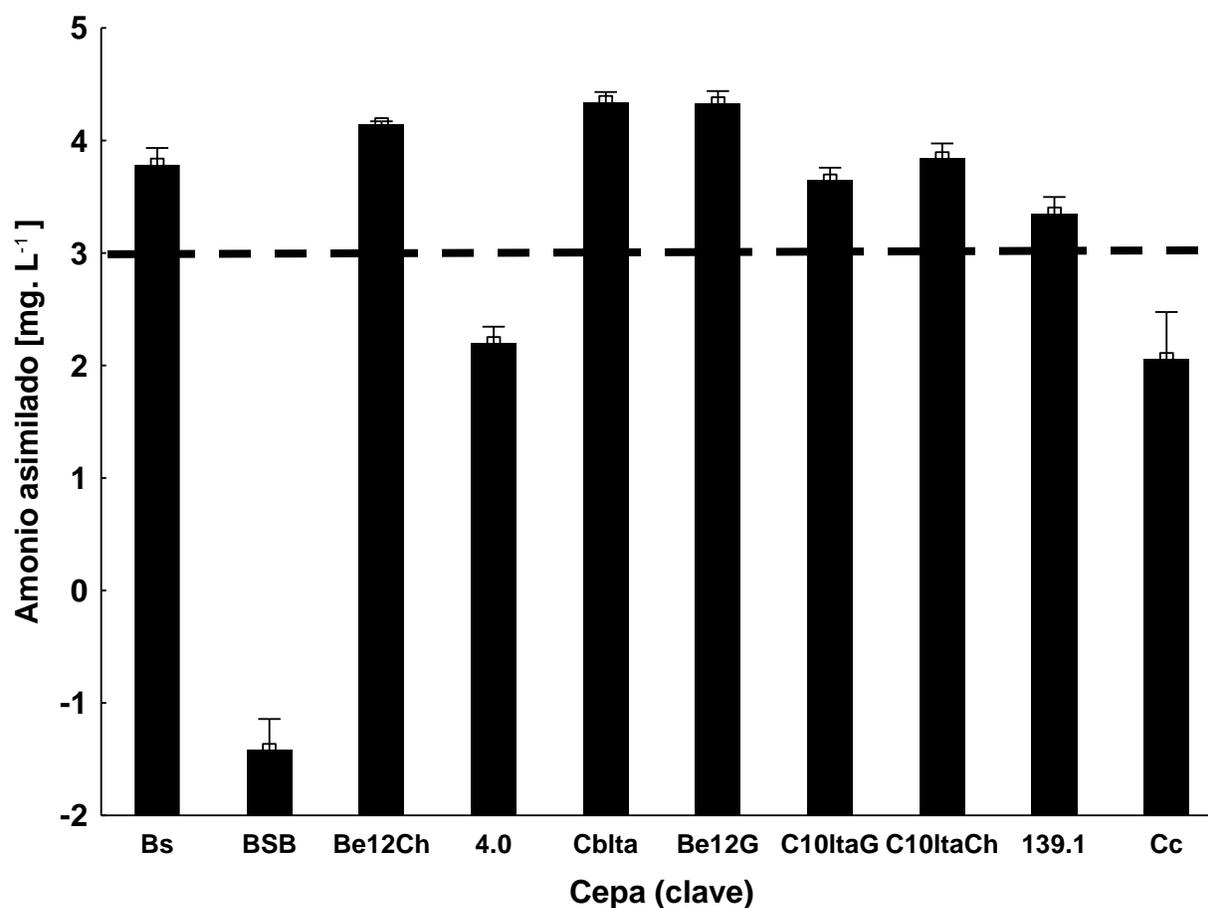


Figura 6: Niveles de asimilación de amonio por cepas de *Bacillus* spp cultivadas por 24 h en un medio con amonio como única fuente de nitrógeno e incubadas a 30 °C, 35 UPS y en agitación constante (150 RPM). Los valores son la media y la desviación estándar (n=3).

8.2.2 Evaluación del crecimiento de las cepas de *Bacillus* con amonio como única fuente de nitrógeno

En lo que respecta al crecimiento de las cepas, con un $\alpha = 95\%$ en todas las cepas, se encontraron diferencias significativas en el conteo de UFC $\cdot \text{mL}^{-1}$, siendo la que mayor crecimiento Cblta ($2.93 \cdot 10^8$) y con menor crecimiento 139.1 ($5.65 \cdot 10^7$) (Fig. 7).

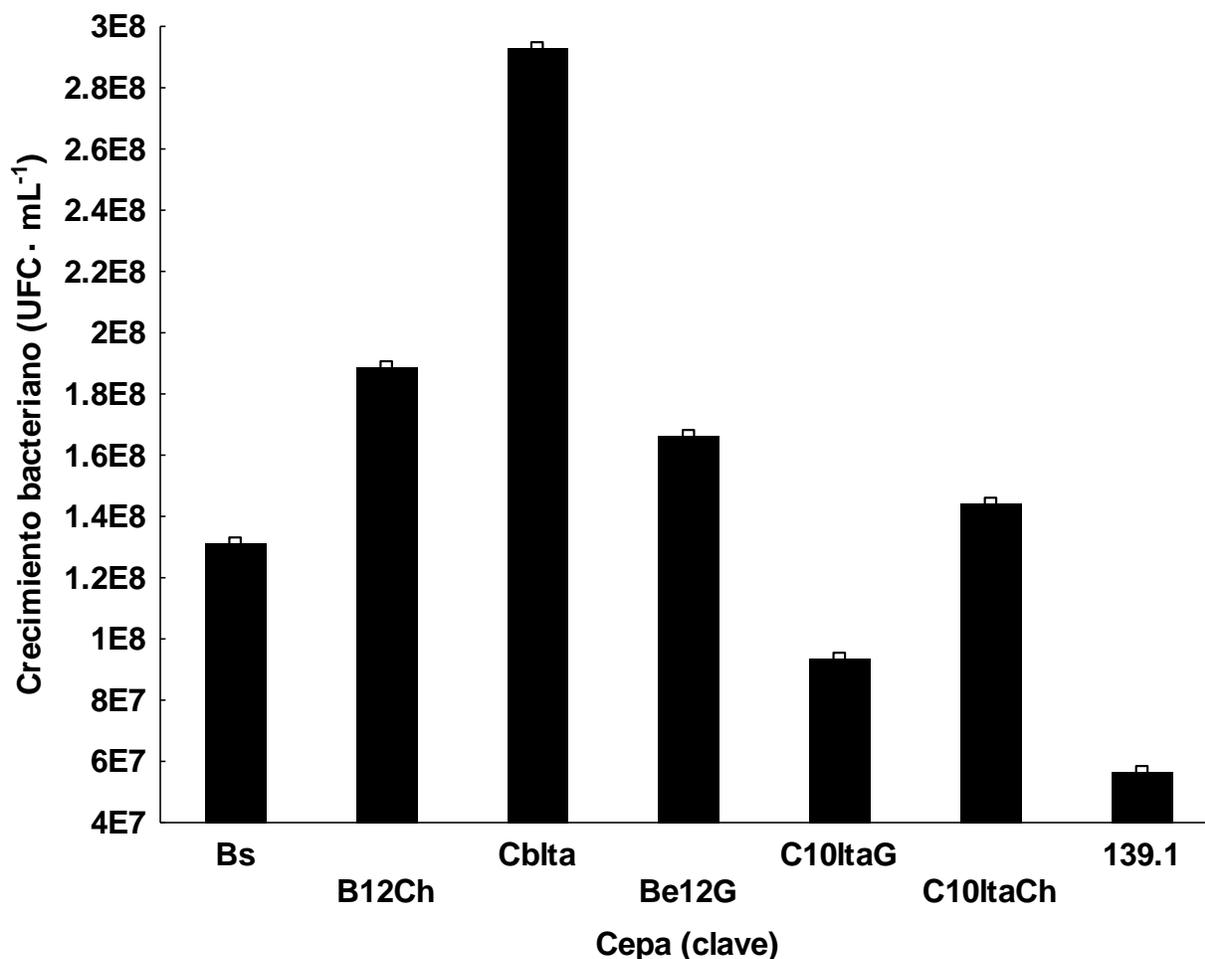


Figura 7: Crecimiento de diferentes cepas de diferentes cepas de *Bacillus* spp a 24 h de incubación en un medio de amonio-glucosa [$10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$] a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 35UPS y en agitación constante (150 RPM), datos absolutos pertenecientes al modelo de regresión desarrollados a partir de un $\alpha = 0.05$ y una desviación estándar = 3.

8.2.3 Cinética de consumo de amonio por cepa seleccionada.

Con todas las cepas evaluadas, la concentración de amonio tiende a cero a las 24 h de incubación (Fig. 10). Mediante un análisis de varianza de medidas repetidas se determinó que existen diferencias significativas entre las cepas a las primeras 3 horas de incubación, la tasa de asimilación fue mayor con las cepas C10ltaG, C10ltaCh y 139.1, y esta diferencia se mantiene hasta las 6 horas. En todos los casos hacia las 24 horas, se registró una reducción en la concentración de amonio a $< 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Fig. 8).

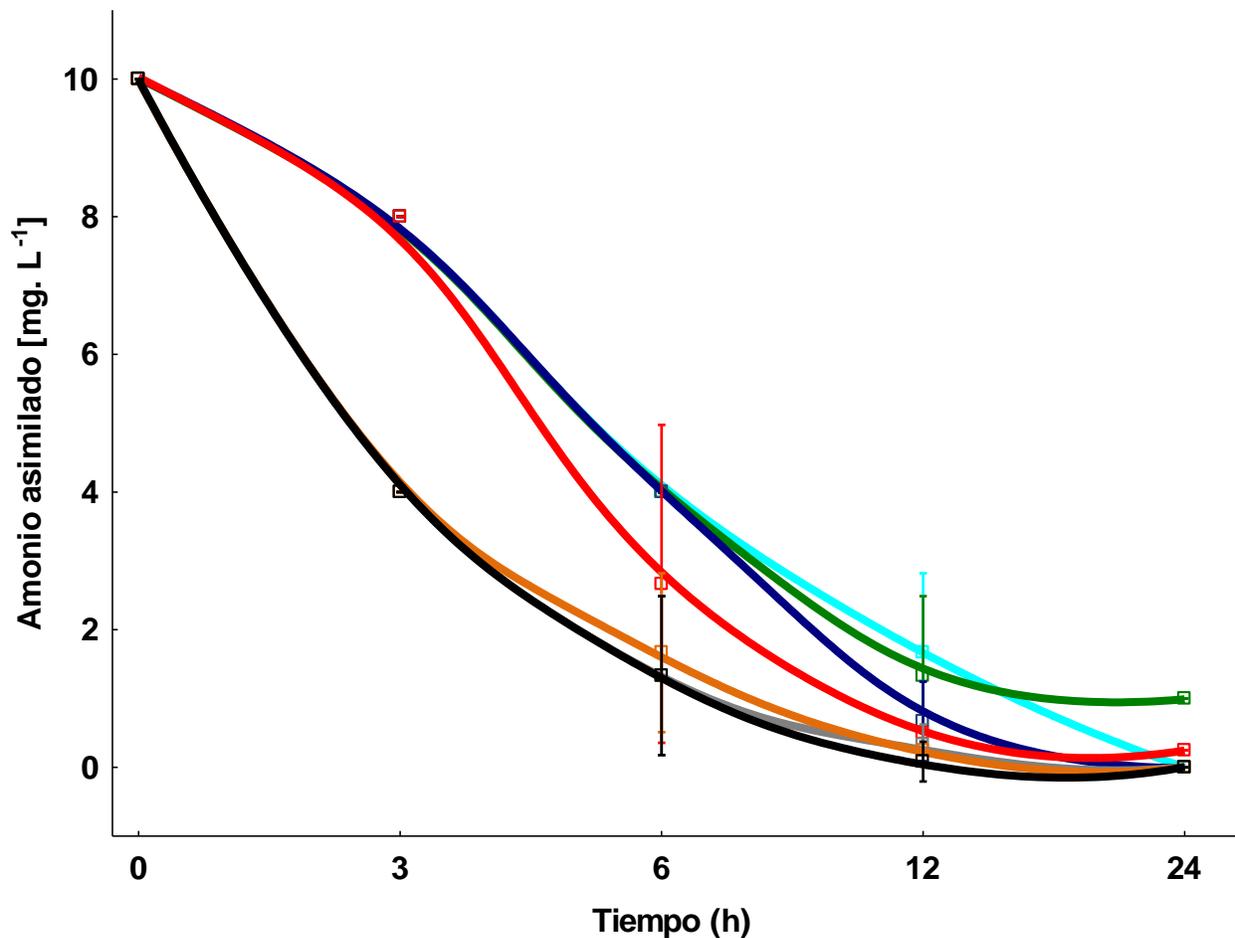


Figura 8: Cinética de la concentración de amonio en un medio definido inoculado con diferentes cepas de *Bacillus* spp. (■=Bs; ■=Be12Ch; ■=Cblta; ■=Be12G; ■=C10ltaG; ■=C10ltaCh; ■=139.1). Los datos son la media y a la desviación estándar (n = 3).

8.2.4 Efecto del tamaño de inóculo sobre el consumo de amonio

A través de un inóculo inicial con una $DO_{585} = 2$ y sus diluciones seriadas al 50% (10^5) de cada una de las cepas y se realizó el monitoreo del consumo de amonio [$10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$] en un periodo de 12 h, donde se observó un consumo de amonio a partir de 6 h de 10 a 4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, a partir de una $DO_{585} = 1$ en todas las cepas, hacia el tiempo final (12 h) se asimiló por completo el compuesto nitrogenado ($0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) a partir de una $DO_{585} = 1$, con diferencias significativas en el consorcio de *Bacillus* seleccionado (Figura 9 y 10).

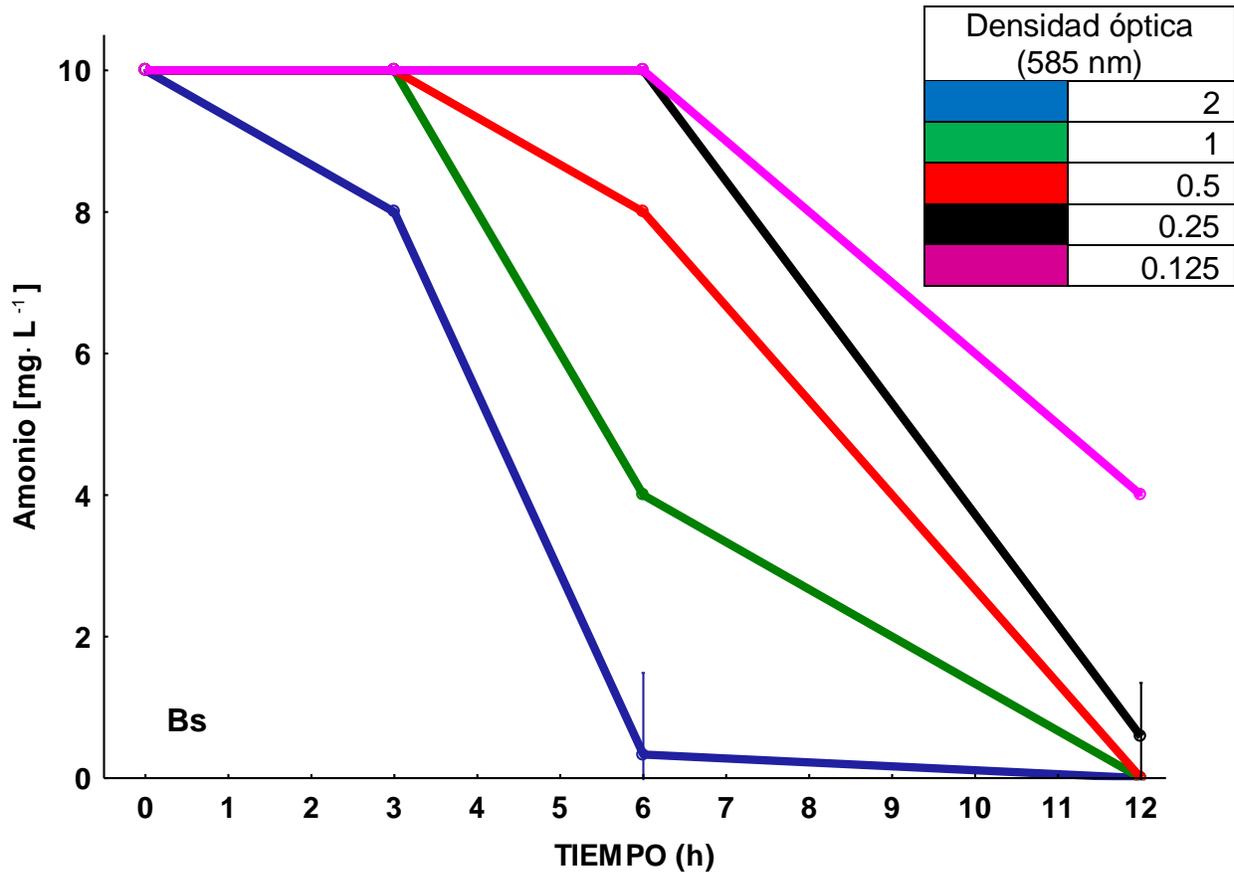


Figura 9: Asimilación de amonio a partir de una concentración inicial = $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ por cepa Bs y sus diluciones al 50% a través del tiempo (12 hr).

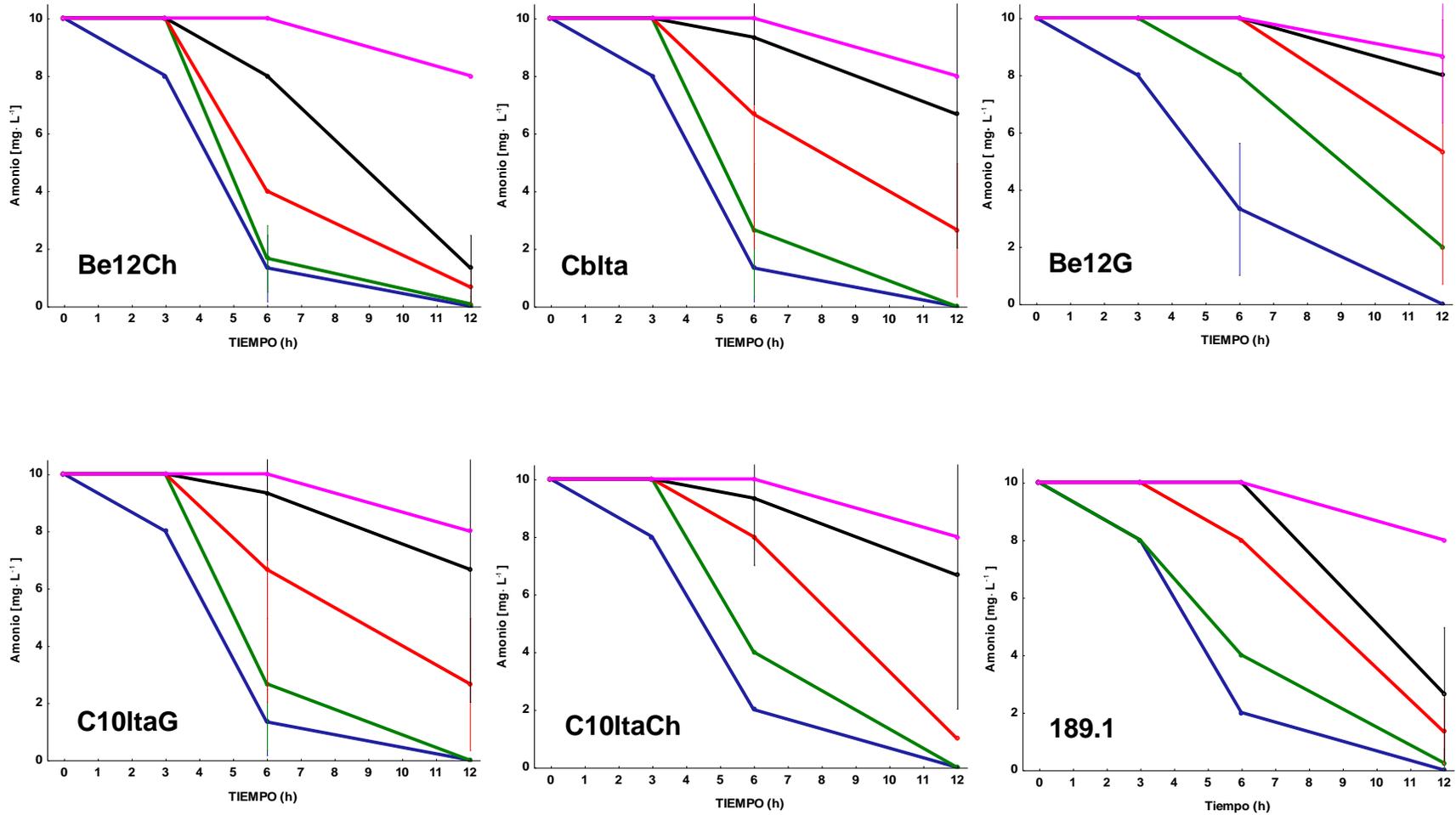


Figura 10: Asimilación de amonio a partir de una concentración inicial = 10 mg· L⁻¹ por las cepas: Be12Ch; Cblta; Be12G; C10ItaG; C10ItaCh; 189.1 y sus diluciones al 50% a través del tiempo (12 hr)

8.3 Integración de digestión enzimática y fermentación bacteriana del salvado de arroz

8.3.1 Modelo 1. Fermentación de salvado de arroz con *Bacillus subtilis*

Durante la integración del proceso enzimático con *B. subtilis* se observa una producción de azúcares reductores totales = $13.74 \pm 0.004 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ a las 24 horas y posteriormente el valor se mantiene prácticamente sin cambios hasta las 24 h de incubación (Figura 11).

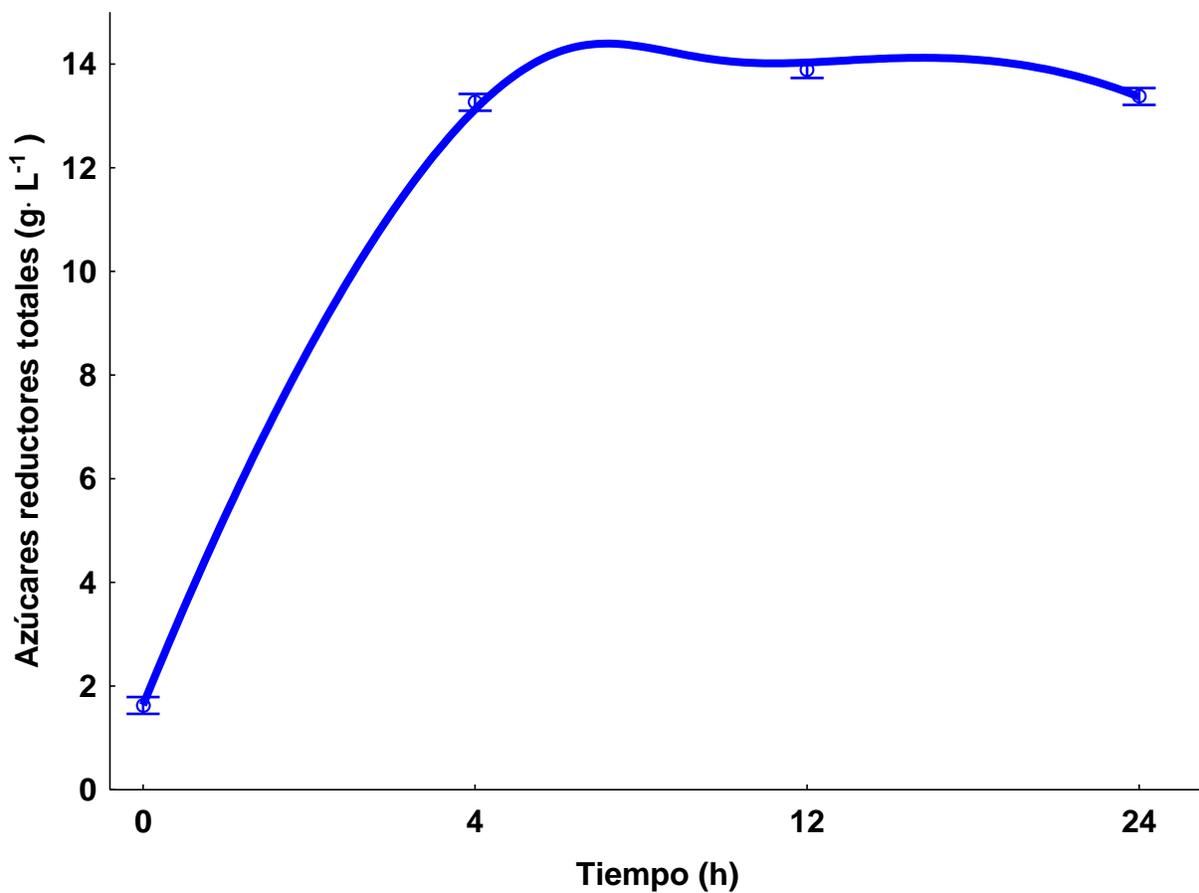


Figura 11: Disponibilidad de azúcares reductores durante el tratamiento de salvado de arroz con una mezcla enzimática y fermentada con la cepa Bs (*Bacillus subtilis* ATCC 6051). Los datos son la media y a la desviación estándar ($n = 3$).

8.3.2 Capacidad de asimilación de amonio por salvado de arroz fermentado por *Bacillus subtilis* (ATCC).

Los resultados de asimilación mostraron que a las mayores concentraciones de amonio evaluadas (100, 50 mg·L⁻¹) el amonio es asimilado a partir de las 12 h, y para las 24 h presentaron una reducción de aproximadamente 20 mg·L⁻¹. En ambos casos el valor permanece sin cambios hasta las 72 h de evaluación. El proceso de asimilación fue más prolongado a la concentración inicial de 20 mg·L⁻¹ de amonio donde se observó una reducción a partir de las 12 horas. En todos los casos donde se puso una concentración igual o menor que 20 mg·L⁻¹ el amonio es prácticamente eliminado entre 12 y 48 h (Fig. 12).

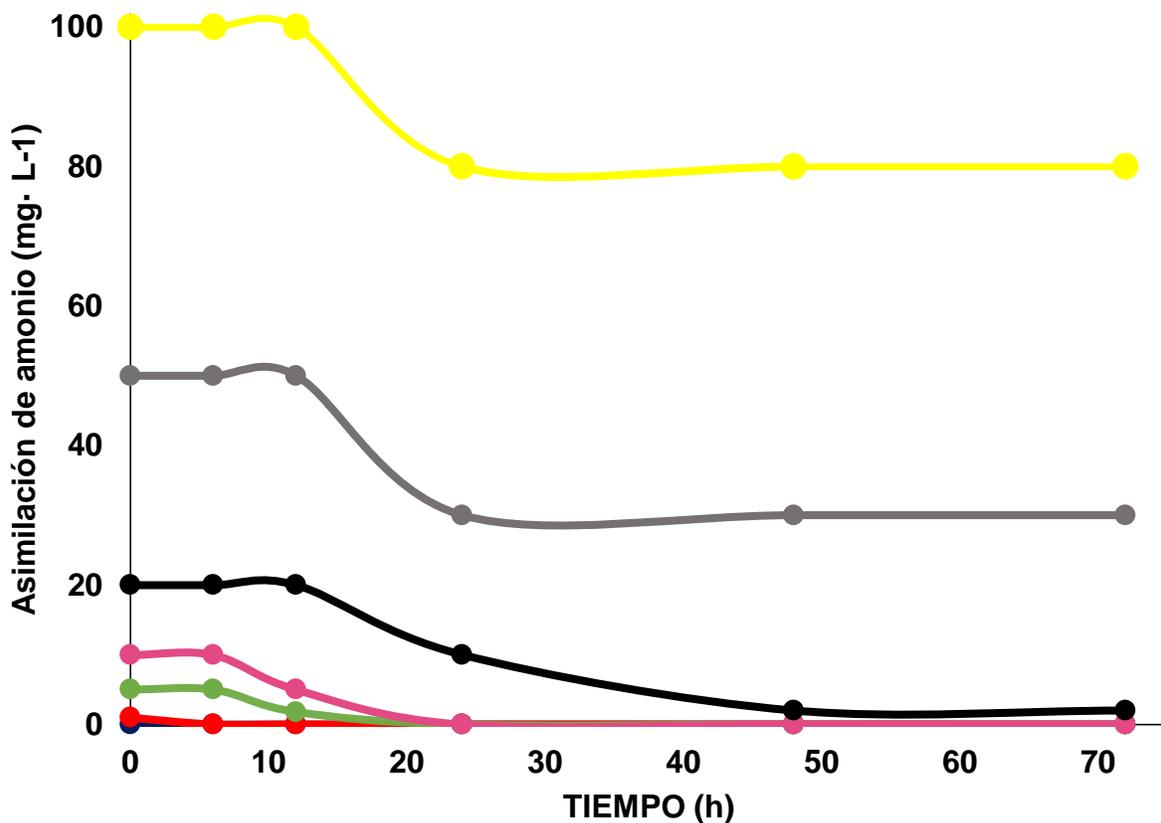


Figura 12: Comportamiento de la concentración de amonio en agua de mar, usando salvado de arroz fermentado con la cepa Bs (*Bacillus subtilis* ATCC6051) a diferentes concentraciones de amonio inicial. Los datos son el promedio de tres replicas.

8.3.3 Modelo 2. Fermentación de salvado de arroz con un consorcio de *Bacillus* spp

Durante la fermentación con el consorcio de *Bacillus* spp se observó que los azúcares reductores aumentan en las primeras 4 h y llegan a su máximo a las 12 h (13.36 ± 0.02 g. L⁻¹) y se mantiene sin cambios aparentes hasta las 48 h, *Bacillus* spp. inician su fase exponencial a las 12 h y llega a su máximo de crecimiento a las 24 h para pasar a su fase estacionaria y mantenerse sin cambios hasta las 24 h formando una curva de crecimiento típica, con una $P > 0.05$ (Figura 13).

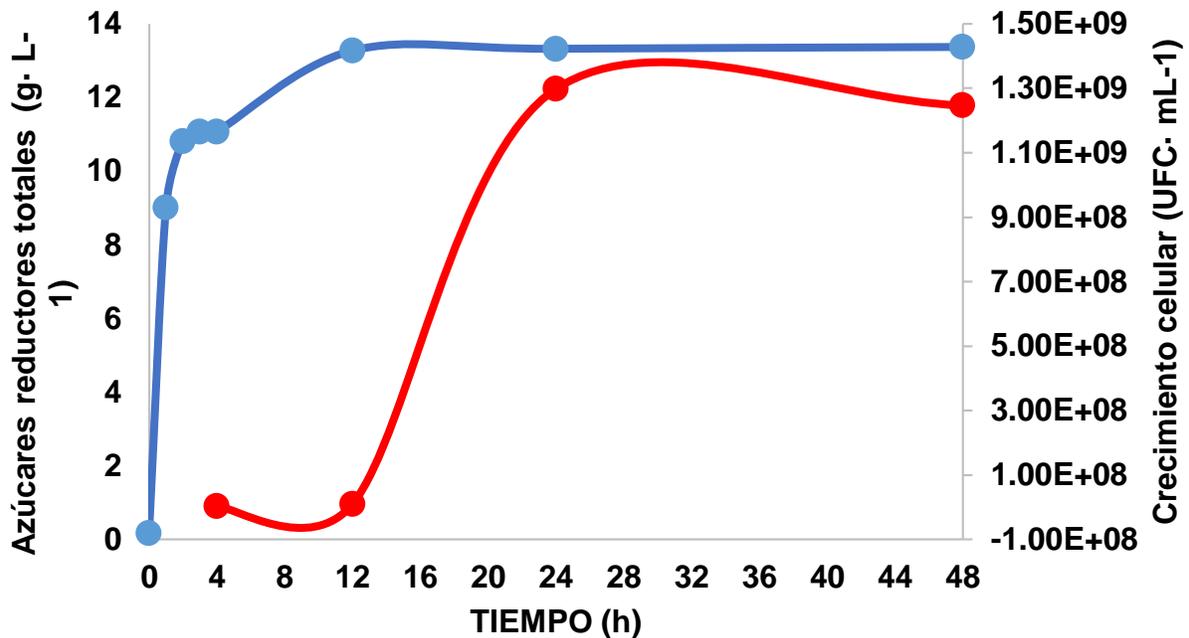


Figura 13: Comportamiento de la disponibilidad de azúcares reductores (■) y abundancia de bacterias (■) durante la fermentación de salvado de arroz usando un consorcio de *Bacillus* spp. Los datos son el promedio de 3 réplicas.

8.5 Evaluación de los factores que modifican la capacidad de asimilación de amonio con salvado de arroz fermentado

8.5.1 Efecto del pretratamiento enzimático.

En los tratamientos que fueron suplementados con enzimas se observó que los azúcares reductores alcanzan aproximadamente 6 g. L⁻¹ a las 4 h y cerca de 11 g. L⁻¹ a las 12 h. Al final de la incubación, se registraron 12.57 ± 0.6 g. L⁻¹ en el tratamiento de solo enzimas y 12.42 ± 0.6 g. L⁻¹ en el tratamiento de enzimas y bacterias. No se encontraron diferencias significativas entre ellas (P>0.05). En cambio, en los tratamientos a los que no se aplicó enzima, no se observa un incremento significativo en la cantidad de azúcares reductores (P>0.05) (Fig. 14).

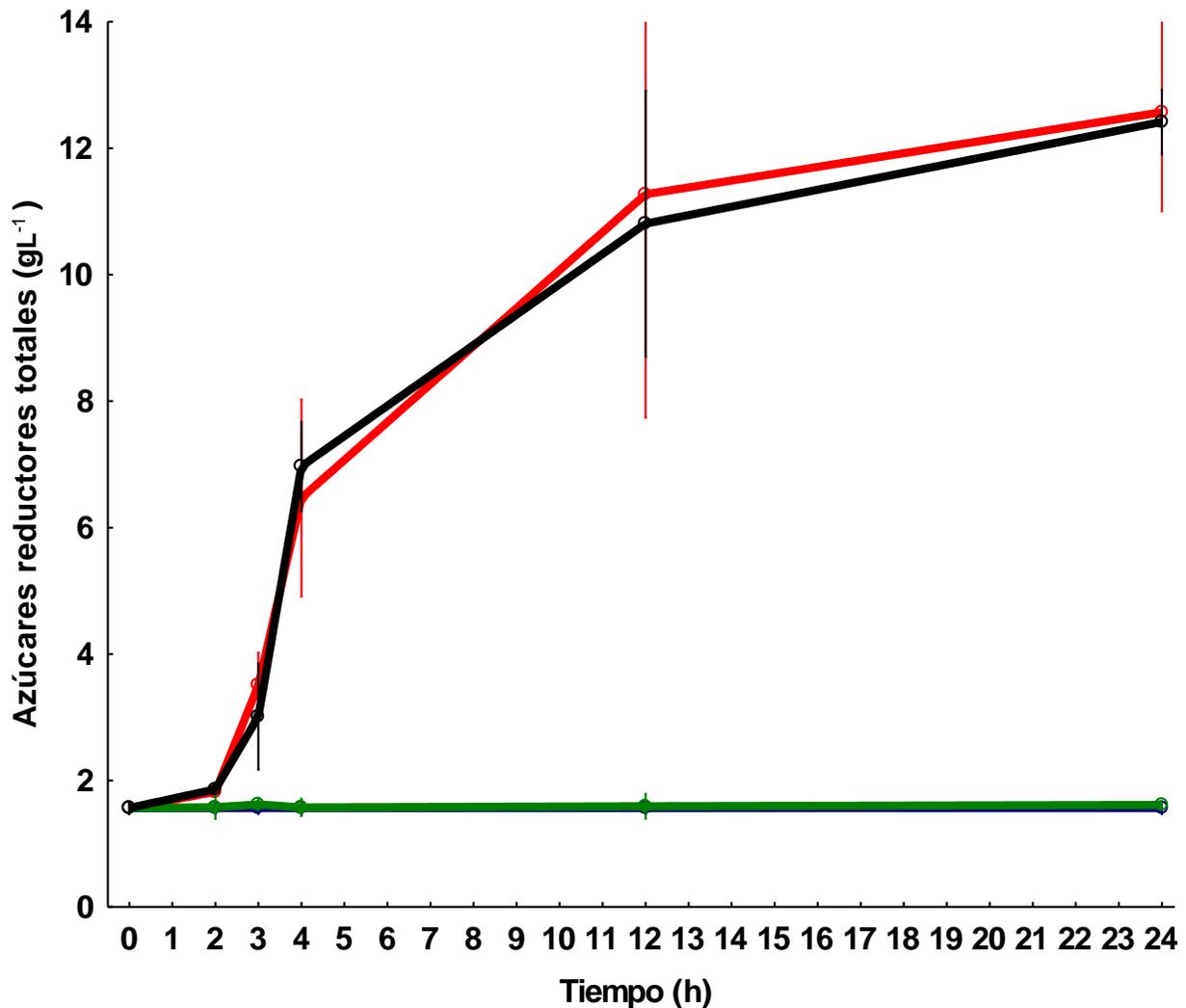


Figura 14: Tendencia liberación de glucosa durante la fermentación de salvado de arroz con un consorcio de *Bacillus* spp. . Las curvas corresponden a tratamientos en los que se aplicaron enzimas y bacterias (■); solo enzimas sin bacterias (■), solo bacterias sin enzimas (■) y un blanco sin enzimas ni bacterias (■). Los datos son la media y a la desviación estándar (n = 3).

No se encontraron diferencias significativas, en la cantidad final de bacterias presentes en los tratamientos a los que se les aplicaron bacterias ($P > 0.05$). Al final del experimento se estimaron 1.16×10^7 UFC \cdot mL⁻¹ en el tratamiento con enzimas y bacterias, y un total de $1.09 \cdot 10^7$ en el control de solo bacterias. En los otros tratamientos no se registró crecimiento bacteriano (Figura 15).

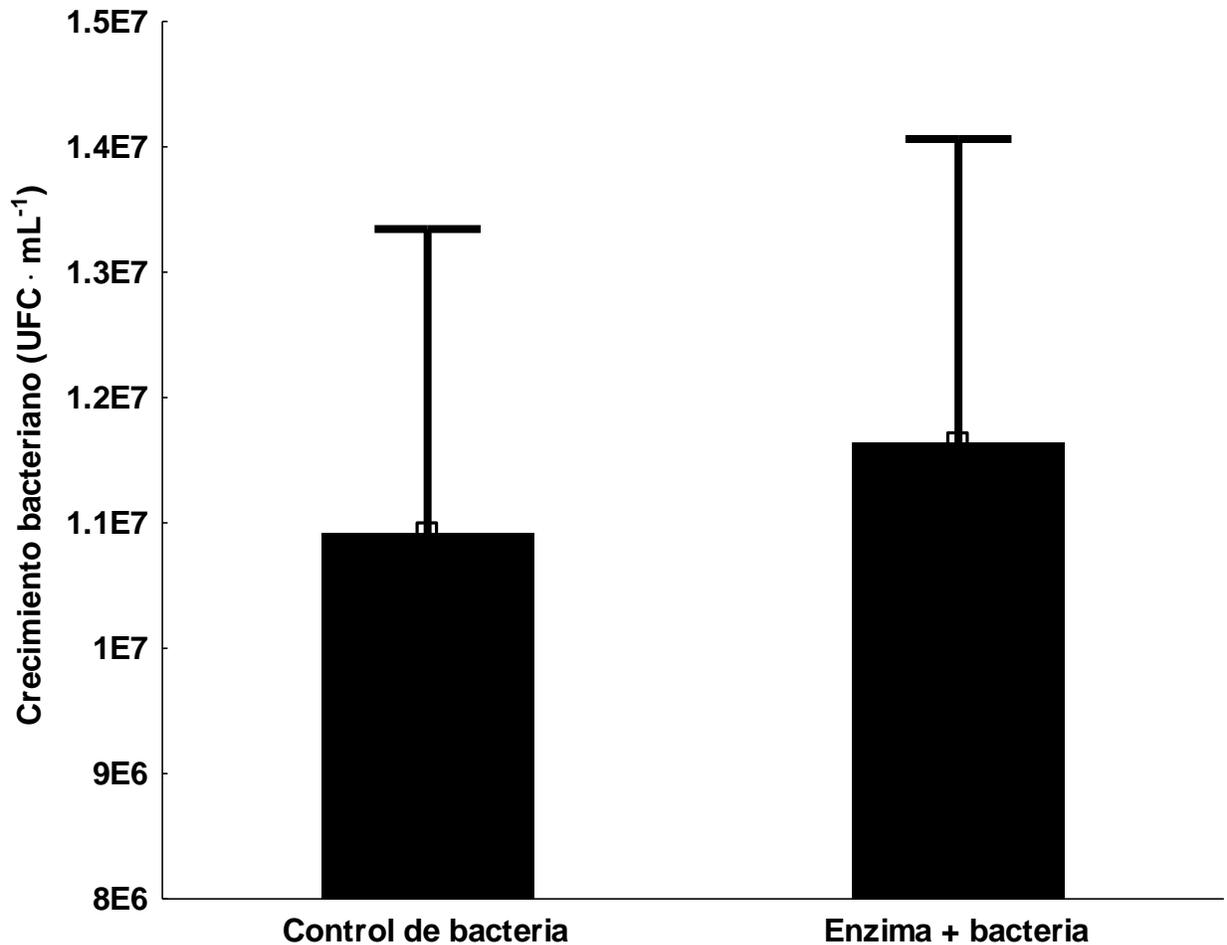


Figura 15: Carga bacteriana en una suspensión de salvado de arroz en agua de mar después de ser incubado por 24 h con un consorcio de *Bacillus* spp con y sin pretratamiento enzimático. Los datos son la media y la desviación estándar (n=3)

Se observó que solo con los tratamientos inoculados con bacterias se presenta una reducción en la concentración de amonio, en ambos casos el amonio se redujo significativamente a las 24 h de incubación ($P < 0.001$). En el tratamiento con enzimas y bacterias se registró un valor de amonio de $1.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ a 24 h mientras que en el tratamiento de solo bacteria se registró un valor final de $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de amonio. No se observaron diferencias significativas entre estos dos tratamientos ($P > 0.05$). No se registraron cambios en la concentración de amonio con los otros dos tratamientos (Fig 16).

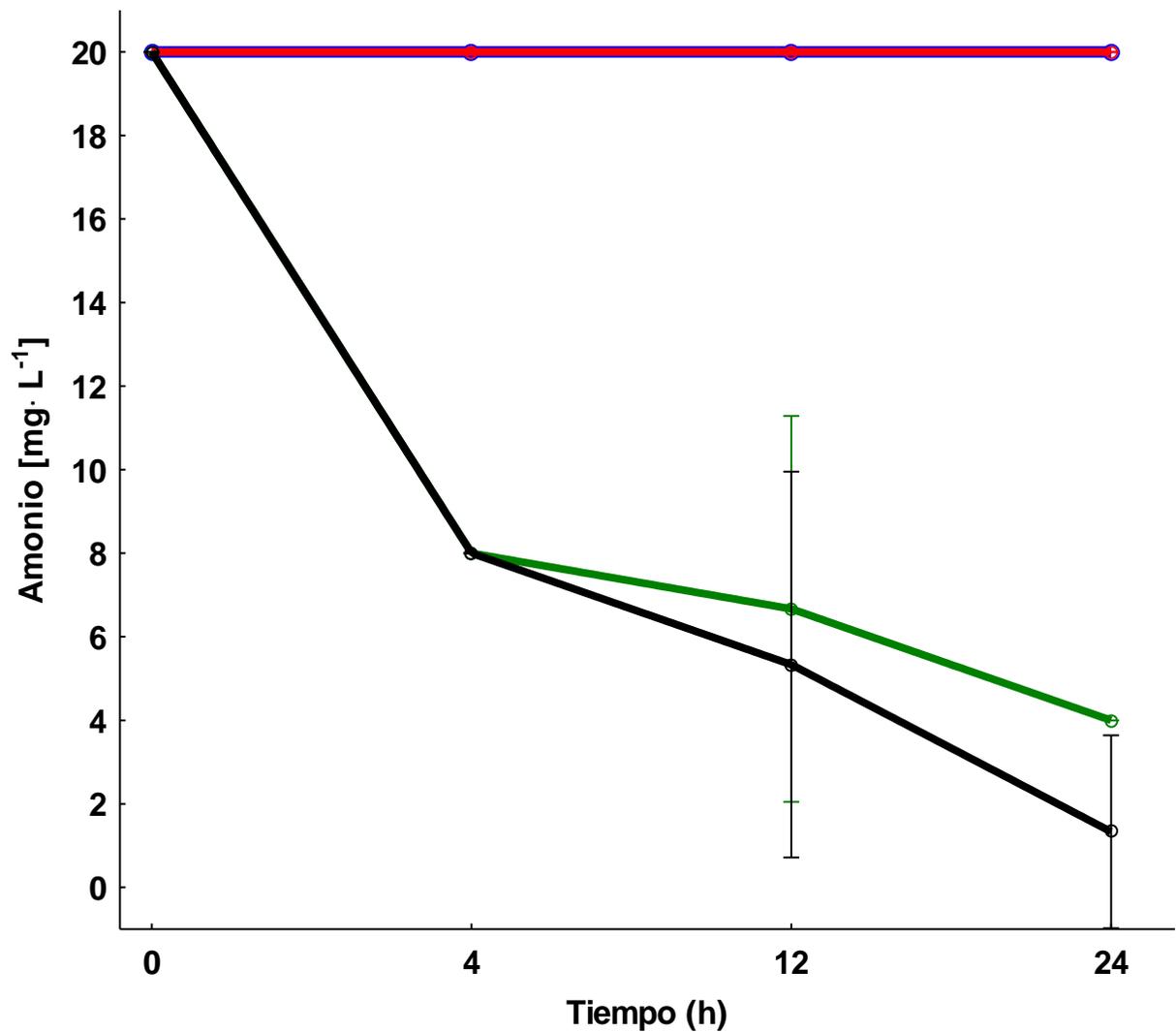


Figura 16: Asimilación de amonio en una suspensión de agua de mar tratada con salvado de arroz fermentado. Las diferentes líneas son la tendencia de diferentes procesos que se le dieron al salvado de arroz: Enzimas + bacterias (■); solo bacterias (■); solo enzimas (■) y blanco sin enzimas ni bacterias (■). Los datos son la media y a la desviación estándar (n = 3).

8.5.2 Efecto de temperatura

Se observó una mayor asimilación de amonio conforme incremento la temperatura con respecto al tiempo, obteniendo a las 24 horas diferencias significativas $p < 0.001$ con una asimilación de amonio de $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ a 20°C , $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ a 25°C y $9.833 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ a $30, 35$ y 40°C a partir de una concentración inicial de $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, lo que representa una eficiencia mayor a 98% de eliminación de amonio a partir de 30°C (Figura 17).

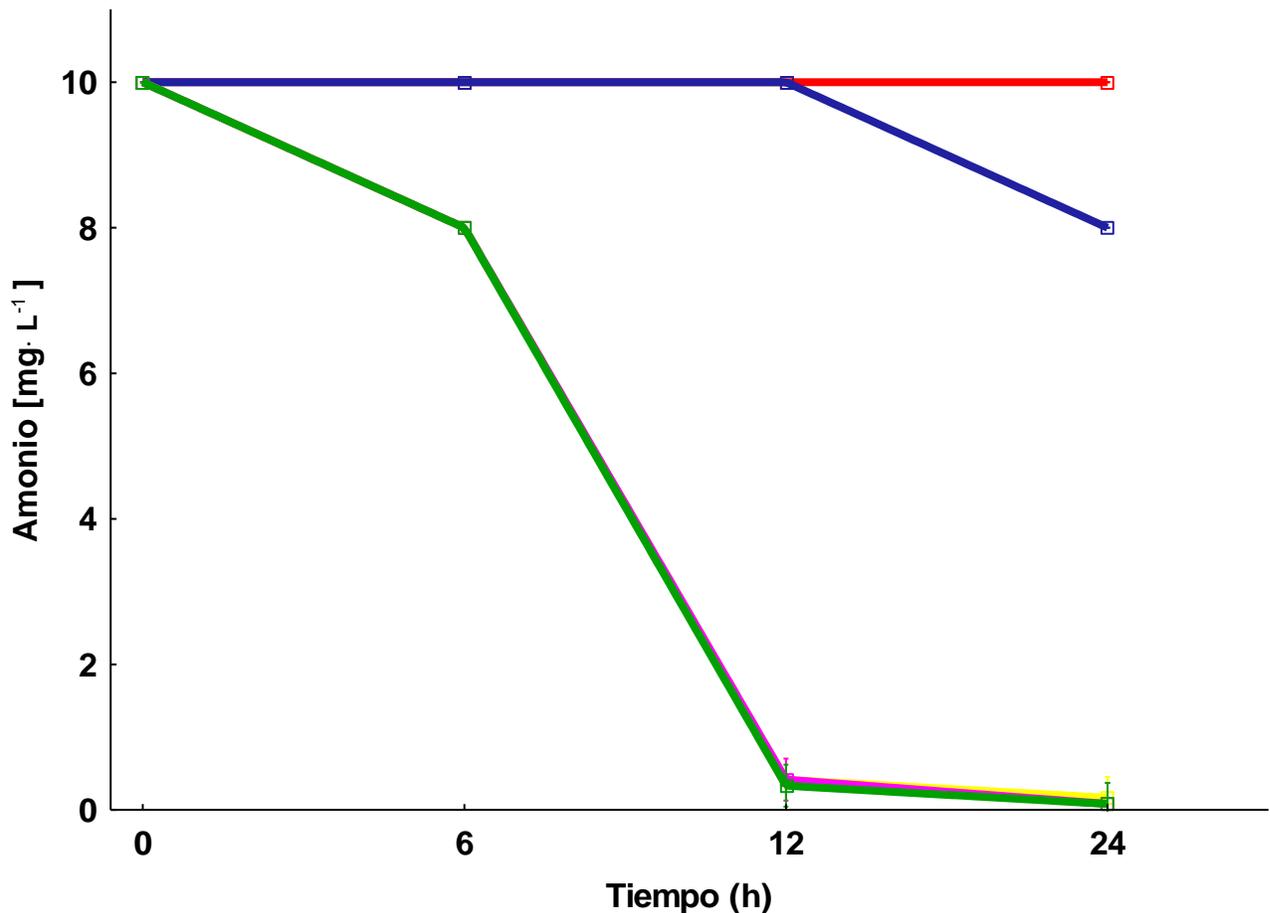


Figura 17: Asimilación de amonio en una suspensión de agua de mar tratada con salvado de arroz fermentado. Las líneas representan diferentes temperaturas en las que se evaluó el proceso: 20°C (■); 25°C (■); 30°C (■); 35°C (■); y 40°C (■). Los datos son la media y a la desviación estándar ($n = 3$).

8.5.3 Efecto de salinidad

En los tratamientos de salinidad se observó que el FRB fermentado con agua de mar estéril (35UPS) y aplicándolo a soluciones con amonio [$10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$] a diferentes grados de salinidad (5, 15, 25, 35 y 45 UPS), Se observó que a una menor salinidad hay una menor asimilación de amonio por parte del salvado de arroz fermentado (5 y 15 UPS consumieron $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de amonio en 24 h) y a partir de 25 UPS hacia mayor concentración de salinidad (35 y 45 UPS) el consumo de amonio fue (con diferencias significativas) = $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de amonio en 24 h (Figura 18).

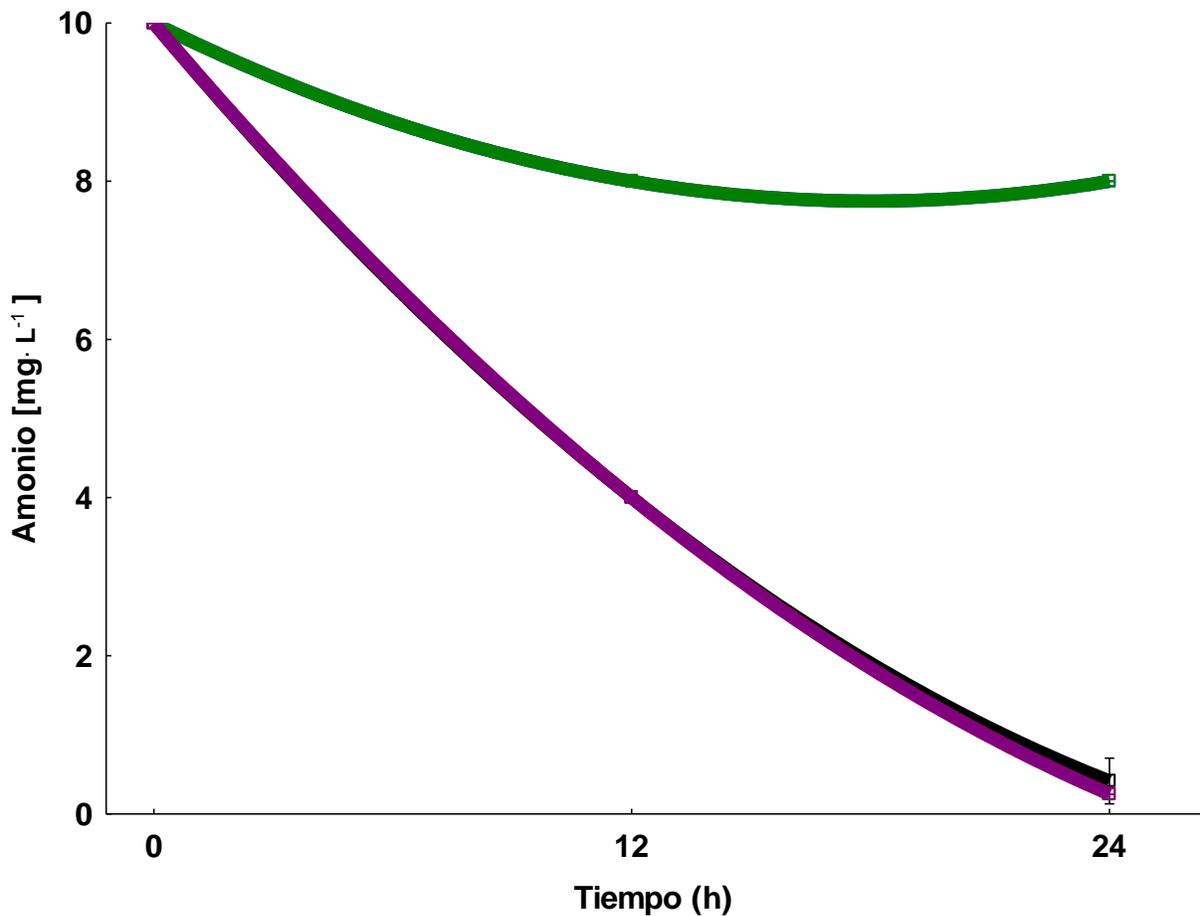


Figura 18: Asimilación de amonio en una suspensión de agua a diferentes salinidades tratada con salvado de arroz fermentado. Las líneas representan las diferentes salinidades evaluadas: 5 (■); 15 (■); 30 (■); 35 (■); y 40 (■) UPS. Los datos son la media y a la desviación estándar ($n = 3$).

8.5.4 Efecto de la adición de otras fuentes suplementarias de carbono a FRB sobre la asimilación de amonio.

Conforme a la asimilación de amonio, llevada a cabo por FRB en adición con diferentes fuentes de carbono y utilizando FRB como control positivo y un $\alpha=0.05$, demuestra que la asimilación de amonio en 24 h a partir de una concentración de amonio inicial [4 mg. L⁻¹]: FRB = 1 mg. L⁻¹; FRB + melaza = 0.42 ± 0.02 mg. L⁻¹; FRB + Inulina = 0.67 ± 0.084 mg. L⁻¹; FRB + glucosa = 0.42 ± 0.02 mg. L⁻¹; FRB + fécula de maíz = 0.84 ± 0.084 0.42 ± 0.02 mg. L⁻¹ (Figuras 19).

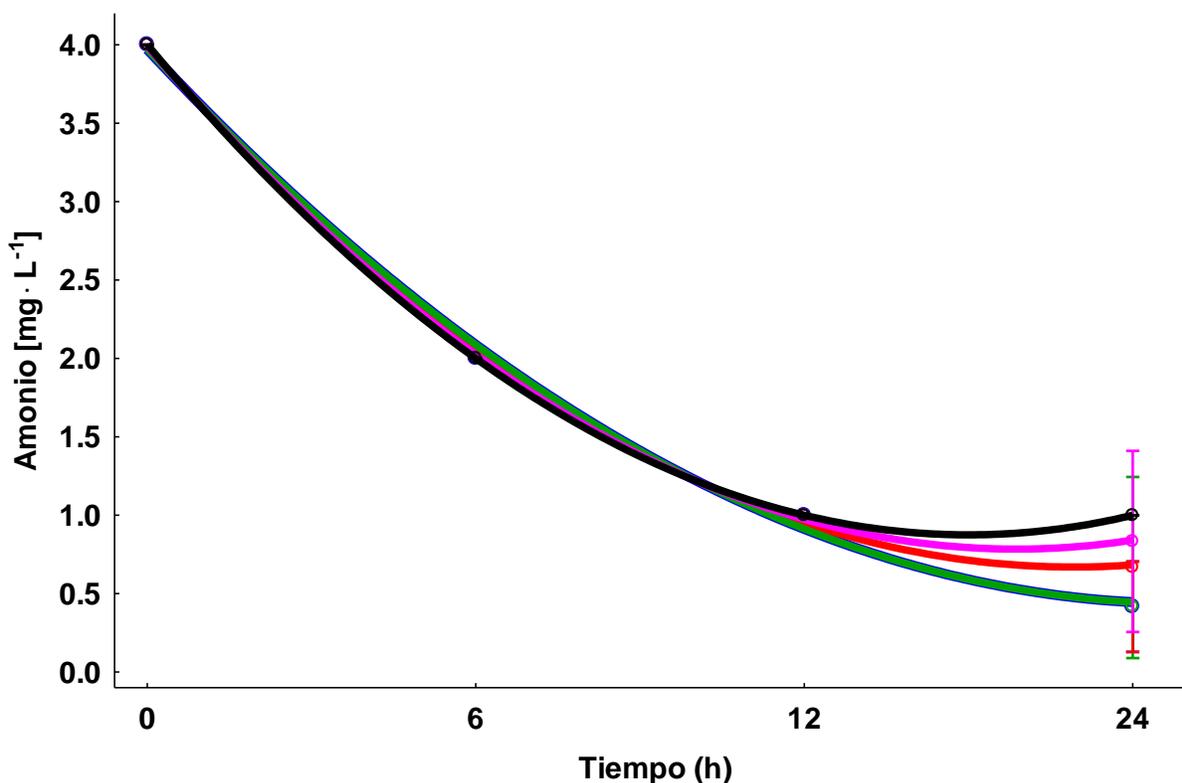


Figura 19: Asimilación de amonio, llevada a cabo por FRB más diferentes fuentes de carbono no fermentadas a través de 24 h (■=FRB (Control +); ■=FRB + Fécula de maíz; ■=FRB + Inulina; ■=FRB + Glucosa; ■=FRB + melaza) en una concentración inicial de amonio = 4 mg. L⁻¹ a 30 °C y con inyección de aire, los datos refieren a la media y a la desviación estándar (n = 3).

.8.5.5 Efecto de la concentración de melaza.

La concentración de azúcares contenidos en la melaza utilizada fue de 61°Bx. La asimilación de amonio llevada a cabo por FRB (control +) y FRB en adición con diferentes concentraciones de melaza no presentan diferencias significativas hasta las 24 horas de asimilación ($p < 0.001$), en la cual, se decidió realizar una prueba post hoc de Tuckey HSD y existen 2 grupos diferenciados ($a = \text{FRB (control +)} \neq b = \text{FRB + las diferentes concentraciones de melaza}$), infiriendo que si bien, la adición de melaza en una baja concentración ($100 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) lleva a cabo un consumo de amonio de $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ a $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, solo es después de agotado la cantidad de carbohidratos presentes en el salvado de arroz = $0.91 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de amonio. (Figura 20).

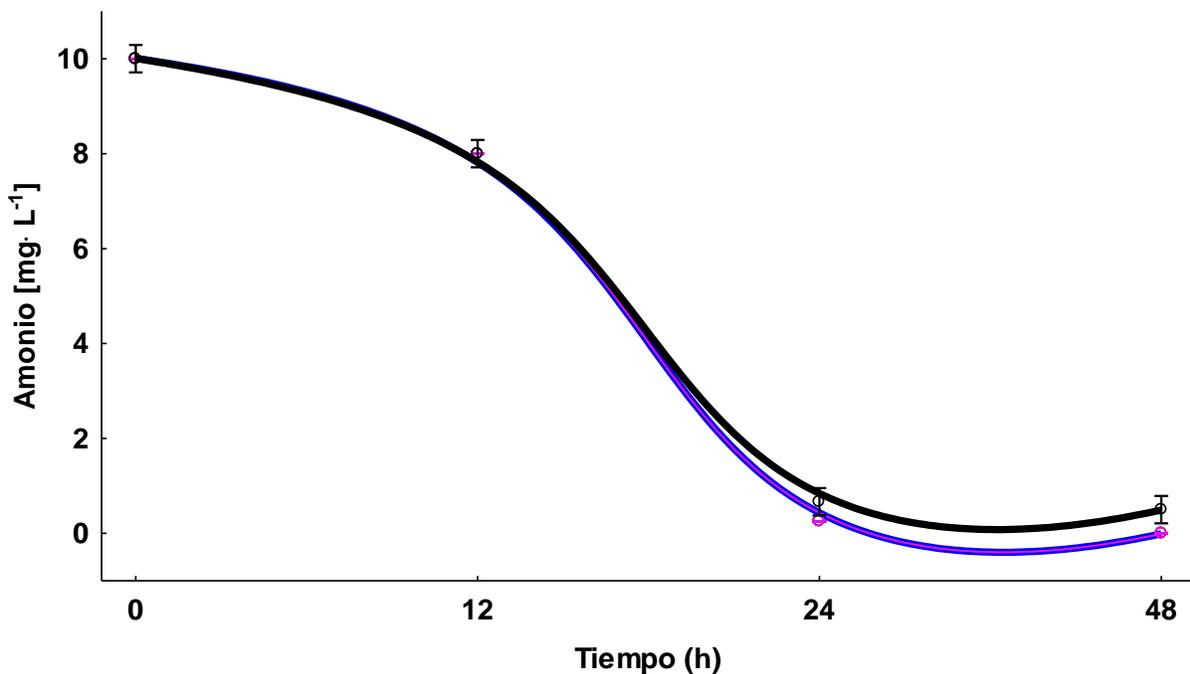


Figura 20: Asimilación de amonio con pruebas de FRB con diferentes concentraciones de melaza (■ = FRB (control +); ■ = FRB + $100 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$; ■ = FRB + $200 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$; ■ = FRB + $400 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$; ■ = FRB + $600 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) durante 48 horas en inyección de aire a 30°C , $\text{pH}=8.2$, $\text{UPS}=35$, los datos refieren a la media y a la desviación estándar ($n = 3$).

IX. DISCUSIÓN

El salvado de arroz es un recurso que puede sustituir la aplicación de melaza en sistemas acuícolas heterotróficos, es una fuente de carbono que puede contribuir a gestionar el amonio en la producción. Sin embargo, en su composición contiene principalmente almidones y fibras, por lo que biológicamente no están completamente disponibles para los microorganismos heterotróficos y se ha sugerido que un pretratamiento enzimático o microbiano podría ayudar a mejorar la incorporación al sistema. Existen diversos estudios sobre la obtención de azúcares mediante una sacarificación “low energy” (Russell *et al.*, 1986), mediante la cual demuestran la eficiencia de esta digestión por debajo de los 45 °C en un 85 % con una eficiencia sobre fermentaciones de alta energía (superiores a los 60 °C) (Nellaiah *et al.*, 1988; Rhee *et al.*, 1984; Ejiófor *et al.*, 1996). Uno de los objetivos del presente estudio fue la de encontrar la mayor cantidad de azúcares reductores en el periodo más corto de tiempo sobre el salvado de arroz en un medio acuoso a temperaturas ambientales promedio en acuicultura aplicando enzimas digestivas (Byozime), obteniendo una cantidad de azúcares reductores de 13.99 g·L⁻¹ en un periodo de solo 4 horas. Existiendo una diferencia entre los azúcares reductores totales obtenidos en el estudio de (Hernandez, *et al.*, 2000), en la cual utilizaron α -amilasa, d-amilasa y proteasa en una proporción 1:5 (10 g de salvado de arroz en 50 mL de agua) y un 1% de la proporción del sustrato de enzimas, en las cuales obtuvieron alrededor de 42 mg·L⁻¹ en fermentación sólida en menos de una hora de azúcares reductores, así también, este estudio obtuvo mejores rendimientos que los obtenidos por Tanaka *et al.*, (2006) reportan que a partir que en la utilización de amilasa (6.7 g·m⁻³) y celulasa (3.3 kg·m⁻³) en una digestión enzimática en salvado de arroz desgrasado (1:100 kg·m⁻³; enzima: sustrato) obtuvieron 28.5 kg·m⁻³ de azúcares reductores a partir de un volumen inicial de salvado de arroz desgrasado = 10.5 kg·m⁻³, el cual, aunque es un prometedor resultado, tal digestión enzimática es llevado en 48 h, a diferencia de este experimento. Eficientar el volumen suministrado de enzima a través del tiempo, en 4 horas de sacarificación es relevante para poder alcanzar una relación de carbono: nitrógeno (15:1), que es recomendable en biorremediación en el cultivo intensivo de

especies marinas (Avnimelech, 1999; Avnimelech 2007; Azhar *et al.*, 2016; Emerenciano *et al.*, 2013). Estudios como el de (Hidalgo, Urea, & Sanz, 1999), los cuales realizaron el estudio inhibitorio de enzimas digestivas sobre especies de cultivo, mencionan que la actividad enzimática se reduce (y por lo tanto afecta sobre las especies de cultivo) por debajo de los 27 °C y que la mejor respuesta del cultivo se encuentra por sobre los 37 °C, concordando con lo que a este estudio se refiere, en donde, la actividad enzimática de la sacarificación se encuentra inhibida a los 25 °C y que a partir de los 30 °C, esta encuentra su mejor expresión.

Se encuentra documentado que la adición de células bacterianas probióticas en el agua de cultivo da como resultado una tasa de crecimiento más rápida y, por lo tanto, mayores incrementos de peso y longitud especies acuícolas (Ali, 2000; Sharma & Bhukhar, 2000; Ghosh *et al.*, 2008). Se ha demostrado que *Bacillus* sp. son productores de exo-enzimas aislados del intestino de peces los cuales reducen el contenido de factores anti nutricionales que afectan a las especies en cultivo (Bairagi *et al.*, 2004; Ramachandran *et al.*, 2005; Ramachandran & Ray, 2007; Khan & Ghosh, 2013). En este sentido, se observa un crecimiento en todas las cepas de *Bacillus* seleccionadas, no hay inhibición por la alta concentración de amonio en el medio y la respuesta de las cepas, aunque se observa un mayor crecimiento de las cepas Bs, Be12Ch, Cblta, Be12G y C10ltaCh con respecto a C10ltaG, y 139.1, además de que existe un consumo diferenciado de amonio en las primeras horas después de la digestión enzimática, con un amonio inicial = 10 mg·L⁻¹, de las 12 a las 24 horas el consumo se “normaliza” para todas las cepas, siendo su asimilación superior a los 8 mg·L⁻¹ en 24 h de realizado el experimento, lo cual nos lleva a no descartar ninguna de las cepas para su uso y se acerca al consumo de amonio consumido reportado por Yang *et al.*, (2011), el cual realiza un consumo de 10.1 ± 0.5 mg·mL⁻¹ de este compuesto nitrogenado convertido a biomasa, solo que el rendimiento demostrado en el estudio fue en 120 h, así también, la eficiencia llevada a cabo por el consorcio de *Bacillus* utilizada en este estudio es superior al reportado por Ito *et al.*, (1996), en el cual a partir de una concentración de amonio-glucosa [12.6 mg·mL⁻¹ de sulfato de amonio – 13.4 mg·mL⁻¹ de glucosa) para la obtención de Poli (γ-ácido glutámico) por *Bacillus subtilis* TAM-4, realizó un consumo final de 2.5 mg·mL⁻¹, en 96 horas de interacción con este medio de cultivo.

El presente consorcio de *Bacillus* sp. utilizado en el estudio, es una herramienta eficiente para la disminución de amonio en menos de 12 horas, según los requerimientos observados por Crab *et al.*, (2010). Se difiere de Yang *et al.*, (2011) con respecto a la densidad óptica óptima de trabajo de la cepa en su estudio ($DO_{600} = 0.04$) desarrollando su crecimiento máximo (y, por ende, la máxima conversión de amonio a biomasa) en 120 h, obteniendo una DO_{600} final = 0.16, en el presente estudio la capacidad de asimilar amonio por parte de todas las cepas seleccionadas en un tiempo determinado (12 horas), en las cuales, realiza una capacidad de asimilar amonio bastante aceptable con una $DO_{585} = 1$ de cada una de los *Bacillus* sp. seleccionadas. La ausencia del proceso fermentativo de resulta en una cinética baja de crecimiento por parte de *B. subtilis*, esto concuerda con lo publicado por (Espinosa de los Monteros Fernández, 2005), por lo tanto, a mayor disposición de azúcares reducibles disponibles, mayor será la tasa de crecimiento por parte del consorcio bacteriano seleccionado en el estudio.

Resulta evidente que no existe consumo de amonio por parte de Control (-) así como por Control de enzimas, puesto que no existen microorganismos los cuales realicen el consumo de amonio esperado (ambiente estéril), sin embargo y mediante el inóculo llevado cabo con *Bacillus* spp. si existe el consumo de amonio deseado, concordando con (Zokaeifar *et al.*, 2012) el cual menciona: “se registró el mayor nivel de actividad enzimática digestiva total en dietas suplementadas con *B. subtilis* en camarones y se observaron los mejores rendimientos de crecimiento en comparación con el control”.

Dado los altos niveles de biomasa invertidos en siembras de camarón blanco en sistemas intensivos de cultivo, el control de los compuestos nitrogenados (inclusive a bajas concentraciones) resultan tóxicos para los animales cultivados (Ebeling *et al.*, 2006), por ello resulta relevante el diseño de sistemas que reviertan la concentración de estos (amonio, nitritos, nitratos). Se observa que a concentraciones de 100 y 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ iniciales de amonio, la asimilación llevada a cabo por *Bacillus subtilis* ATCC 6051 entre 12 y 24 horas es de 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; con una concentración inicial de amonio = 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, la asimilación inicia en un tiempo = 6 horas y terminando a las 48 horas con una concentración final de 2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; mientras que en concentraciones iniciales menores a 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ la asimilación es completa en un plazo de 24 horas, lo cual nos llega a determinar

que la acción llevada a cabo por *Bacillus* sp. tiene un promedio de asimilación $\sim 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ entre 12 y 24 horas de inoculado en un medio, esto diferenciándose con los resultados obtenidos por Xie *et al.*, (2013) bajo las mismas condiciones experimentales de asimilación por parte de *Bacillus amyloliquefaciens* HN (CGMCC No. 3261) realiza una asimilación de este compuesto nitrogenado de $\sim 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en 48 horas.

Las bacterias probióticas, como las cepas de *Bacillus* spp., compiten con la microflora bacteriana de origen natural por la materia orgánica disponible, por ejemplo, alimentos no consumidos y heces de animales acuáticos. El resultado de estas interacciones competitivas está determinado no solo por la capacidad de la cepa para la producción de enzimas, sino también por condiciones ambientales como la temperatura del agua. Se observa que a una baja temperatura ($20 \text{ }^\circ\text{C}$) el FRB es totalmente ineficiente en la asimilación de amonio, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ realiza un consumo de $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en 24 horas a partir de una concentración inicial de amonio = $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, mientras que a 30 , 35 y $45 \text{ }^\circ\text{C}$, se obtiene una concentración de amonio final = $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, esto se resume que a una temperatura $\geq 30 \text{ }^\circ\text{C}$, el salvado de arroz fermentado tiene su mayor eficiencia en el consumo de amonio, encontrándose diferencias entre el consorcio seleccionado para el estudio y las llevadas por Yu *et al.*, (2012) en las cuales 9 cepas de *B. amyloliquefaciens* originarias de agua de desecho, obtienen su mayor actividad en el consumo de amonio a partir de los $35 \text{ }^\circ\text{C}$.

En los últimos años, se han reportado más y más bacterias heterotróficas desnitrificadoras aerobias como: *Pseudomonas stutzeri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter junii* y *Pseudomonas tolaasii*, sin embargo, estas bacterias son casi todas de lodo o agua dulce y pueden no funcionar de manera eficiente cuando se tratan aguas residuales de alta salinidad como las marinas (Zhang *et al.*, 2011; Padhi *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015; He *et al.*, 2016). Un ejemplo claro de este tipo de reportes, es la llevada a cabo por Song *et al.*, (2011). *Bacillus* sp. YX-6, el cual menciona que esta cepa se inhibía conforme mayor era la salinidad del medio, por el contrario en este estudio, fermentar el salvado de arroz con cepas probióticas a 35 UPS y aplicarlo a diferentes unidades prácticas de salinidad tiene diferentes efectos, a 5 y 15 UPS , el consumo de amonio en 24 horas = $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, partiendo de una concentración de amonio inicial = 10

mg. L⁻¹, mientras que a 25, 35 y 45 UPS) el consumo de amonio fue (con diferencias significativas) = 0.25 mg· L⁻¹ de amonio en el mismo periodo de tiempo.

La producción acuícola se ha centrado principalmente en la nutrición y alimentación, (Coyle & Tidwell, 2002) sugirieron que se debería realizar más investigación en prácticas de manejo que maximicen la disponibilidad de alimentos naturales, como por ejemplo en estanques de tierra, en los sistemas de estanques, las poblaciones microbianas. La adición de fertilizantes o fuentes de carbono directamente al agua del estanque es una forma de aumentar la producción natural (Crab *et al.*, 2007). Aunque existe una diferencia a tiempo final sobre la asimilación de amonio, la adición de diferentes fuentes de carbono solo realiza una asimilación del 0.5 mg· L⁻¹ (en el caso de glucosa y melaza) a diferencia de sólo utilizar FRB (control +), en este sentido y dado la alta concentración que se manejó de todas las fuentes de carbono utilizadas (100 mg. 100 mL⁻¹), se infiere que a nivel práctico, manejo y costos resulta inviable, además si se pudiese llegar a utilizar alguna de las fuentes de carbono que se experimentaron, se utilizaría melaza debido a su disponibilidad, costo y por los resultados, es la partícula que más fácil asimilan el consorcio de *Bacillus* suministrado (descartando glucosa por su costo). Aunque existe una diferencia en la asimilación de amonio entre sólo utilizar FRB o FRB más cualquier concentración de melaza antes descrita (diferencia = 0.5 mg. L⁻¹) a tiempo final (24 horas) de prueba, lo cual no nos indica una fuerte necesidad de utilizar melaza como auxiliar en el control de compuestos nitrogenados al FRB y la capacidad de asimilación de amonio [10 mg. L⁻¹] del consorcio de *Bacillus* suministrado, esto contrasta con los resultados obtenidos por (Serra *et al.*, 2015) los cuales mencionan que los mejores resultados se obtienen utilizando el 100% de melaza y los más bajos rendimientos en la asimilación de los compuestos nitrogenados son los obtenidos por el salvado de arroz al 100%.

X. CONCLUSIONES

La adición de enzimas digestivas durante la fermentación del salvado de arroz realiza una liberación eficiente de los azúcares reducibles, el cual se realiza en un corto tiempo (4 horas) a una baja concentración ($5950 \text{ UBE} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) y volumen ($100 \mu\text{L}$), siendo la obtención de sus productos alrededor de los $13.99 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ haciendo la fase de adaptación de probióticos en el medio de manera eficiente.

En el presente estudio se probaron diferentes presentaciones de a una mismo complejo enzimático (Byozime) a una temperatura ($30 \text{ }^\circ\text{C}$), las cuales obtuvieron una cantidad de azúcares libres dependiendo de su presentación: líquida ($13.89 \pm 0.016 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$); Esterilizadas por ultrafiltración ($13.99 \pm 0.007 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$); y liofilizadas ($12.41 \pm 0.007 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$); al cabo de 4 horas de sacarificación, aunque se eligió la presentación estéril por ultrafiltración en experimentos sucesivos, no se descarta la presentación liofilizada por su fácil manejo y manipulación en condiciones de cultivo.

El bajar 5°C (debajo de los 30°C) la enzima se inactiva, lo cual es un desperdicio en el recurso.

Se seleccionaron las cepas BS, Be12Ch, Cblta, Be12G, C10ltaG, C10ltaCh, 139.1. Por su capacidad de asimilar amonio en 24 hr.

No es recomendable aplicar el consorcio sin la digestión enzimática, puesto que no hay una bioaumentación aceptable por parte de las cepas seleccionadas.

No hay una diferencia significativa adicionar otra fuente de carbono sin fermentar (melaza en una $[61.5^\circ\text{Bx}]$) al salvado de fermentado (teniendo una concentración de amonio = $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), en 24 horas, resulta prácticamente igual de eficiente. Inclusive, se infiere que a nivel práctico (cultivo intensivo o hiperintensivo) el exceso de carbono en un sistema puede llegar a estimular el crecimiento de otra microbiota no deseable (hongos, levaduras, entre otros) y por ende fermentaciones no deseables en el cultivo p. e. fermentación acética excesiva.

XI RECOMENDACIONES

Evaluar la eficacia de salvado de arroz fermentado en especies acuícolas (experimentación *in vivo*).

Evaluar la aplicación de una concentración mínima de nitrógeno durante la fermentación para tener una mayor bioaugmentación del consorcio probiótico con la finalidad de una dominación más rápida del consorcio en condiciones de producción.

Seguir experimentando con diferentes microorganismos probióticos, con la finalidad de ser aplicado el proceso fermentativo por debajo de los 25°C.

Aunque los resultados obtenidos en la fermentación de salvado de arroz, sería de interés seguir investigando con diferentes enzimas digestivas, así como cepas probióticas con la finalidad de seguir optimizando el proceso enzimático y fermentativo del salvado de arroz.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Ali, A. (2000). Probiotics in fish farming: Evaluation of a candidate bacterial mixture. PhD thesis: Department of Aquaculture: Swedish University of Agricultural Sciences.
- Andrade Ochoa, S., Erosa de la Vega, G., & Nevárez Moorillón, G. (2015). Amonio-oxidadas bacterianas y arqueales involucradas en el ciclo del nitrógeno. *Terra Latinoamericana* (3), 233-244.
- Avimelech, Y. (2007). Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bioflocs technology ponds. *Aquaculture* (264), 140–147.
- Avnimelech, Y. (1999). Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 176, 227–235. doi:S0044- 8486(99)00085-X
- Azhar, M., Supriyono, E., Nirmala, K., & Ekasari, J. (2016). Organic carbon source and C/N ratio affect inorganic nitrogen profile in the biofloc-based culture media of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *ILMU KELAUTAN*, 21(1), 23-28. doi:10.14710/ik.ijms.21.1.23-28
- Bairagi , A., Ghosh K. , S., Sen, S., & Ray, A. (2004). Evaluation of nutritive value of *Leucaena leucocephala* leaf meal inoculated with fish intestinal bacteria *Bacillus circulans* in formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. *Aquac. Res.*,(35), 436–446.
- Bekatorou , A., Psarianos , C., & Koutinas, A. (2006). Production of Food Grade Yeasts. *Food Technol. Biotechnol.*, 407–415.
- Burford, M. A., Thompson, P. J., McIntosh, R. P., Bauman, R. H., & Pearson, D. C. (2003). Nutrient and microbial dynamics in high-intensity zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Acuaculture*(219), 1 - 4.
- Caffrey, J., Bano, N., Kalanetra, K., & Hollibaugh, J. (2007). Ammonia oxidation and ammonia-oxidizing bacteria and archaea from estuaries with differing histories of hypoxia. *ISME J.*(1), 660-662.

- Caipang, C., & Aguana, M. (2011). Conventional PCR assays for the detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shrimp aquaculture in the Philippines. *Int. J. Bioflux Soc.*, 4, 339-350.
- Carroza, C., Hurtado, F., & Gutierrez, X. (2012). Nitrogenated compounds biofiltration under alternative bacterium fixation substrates. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*(40), 772-785.
- Coyle , S., & Tidwell, J. (2002). Research examines feeding regimes for freshwater prawns. *Global Aquaculture Advocate*, 5, 28^29.
- Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P., & Verstrate, W. (2007). Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*, 210: 1 - 4.
- Danielski, L., Zetzi, C., Hense, H., & Brunner, G. (2005). A process line for the production of raffinated rice oil from rice bran. *The journal of supercritical fluids* (34), 133–141. doi:10.1016/j.supflu.2004.11.006
- Dauda, A., Romano, N., Ebrahimi, M., Karim, M., Natrah, I., Kamarudin, M., & Ekasari, J. (2017). Different carbon sources affects biofloc volume, water quality and the survival and physiology of African catfish *Clarias gariepinus* fingerlings reared in an intensive biofloc technology system. *Fisheries science*, 83 (6), 1037 - 1048.
- Dittmann , K., Rasmussen, B., Castex , M., Gram, L., & Bentzon-Tilia , M. (2017). The aquaculture microbiome at the centre of business creation. *Microb Biotechnol*, 101(6), 1279–1282. doi:10.1111/1751-7915.12877
- Ebeling, J., Timmons, M., & Bisogni, J. (2006). Stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, heterotrophic bacterial control of ammonia-nitrogen in zero-exchange production systems. *Aquaculture*, 257(1), 346-358.
- Ejiofor, A., Chisti, Y., & Moo-Young, M. (1996). Culture of *Saccharomyces cerevisiae* on hydrolyzed waste cassava starch for production of baking-quality yeast. *Enzyme and Microbial Technology*, 519-525.

- Ekasari, J., Azhar, M., Surawidjaja, E., Nuryati, S., De Schryver, P., & Bossier, P. (2014). Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. *Fish & shellfish immunology*, 41(2), 332-339.
- Emerenciano, M., Cuzon, G., & Arevalo, M. (2013). Biofloc Technology (BFT): Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. Intech. doi:<http://dx.doi.org/10.5772/53902>
- Espinosa de los Monteros Fernández, J. J. (2005). Caracterización del proceso de crecimiento de *Bacillus subtilis* bajo condiciones anaerobias. tesis doctoral (UNAM).
- FAO. (2018). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. FAO, ISBN 978-92-5-130688-8.
- Frías-Espericueta, M. G., & Páez-Osuna, F. (2001). Toxicidad de los compuestos del nitrógeno en camarones. (F. Páez-Osuna, Ed.) *Camaronicultura y medio ambiente*, 224 - 242.
- Gan Quin, G., Moncura, J., Liu, N., & Richman, H. (2005). Aquaculture wastewater treatment and reuse by wind-driven reverse osmosis membrane technology: a pilot study on Coconut Island, Hawaii. *Aquacultural Engineering*(32), 365–378.
- Ghosh, S., Sinha, A., & Sahu, C. (2008). Bioaugmentation in the growth and water quality of livebearing ornamental fishes. *Aquacult Int* (2008), 16, 393–403. doi:10.1007/s10499-007-9152-8
- Gutiérrez- Wing, M., & Malone, R. (2006). Biological filters in aquaculture: Trends and research directions for freshwater and marine applications. *Aquacultural Engineering*(34), 163-171.
- Hargreaves, J. (2007). Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquaculture Engineering*(34), 344 - 363.
- He, T., Li, Z., Sun, Q., Xu, Y., & Ye, Q. (2016). Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Pseudomonas tolaasii* Y-11 without nitrite accumulation during nitrogen conversion. *Bioresour. Technol.*, 200, 493 - 499.

- Herigstada , B., Hamilton, M., & Joanna, H. (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods* (44), 121–129.
- Hernandez, N., Rodriguez-Alegria, M., Gonzalez, F., & Lopez Munguia, A. (2000). Enzymatic treatment of rice bran to improve processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 177-180. doi:10.1007/s11746-000-0028-2
- Hidalgo , M., Urea , E., & Sanz, A. (1999). Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*, 170 , 267–283.
- Huang , F., Pan , L., Na , L., & Tang, X. (2017). Characterization of novel *Bacillus* strain N31 from mariculture water capable of halophilic heterotrophic nitrification aerobic denitrification. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 20(20), 1 - 8. doi:10.1016/j.jbiosc.2017.06.008
- Ito, Y., Tanaka , T., Ohmachi, T., & Asada, Y. (1996). L-glutamic Acid Independent Production of Poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* TAM-4. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1239-1242,. doi: 10.1271/bbb.60.1239
- Khan , A., & Ghosh, K. (2013). Evaluation of phytase production by fish gut bacterium, *Bacillus subtilis* for processing of Ipomea aquatica leaves as probable aquafeed ingredient. *J. Aquat. Food Product Technol.*, 22, 508–519.
- Khanjani, M., Sajjadi, M., Alizadeh, M., & Sourinejad, I. (2017). Nursery performance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) cultivated in a biofloc system: the effect of adding different carbon sources. *Aquaculture research*, 48(4), 1491-1501.
- Kowalchuk , G., & Stephen, J. (2001). Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.*(55), 485-529.
- Kumar, S., Anand, P., De, D., Deo , A., Ghoshal, T., Sundaray, J., . . . Lalitha, N. (2017). Effects of biofloc under different carbon sources and protein levels on water quality, growth performance and immune responses in black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius, 1978). *Aquaculture research*, 48(3), 1168-1182.

- Kureshy, N., & Davis, D. (2002). Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 204, 125–143.
- Kuypers, M., Marchant, H., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Microbial biogeochemistry*, 16, 263-276. doi:10.1038/nrmicro.2018.9
- Lawson, E. (2011). Physico-chemical parameters and heavy metal contents of water from the mangrove swamps of Lagos Lagoon, Lagos, Nigeria. *Adv. Biol. Res.*, 5, 8-21.
- Nellaiah, H., Karunakaran, T., & Gunasekaran, E. (1985). Ethanol Fermentation of Cassava Starch by *Zymomonas mobilis* NRRL B-4286. *Biomass*, 201-207.
- Oliveira, M., Feddern, V., Kupski, L., Cipolatti, E., Badiale-Furlong, E., & de Souza-Soares, L. (2010). Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass Caracterización físico-química de la biomasa del salvado de arroz fermentado. *Journal Food*, 8(3), 229-236.
- Oliveira, D., Feddern, V., Kupski, L., Cipolatti, E., Badiale-Furlong, E., & de Souza-Soares, L. (2011). Changes in lipid, fatty acids and phospholipids composition of whole rice bran after solid-state fungal fermentation. *Bioresour Technol*, 102(17), 8335–8338.
- Padhi, S. K., Tripathy, S., Sen, R., Mahapatra, A. S., Mohanty, S., & Maiti, N. (2013). Characterisation of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 strain for bioremediation of wastewater. *Int. Biodeterior. Biodegradation* (78), 67-73.
- Prosser, J. (1989). Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microb. Physiol*(30), 125-181.
- Ramachandran, S., & Ray, A. (2007). Nutritional evaluation of fermented black gram seed meal for rohu *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings, 23, 74–79.
- Ranjan, A., Sahu, N. P., Deo, A. D., Kumar, S., & Jain, K. K. (2018). Comparative evaluation of fermented and non-fermented de-oiled rice bran with or without exogenous enzymes supplementation in the diet of *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *Fish physiology and biochemistry*, 44 (4), 1037-1049.

- Rhee, S., Lee, G., Han, Y., Mohd , Z., Yusof, I., & Han, M. (1984). . Ethanol production from cassava and sago starch using *Zymomonas mobilis*". Biotechnology Letters, 6(9), 615-620.
- Romano , N., Dauda, A., Ikhsan, N., Karim, M., & Kamarudin, M. (2018). Fermenting rice bran as a carbon source for biofloc technology improved the water quality, growth, feeding efficiencies, and biochemical composition of African catfish *Clarias gariepinus* juveniles. Aquaculture Research, 1 - 11. doi:10.1111/are.13837
- Romano, N., & Kumar, V. (2018). Alternative and new sources of feedstuffs. Enzymes in Human and Animal Nutrition, 381-396. doi:10.1016/B978-0-12-805419-2.00019-8
- Romano, N., & Kumar, V. (2018). Vegetarian Shrimp: Pellet-free Shrimp Farming. World Aquaculture.
- Russell, I., Crumplen, C., Jones, R., & Stewart, G. (s.f.).). Efficiency of genetically engineered yeast in the production of ethanol from dextrinized cassava starch. Biotechnology Letters, 8(3), 169-174.
- Samocha, T., Patnaik, S., Speed, A., & Mehdi, A. (2007). Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. Aquacultural Engineering(36), 184-191.
- Schveitzer, R., Arantes, R., Costódio, P., do Espírito Santo, C., Vinatea Arana, L., Quadros Seiffert, W., & Andreatta, E. (2013). Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. Aquacultural Engineering(56), 59–70. doi:10.1016/j.aquaeng.2013.04.006
- Serra, F., Gaona, C., Furtado, P., Poersch, L., & Wasielesky Jr., W. (2015). Use of different carbon sources for the biofloc system adopted during the nursery and grow-out culture of *Litopenaeus vannamei*. Aquacult int, 17. doi:10.1007/s10499-015-9887-6

- Sharma, O., & Bhukhar, S. (2000). Effect of Aquazyn-TM-1000, a probiotic on the water quality and growth of *Cyprinus carpio* var. *communis* (L.). *Indian J Fish*, 47(3), 209–213.
- Shih, I.-L., Wu, P.-J., & Shieh, C.-J. (2005). Microbial production of a poly(g-glutamic acid) derivative by *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*(40), 2827–2832. doi:10.1016/j.procbio.2004.12.009
- Silva, M., Sánchez, C., & Amante, E. (2006). Prevention of hydrolytic rancidity in rice bran. *Journal of Food Engineering*, 487–491.
- Sliekers, A., Derwort, N., Campos Gomez, J., Strous, M., Kuenen, J., & Jetten, M. (2002). Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor. *Water Research*(36), 2475-2482. doi:10.1016/S0043-1354(01)00476-6
- Song, Z. F., An, J., Fua, G. H., & Yang, X. L. (2011). Isolation and characterization of an aerobic denitrifying *Bacillus* sp. YX-6 from shrimp culture ponds. *Aquaculture*, 319, 188 - 193. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.06.018
- Strous, M., Fuerst, J., Kramer, E., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K., . . . Jetten, M. (1999). Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*(400), 446-449. doi:10.1038/22749
- Supriyati, T., Susanti, T., & Susana, I. (2015). Nutritional value of rice bran fermented by *Bacillus amyloliquefaciens* and humic substances and its utilization as a feed ingredient for broiler chickens. *Asian Australas J Anim Sci*, 28(2), 231–238.
- Tacon, A., & Foster, I. P. (2003). Aquafeeds and the environment: policy implications. *Aquaculture*, 226 : 181-189.
- Tacon, A., Metian, M., & Hasan, M. (2009). Feed ingredients and fertilizers for farmed aquatic animals: Sources and composition. Rome, Italy: FAO.
- Tanaka, T., Masahiro, H., Tanabe, S., Sakai, K., Ohtsubo, S., & Taniguchi, M. (2006). Production of D-lactic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology* (97), 211–217. doi:10.1016/j.biortech.2005.02.025

- Thakur, D., & Lin, C. (2003). Water quality and nutrient budget in closed shrimp (*Penaeus monodon*) culture systems. *Aquaculture*, 159-176.
- Timmons, M., & Ebeling, J. (2007). *Recirculating aquaculture* (2nd. ed.). U.S.: Northeastern Regional Aquaculture Center.
- Valencia-Castañeda, G., Frías-Espericueta, M., Vanegas-Pérez, R., Pérez-Ramírez, J., Chávez-Sánchez, M., & 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*. doi:10.1007/s00128-018-2355-z
- Wei, Y., Liao, S.-A., & Wang, A.-I. (2016). The effect of different carbon sources on the nutritional composition, microbial community and structure of bioflocs. *Aquaculture*(465), 88–93. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.08.040
- Xie, F., Zhu, T., Zhang, F., Zhou, K., Zhao, Y., & Li, Z. (2013). Using *Bacillus amyloliquefaciens* for remediation of aquaculture water. *SpringerPlus* , 2, 119.
- Yang, L., Ren, Y., Liang, X., Zhao , S., Wang, J., & Xia, Z. (2015). Nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrifier *Acinetobacter junii* YB and its potential application for the treatment of high-strength nitrogenous wastewater. *Bioresour. Technol.*, 193, 227 - 233.
- 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, 854–862.
- Yanto, H., Junianto, J., Rostika, R., Andriani, Y., & Tanuwiria, U. (2018). Effect of different levels of fermented rice bran for the growth of jelawat, *Leptobarbus hoevenii*. *Nusantara bioscience*, 10(2), 81-86. doi:10.13057/nusbiosci/n100203
- Yu, C., Wang, Y., Guo, T., Shen, W., & Gu, M. (2012). Isolation and identification of ammonia nitrogen degradation strains from industrial waste water. *Eng. Res.*, 4, 790–793.

Zhang, J., Wu, P., Hao, B., & Yu, Z. (2011). Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001. *Bioresour. Technol.*, 102, 9866 - 9869.

Zokaeifar , H., Balcázar, J., Saad, C., Kamarudin, M., Sijam, K., Arshad, A., & Nejat, N. (2012). Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*(33), 683-689. doi:10.1016/j.fsi.2012.05.027

XIII. Apendice 1.

Métodos de determinación de amonio

En el presente estudio se emplearon las siguientes técnicas:

1. Método espectrofotométrico (LYSA®), el cual como principio metodológico basado en el Azul de indofenol, compuesto de azul intenso el cual se forma por la reacción del amonio, hipoclorito, y el fenol catalizado por el nitroprusiato de sodio. Las muestras fueron procesadas conforme a las instrucciones del proveedor y los valores de absorbancia fueron sustituidos en la ecuación lineal o curva patrón, obtenida con la solución estándar proporcionada por el proveedor. En los casos que el valor de la lectura fue superior al de la curva patrón, se procedió a realizar diluciones (Figura 21).

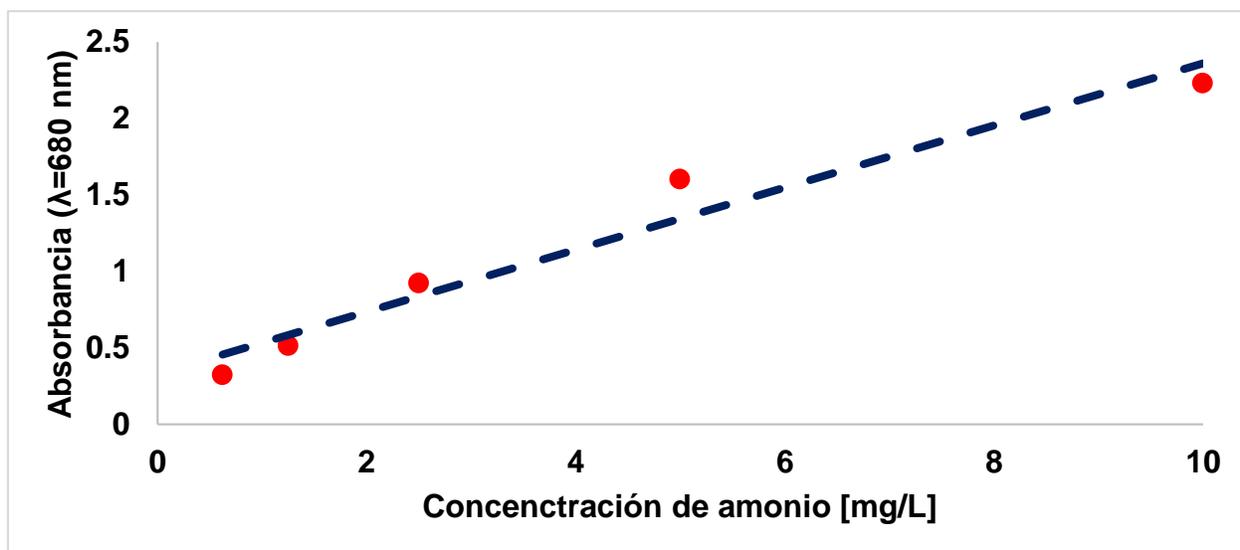


Figura 21: Curva patrón para factor F, método LYSA: $y=0.2033x + 0.3283$ con un $R^2=0.9551$; Donde “x” es la concentración de amonio y la “y” es la absorbancia leída de cada muestra.

El método LYSA® es en base a una curva patrón de amonio, para la medición de las muestras se extraen muestras en volúmenes de 10 mL a cada tubo se agregan 5 gotas de LYSANH4-1, agitar. Agregar 4 gotas de LYSANH4-2. Enseguida agregar 60 µg de LYSANH4-3 y se agita hasta disolver (la muestra se tornará azul en presencia de amonio). Se deja reposar en la obscuridad al menos 30 minutos y se lee en un

espectrofotómetro a 640 nm. Después de leída las muestras es necesario aplicar un factor de conversión denominado “F”.

$$F = \frac{0.360 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{NH}_4}{\lambda_{\text{promedio del std.}} - \lambda_{\text{promedio del blanco}}}$$

2. Método colorimétrico (API®). Su fundamento es que una parte del nitrógeno amoniacal, se presenta en forma de iones amonio y otra parte en forma de amonio. Entre ambas formas existe un equilibrio dependiente del pH. Los iones amonio forman con el reactivo de Neßler, un compuesto pardo-amarillo. La concentración de amonio se determina semi-cuantitativamente por comparación visual del color de la solución de medición con las zonas de color de una tarjeta colorimétrica.

Los datos del consumo de amonio en experimentación obtenidos fueron sometidos a las pruebas de análisis paramétricos de viabilidad y normalidad (D’Agostino & Pearson) de varianza de los datos. Una vez verificadas estas pruebas, se realizó un análisis de variación de medias (ANOVA) y finalmente un análisis de diferencias significativas (prueba de Tukey) en el programa STATISTICA 10 (StatSoft) para Windows.