

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

CARRERA DE MEDIO AMBIENTE

**INFORME DE TRABAJO DE TITULACIÓN
PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO EN
MEDIO AMBIENTE**

**MODALIDAD:
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**TEMA:
MICROBIOTA BACTERIANA EN FONDO DE LAGUNA
CAMARONERA DEL HUMEDAL LA SEGUA**

**AUTOR:
IDER JOSUÉ ZAMBRANO CEDEÑO**

**TUTORA:
ING. LAURA GEMA MENDOZA CEDEÑO, Mg. C.A.**

CALCETA, FEBRERO 2021

DERECHO DE AUTORÍA

Yo **Ider Josué Zambrano Cedeño**, con cédula de ciudadanía 230065943-6 declaro bajo juramento que el Trabajo de Titulación titulado: **MICROBIOTA BACTERIANA EN FONDO DE LAGUNA CAMARONERA DEL HUMEDAL LA SEGUA** es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluye en este documento.

A través de la presente declaración, concedo a favor de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos, conservando a mi favor todos los derechos patrimoniales de autor sobre la obra, en conformidad con el Artículo 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación.



IDER J. ZAMBRANO CEDEÑO

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

Ing. LAURA GEMA MENDOZA CEDEÑO, Mg. C.A., certifica haber tutelado el trabajo de titulación **MICROBIOTA BACTERIANA EN FONDO DE LAGUNA CAMARONERA DEL HUMEDAL LA SEGUA**, que ha sido desarrollada por **IDER JOSUÉ ZAMBRANO CEDEÑO**, previa la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial, de acuerdo **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN DE LA UNIDAD DE TITULACIÓN ESPECIAL** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.



ING. LAURA G. MENDOZA CEDEÑO, Mg. C.A.

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaramos que hemos **APROBADO** el trabajo de titulación **MICROBIOTA BACTERIANA EN FONDO DE LAGUNA CAMARONERA DEL HUMEDAL LA SEGUA**, que ha sido propuesto, desarrollado por **IDER JOSUÉ ZAMBRANO CEDEÑO**, previa la obtención del título de INGENIERO EN MEDIO AMBIENTE, de acuerdo al **REGLAMENTO DE TITULACIÓN ESPECIAL DE PROGRAMAS DE GRADO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.



Ing. Hugo Cobeña Navarrete, Mg. Sc.
Miembro Del Tribunal



Ing. Jonathan Chicaiza Intriago M.Sc.
Miembro Del Tribunal



Blga. María Fernanda Pincay Cantos, M. Sc
Presidenta Del Tribunal

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que me dio la oportunidad de crecer como ser humano a través de una educación superior de calidad en la cual hemos forjado los conocimientos profesionales día a día.

A Dios por darme la vida y paciencia para desarrollar mis estudios.

A mis padres por brindarme su amor y apoyo incondicional a lo largo de mi carrera universitaria.

A mi tutora, por ser una buena asesora en la elaboración de la tesis, y a la bióloga por compartir sus conocimientos.



IDER J. ZAMBRANO CEDEÑO

DEDICATORIA

A mi madre Kelly Nuria Cedeño Calderón, por ser mi motor y pilar fundamental en la vida, por desear lo mejor para mí, acompañarme cuando más lo he necesitado y por brindarme siempre su amor incondicional sin importar las malas circunstancias.

A handwritten signature in blue ink that reads "IDER JOSUÉ" with a stylized flourish underneath.

IDER J. ZAMBRANO CEDEÑO

CONTENIDO GENERAL

	Pág.
CARÁTULA	i
DERECHO DE AUTORÍA.....	ii
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
DEDICATORIA.....	vi
CONTENIDO GENERAL.....	vii
CONTENIDO DE CUADRO Y FIGURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.2. JUSTIFICACIÓN	2
1.3. OBJETIVOS	4
1.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	4
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
1.4. IDEA DEFENDER	4
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. HUMEDALES.....	5
2.1.1. IMPORTANCIA DE LOS HUMEDALES	6
2.1.2. HUMEDAL LA SEGUA	6
2.1.3. LOS FONDOS EN LOS HUMEDALES.....	7
2.2. LA INDUSTRIA CAMARONERA EN ECUADOR	8
2.3. IMPACTO DE LAS CAMARONERAS EN EL AMBIENTE.....	9
2.4. MICROORGANISMOS.....	9
2.4.1. IMPORTANCIA DE LOS MICROORGANISMOS	10
2.5. BACTERIAS.....	10
2.6. GÉNERO BACILLUS	13
2.7. MATERIA ORGÁNICA	14

2.8.	MÉTODO DRAGA VAN VEEN.....	15
2.9.	MÉTODO qPCR.....	15
	CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO	17
3.1.	UBICACIÓN	17
3.2.	DURACIÓN DEL TRABAJO.....	17
3.3.	VARIABLES	17
3.3.1.	VARIABLE INDEPENDIENTE:.....	17
3.3.2.	VARIABLE DEPENDIENTE:.....	18
3.4.	TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	18
3.4.1.	INVESTIGACIÓN DESCRIPTIVA.....	18
3.4.2.	INVESTIGACIÓN DE CAMPO	18
3.5.	MÉTODO DE INVESTIGACIÓN	18
3.5.1.	MÉTODO BIBLIOGRÁFICO	18
3.5.2.	MÉTODOS CUANTITATIVO - ESTADÍSTICO.....	18
3.5.3.	MÉTODOS INDUTIVO – DEDUTIVO.....	19
3.5.4.	MÉTODO DE ANÁLISIS - SÍNTESIS.....	19
3.5.5.	APORTE FINAL	19
3.6.	TÉCNICAS.....	19
3.6.1.	ENTREVISTA.....	19
3.6.2.	OBSERVACIÓN	19
3.7.	PROCEDIMIENTO.....	20
3.7.1.	FASE I. DESCRIPCIÓN PROCESO PRODUCTIVO DE LA CAMARONERA.....	20
3.7.1.1.	ACTIVIDAD 1.1. RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN.....	20
3.7.1.2.	ACTIVIDAD 1.2. ELABORACIÓN DE FLUJOGRAMA.....	20
3.7.2.	FASE II. CUANTIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA BACTERIANA PRESENTE EN FONDO DE LA LAGUNA CAMARONERA DEL HUMEDAL LA SEGUA	20
3.7.2.1.	ACTIVIDAD 2.1. COLECTA DE MUESTRAS DE SEDIMENTOS.....	20
3.7.2.2.	ACTIVIDAD 2.2. CULTIVO Y AISLAMIENTO DE CEPAS	21

3.7.2.3. ACTIVIDAD 2.3. EXTRACCIÓN DE ADN	21
3.7.2.4. ACTIVIDAD 2.4. AMPLIFICACIÓN POR qPCR.	22
3.7.2.5. ACTIVIDAD 2.5. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS.....	22
3.7.3. FASE III. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE MATERIA ORGÁNICA EN FONDO DE LA LAGUNA CAMARONERA DEL HUMEDAL LA SEGUA	23
3.7.3.1. ACTIVIDAD 3.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE MATERIA ORGÁNICA	23
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
4.1. DIAGNÓSTICO DEL PROCESO PRODUCTIVO DE LA CAMARONERA	25
4.1.1. CAPTACIÓN DEL AGUA.....	26
4.1.2. PREPARACIÓN DE LA LAGUNA.....	26
4.1.3. LLENADO.....	27
4.1.4. INTRODUCCIÓN DE SIEMBRA.....	27
4.1.5. CULTIVO Y MANEJO DE LAGUNA	28
4.1.6. COSECHA.....	29
4.2. CUANTIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA BACTERIANA PRESENTE EN FONDO DE LA LAGUNA CAMARONERA DEL HUMEDAL LA SEGUA ...	30
4.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE MATERIA ORGÁNICA EN FONDO DE LA LAGUNA CAMARONERA DEL HUMEDAL LA SEGUA	36
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	39
5.1. CONCLUSIONES.....	39
5.2. RECOMENDACIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	40

CONTENIDO DE CUADRO Y FIGURAS

CUADROS

Cuadro 3.1. Concentraciones de carbono orgánico en el fondo de lagunas de acuicultura	28
Cuadro 4.1. Dimensión de la laguna	27
Cuadro 4.2. Coordenadas de recolección de muestras por transecto	29
Cuadro 4.3. Lista de colonias aisladas en SBDx con su respectivo conteo.	36
Cuadro 4.4. Lista de colonias aisladas en TSA con su respectivo conteo.	37
Cuadro 4.5. Lista de cepas aisladas en SBDx con su respectiva identificación y porcentaje de homología de secuencia.....	37
Cuadro 4.6. Lista de cepas aisladas en TSA con su respectiva identificación y porcentaje de homología de secuencia.....	38

FIGURAS

Figura 4.1. Ubicación del humedal La Segua.....	17
Figura 4.2. Muestreo de sedimento.....	21
Figura 4.3. Diagrama de flujo del proceso del camarón.....	30
Figura 4.4. Mapa del área de estudio.....	35
Figura 4.5. Árbol filogenético	40
Figura 4.6. Distribución del porcentaje de Materia Orgánica según la zona de muestreo.....	41

RESUMEN

El cultivo del camarón es una de las actividades con mayor crecimiento en el Ecuador y en el mundo, motivando el desarrollo de la presente investigación. El objetivo es evaluar la influencia de la microbiota bacteriana presente en fondo de la laguna camaronera del Humedal La Segua. Las técnicas de investigación aplicadas fueron la entrevista, observación, colecta de muestras de fondo y técnicas de identificación molecular. Para la toma de muestras se establecieron 5 cuadrantes de 100 m² y se distribuyeron con el método bandera inglesa, para un total de 25 muestras, las que fueron transportadas en condiciones de frío -20 °C al Laboratorio de Biología Molecular de la ESPAM. Para la extracción de ADN de las bacterias presentes en el sedimento se utilizó el kit Powersoil® (Qiagen). En la identificación y cuantificación de las cepas bacterianas por medio de qPCR lo cual se trabajó con el gen 16SrDNA usando primers universales 16SrDNA27F y 16SrDNA1492R. El contenido de materia orgánica se obtuvo en el laboratorio de fondos de la Estación Pichilingue del INIAP por el método de calcinación. Evidenciando la presencia de los géneros *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Acinetobacter*, *Prolinoborus*, *Arthrobacter* *Planococcus* con más del 99% de homología, con mayor abundancia para las cepas del género *Bacillus*. En la secuenciación realizada se constató que existe actividad microbiana en fondo de laguna y un contenido de materia orgánica con un valor de 2,20% permitidos para esta actividad.

PALABRAS CLAVES

Análisis Molecular, sedimento, materia orgánica.

ABSTRACT

Shrimp farming is one of the fastest growing activities in Ecuador and in the world, thus motivating the development of this descriptive research. The influence of the bacterial microbiota present in the bottom of the shrimp lagoon of the La Segua Wetland was evaluated. The research techniques applied were the interview, observation; collection of background samples and molecular identification techniques. For taking samples, 5 quadrants of 100 m² were established and distributed with the English flag method, for a total of 25 samples, which were transported in cold conditions to the Molecular Biology Laboratory of ESPAM. For the extraction of DNA from the bacteria present in the sediment, the Powersoil® kit (Qiagen) was used. In the identification and quantification of bacterial strains by means of qPCR, which was worked with the 16SrDNA gene using universal primers 16SrDNA27F and 16SrDNA1492R. The organic matter content was obtained in the bottom laboratory of the Pichilingue Station of INIAP by the calcination method. Evidence of the presence of the Bacillus, Exiguobacterium, Acinetobacter, Prolinoborus, Arthrobacter Planococcus genera with more than 99% homology for all cases, with greater abundance for the Bacillus genus strains. In the sequencing carried out, it was possible to verify that there is microbial activity in the bottom and a content of organic matter with a range of 2.20% allowed for this activity.

KEY WORDS

Molecular analysis, sediment, organic matter.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El cultivo del camarón es uno de los más promisorios con un rápido crecimiento en Asia y Latinoamérica y recientemente en África (Anjel *et al.*, 2010). En el Ecuador, la industria camaronera desde hace 40 años viene siendo parte de la industria manufacturera del país, ocupando esta actividad una superficie de alrededor de las 210.000 ha en todas las provincias costeras del país, produciendo así un gran impacto al ambiente (Cedeño y Vera, 2019).

Estos sistemas de crianzas y producción se basan principalmente en una alimentación artificial a base de balanceados, con el fin de garantizar una alta biomasa. El correcto manejo de esta actividad evita la presencia de floraciones excesivas de fitoplancton evitando a su vez bajas concentraciones de oxígeno y niveles elevados de amoniacos que ocasionan una condición de estrés para el camarón dando como resultado una baja sobrevivencia (Faillace *et al.*, 2016).

García (2017) señala que los géneros bacterianos son más comunes en el entorno de la acuicultura de tal manera se asocian a las infecciones del camarón, debido a que las bacterias tienen la capacidad de invadir el organismo en condiciones donde reflejan ambientes de agua de mala calidad y la acumulación de materia orgánica en los fondos de las lagunas.

Orosco (2017) indica que existen bacterias que pueden multiplicarse de manera más rápida, lo que crea un ambiente modificado para los microorganismos acuáticos, por tal motivo se incrementa el crecimiento bacteriano.

El humedal está expuesto a las diferentes acciones ya que genera cambios en el estado ecológico y a la sostenibilidad por parte de la repercusión poblacional del sector tales como: las actividades antropogénicas en el uso indebido de fondos al crecimiento por nuevas lagunas camaroneras, la agricultura masiva e intensa, agroquímicos utilizado en los cultivos y otras en las que interviene de forma negativa por lo cual ha sido amenazado, alterado y en algunos casos ha sufrido pérdidas de la biodiversidad (Peñarieta F *et al.*, 2020).

Se ha reportado que las bacterias predominan en estos sistemas acuáticos son las Gram negativas, influyendo en la aceleración de la descomposición del alimento residual y heces para purificar la calidad del agua que se encuentra en el fondo de las camaroneras afectando a este sector (Farinango et al., 2017; Zhao et al., 2020).

Ante la eventual situación se plantea la siguiente interrogante: ¿Cómo incide la actividad de la microbiota bacteriana en el contenido de materia orgánica del fondo de laguna camaronera del humedal La Segua?

1.2. JUSTIFICACIÓN

El proceso de cultivo del camarón se caracteriza por la presencia masiva de micro, pequeños y medianos productores concentrados en áreas específicas con la producción, las lagunas de cultivo de camarón son asimétricas no solo en tamaño sino también en términos de estilo y nivel de tecnología empleada las cuales algunas explotan áreas inferiores a dos hectáreas y trabajan de forma casi artesanal, mientras que otras hacen uso de los avances tecnológicos disponibles para cada región (Tahim *et al.*, 2014).

En el Ecuador, el sistema de producción de camarón es limitado a causa de la poca disponibilidad de tierra para la implementación de nuevas lagunas, este sector está enfocado en aplicar tecnologías que permitan mejorar los índices de productividad. El uso de alimentadores automáticos ha sido significativo, logrando una abundante reducción en las tasas de conversión de alimento, mejora de la rentabilidad y estado de salud, al proporcionar alimentos de manera eficiente y con menor impacto en los fondos de los estanques (Piedrahita, 2018).

Presencia de bacterias es de vital importancia para el funcionamiento de la laguna ya que tienen la capacidad de reciclar la materia orgánica para cumplir su ciclo de vida, adaptando su metabolismo a los cambios en su hábitat en donde se desarrollan para asimilar dichos compuestos orgánicos como alimento, transformándolos en compuestos inorgánicos para la futura reutilización de organismos autótrofos, creando así un ciclo y un equilibrio en la naturaleza (Alarcon y Andueza, 2019).

El estado ecuatoriano vela por la conservación de los ambientes naturales y ha creado leyes que contribuyen a la mitigación de los efectos nocivos de las actividades humanas para el medio ambiente. En el Capítulo séptimo de la constitución del Ecuador, en su Art. 71 menciona que “La naturaleza o Pacha Mama, donde se reproduce y realiza la vida, tiene derecho a que se respete integralmente su existencia, el mantenimiento y regeneración de sus ciclos vitales, estructura, funciones y procesos evolutivos” (Constitución Nacional del Ecuador, 2008).

Dentro del Art. 72 se recalca el derecho de la naturaleza a la restauración, en donde los casos de impacto ambiental grave o permanente, incluidos los ocasionados por la explotación de los recursos naturales no renovables, el Estado establecerá los mecanismos más eficaces para alcanzar la restauración, y adoptará las medidas adecuadas para eliminar o mitigar las consecuencias ambientales nocivas (Constitución Nacional del Ecuador, 2008).

En una publicación realizada por el Consejo Nacional de Planificación, dentro del Plan Nacional Toda Una Vida en su objetivo 3 el cual es “Garantizar los derechos de la naturaleza para las actuales y futuras generaciones”, hace énfasis en la protección y el cuidado de las reservas naturales y de los ecosistemas frágiles y amenazados, que son producto de la intervención del ser humano; también se señala que es necesario un marco de bioética, bioeconomía y bioconocimiento para el desarrollo; es decir, la investigación y generación de conocimiento de los recursos del Ecuador (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo [Senplades], 2017).

La investigación tiene como finalidad evaluar la influencia de la microbiota bacteriana presente en el fondo de laguna camaronera del humedal La Segua y la influencia en el contenido de materia orgánica. Este estudio permitirá incursionar en alternativas para un manejo eficiente del sistema de producción que garantice niveles de materia orgánica óptimos para esta actividad.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la influencia de la microbiota bacteriana en fondo de laguna camaronera del humedal La Segua en el contenido de materia orgánica.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diagnosticar el proceso productivo de la camaronera del humedal La Segua.
- Cuantificar la microbiota bacteriana presente en fondo de laguna camaronera del humedal La Segua.
- Determinar el contenido de materia orgánica en fondo de laguna camaronera del humedal La Segua.

1.4. IDEA DEFENDER

La microbiota bacteriana influye en el contenido de materia orgánica del fondo de laguna camaronera del humedal La Segua.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. HUMEDALES

Según lo mencionado por la Convención de Ramsar (2016) los humedales son extensiones de ciénagas, pantanos y turberas, o superficies cubiertas de aguas, sean éstas de régimen natural o artificial, permanentes o temporales, estancadas o corrientes, dulces, salobres o saladas, incluidas las extensiones de agua marina cuya profundidad en marea baja no exceda de seis metros.

Estos ecosistemas son de gran valor natural y cultural, formados por un cuerpo de agua permanente o temporal de poca profundidad. Generalmente lo constituye una franja a su alrededor, que puede cubrirse por inundaciones periódicas llamada Zona de manejo y preservación ambiental. Estos ecosistemas están muy ligados a presentar cambios en su nivel hídrico, por tal razón los sistemas bióticos y abióticos que lo habitan están adaptados a las variaciones y comportamientos de sus sistemas hídricos asociados (Rey, 2011).

Los humedales comprenden aproximadamente entre el 4 y 6% de la superficie total de la tierra (Ibáñez, 2016). A su vez, Pinzón (2017) menciona que en estos humedales habitan un gran número de especies de animales, vegetales e hidrófilas. En relación con la teoría de McNeely (2002) la clave ecológica esencial para este tipo de ecosistemas es el agua, favoreciendo el desarrollo de microorganismos y ciertas comunidades de animales y plantas. La Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura [UNESCO] (2018) señala que más del 50% de los humedales a nivel mundial han desaparecido desde 1990; sin embargo, esta suma puede llegar al 90% en países desarrollados.

Los humedales que quedan en los países desarrollados son considerados irremplazables, al haberse demostrado que las áreas restantes (30% de la superficie) son de difícil recuperación, es lo que se mencionó en La Convención de Ramsar (2018) ya que, el cambio climático es uno de los factores que ha provocado la pérdida de humedales, adaptándose a los nuevos patrones y cambios en los niveles de agua para poder continuar su estadía en la tierra.

Los humedales forman parte de la solución para la adaptación de la sociedad, al brindarles los servicios ambientales en cantidad y calidad necesarios para su total satisfacción. Para la preservación de estos servicios es necesario hacer frente a los impactos negativos que causa el cambio climático (Buenfil, 2009).

2.1.1. IMPORTANCIA DE LOS HUMEDALES

La importancia de los humedales radica en el hecho de ser beneficiosos y necesarios para las personas aledañas a estos, al generar servicios ambientales que son indispensables para su supervivencia. Así mismo, brinda beneficios al ambiente de manera general, ya que sirve de hábitat de una gran biodiversidad de plantas, animales y microorganismos, algunos de estos ya en peligro de extinción, permitiendo su subsistencia en la tierra (Domínguez *et al.*, 2015).

La Convención de Ramsar (2007) por otro lado, indica que los humedales son importantes depósitos de material genético vegetal. El arroz, por ejemplo, una especie común de los humedales, es el principal alimento de más de la mitad de la humanidad.

2.1.2. HUMEDAL LA SEGUA

Según lo indicado por Arteaga (2012) el humedal La Segua pertenece a propietarios particulares y está dividida en 33 parcelas de diferente extensión, muchas de estas pertenecen a los habitantes que rodean el humedal y otras corresponden a personas que no residen en la zona. Este humedal está constituido por un pantano central que se encuentra permanentemente anegado y una extensa llanura de inundación que se cubre de agua durante la estación lluviosa. Alrededor del humedal se sitúan cuatro poblaciones: San Antonio, como cabecera parroquial y la más poblada, La Segua, La Sabana y Larrea (Burgos y Pazmiño, 2017).

Este humedal se caracteriza por tener fondos arenosos, limosos y arcillosos profundos con depósitos sedimentarios fluviales. El agua del humedal es de calidad media, con presencia de coliformes fecales y sólidos totales, con un bajo porcentaje de oxígeno disuelto (Ministerio de Ambiente Ecuador [MAE], 2017).

La flora del humedal La Segua se encuentra representada por 27 familias de 33 especies silvestres. Durante la época lluviosa, predominan las plantas acuáticas,

especialmente los lechuguines (*Eichhornia crassipes*). La profundidad de la ciénaga del humedal puede alcanzar un promedio de 1.27 m (Velásquez *et al.*, 2007).

MAE, (2016) expresa que El Humedal La Segua es de importancia ambiental por las siguientes razones:

- Para la conservación de varias especies acuáticas, ya sean residentes o migratorias.
- Es soporte de vida para una gran biodiversidad de especies.
- Garantiza la seguridad alimentaria y provisión de agua dulce de las poblaciones aledañas al humedal.
- Los humedales son considerados sumideros de carbono reduciendo el impacto del fenómeno como efecto invernadero.

2.1.3. LOS FONDOS EN LOS HUMEDALES

Hernández (2009) explica que la saturación del agua en los fondos de los humedales favorece en gran parte a la acumulación de carbono, debido a que el fondo permite que se disminuya la velocidad de descomposición de la materia orgánica.

Los fondos en los humedales que han sufrido inundación poseen condiciones anaerobias que favorecen la producción de metano CH₄ (gas de efecto invernadero) el cual tiene un potencial de calentamiento global 21 veces más que el CO₂. No se debe de sobreestimar la función de estos ecosistemas como sumideros de carbono, ya que es necesario realizar un balance entre el carbono que se acumula en la biomasa, el fondo de los humedales y el metano emitido a la atmósfera (Hernández, 2009).

Las variaciones de las condiciones climáticas y de los niveles de agua contribuyen a cambios continuos en este tipo de ecosistema. El balance hídrico tiene una estrecha relación con el comportamiento de este hábitat y se hace evidente a través del efecto en la disponibilidad de nutrientes, niveles de pH,

grado de anaerobiosis del sustrato, salinidad del fondo y en diversas propiedades del sedimento (Centro de Ecología Aplicada Chile, 2006).

Un buen manejo de las cuencas de drenaje es indispensable para conservar la calidad ecológica de los humedales, ya que estos dependen directamente de los procesos naturales y de la acción del hombre, a través de la agricultura, deforestación, regulación, urbanización, etc. Por todo ello, resultaría imposible comprender completamente el estado actual de un humedal sin tener presente el uso que se le da a sus fondos y los cambios producidos en su cuenca hidrográfica (Ortega *et al.*, 2006).

El impacto de la actividad del hombre se hace evidente según lo observado por Pacheco *et al.* (2017) en el humedal La Segua. En la mayoría de los casos, se emplean tecnologías de producción de alta demanda de insumos agrícolas por lo que esta actividad se caracteriza por ser poco amigable con el ecosistema.

2.2. LA INDUSTRIA CAMARONERA EN ECUADOR

El sector camaronero en el país se ha convertido en un rubro de gran importancia en lo que respecta a las exportaciones de productos tradicionales. Hace más de 30 años la industria camaronera viene fomentado e impulsado el desarrollo económico en el país, generando más de 120 mil puestos de trabajo; dando oportunidad a la apertura de mercados externos, siguiendo largos procesos de aprendizaje, inversión y experimentación (Herdson *et al.*, 2014).

Martínez y Montaña (2016) mencionan que aproximadamente el 90% de la producción camaronera en el Ecuador se obtiene del cultivo, mientras que el 10% restante proviene de la pesca del camarón. Cabe mencionar, que, gracias a las condiciones climatológicas y geográficas existentes en las camaroneras, el camarón se adapta con mucho éxito permitiendo obtener hasta tres cosechas por año.

En el sector camaronero del país existe un alto nivel de tecnificación, competitividad y especialización productiva. Por tal razón, ha ido en ascenso la comercialización del producto al exterior, contribuyendo de forma positiva a las exportaciones totales del país (Hurtado, 2010).

2.3. IMPACTO DE LAS CAMARONERAS EN EL AMBIENTE

El sector camaronero genera varios beneficios a la sociedad, dentro de estos se encuentra la creación de fuentes de trabajo y el aumento de capitales económicos, pero esta industria provoca gran impacto, especialmente al entorno natural. Los efectos negativos que ocasiona la industria camaronera al ambiente son bastante amplios, ya que al llevarse a cabo esta actividad se simplifica el ecosistema de desarrollo y supervivencia de varias especies marinas y terrestres; siendo así, que en el Ecuador se ha reducido en gran porcentaje las especies propias del humedal (Varela, 2011).

Notarianni (2010) señala que los impactos negativos al ambiente pueden darse desde la construcción hasta la operación de las lagunas. Pudiendo ser una de las consecuencias más nocivas en ecosistemas frágiles. Además, al ser primitivas las técnicas de captura de larvas, generan gran impacto negativo en poblaciones de crustáceos, moluscos y otras especies marinas, ya que el proceso de recolección de dichas larvas va eliminando a otras especies.

Se conoce, que los fondos de los humedales son los ecosistemas más aptos para el cultivo del camarón. Este tipo de explotación altera en gran parte el hábitat de la mayoría de las especies, incrementando el impacto negativo al ambiente. En el Ecuador, desde 1969 hasta 1995 hubo una reducción del 27% del área total de los manglares a nivel nacional, siendo la industria camaronera la principal responsable de este problema (Barrera, 2007).

2.4. MICROORGANISMOS

Los microorganismos poseen la capacidad de realizar todas las funciones vitales de manera unicelular además son capaces de formar grupos simples de células (Bartha, 2009).

Los microorganismos según Bartha (2009) se dividen en dos grandes reinos:

- Procariotes (archeas y bacterias).
- Eucariotes (hongos, algas y protozoarios).

Pese a esta clasificación, los virus, viroides y priones también se encuentran incluidos dentro de la rama de la microbiología (Paul P, 2007). Martínez (2012)

señala que los microorganismos deben ser estudiados en cultivos puros, es decir donde todas las células derivan de una sola bacteria por división asexual siendo genéticamente iguales.

Baca (2013) menciona que la diversidad microbiana se puede apreciar desde la variedad estructural y funcional de los microorganismos, es decir por su tamaño, morfología, división celular, capacidad metabólica y capacidad de adaptación. Actualmente se han realizado estudios del material genético (ADN y ARN) de los microorganismos, en donde se ha revelado la existencia de miles de millones de especies microbianas.

2.4.1. IMPORTANCIA DE LOS MICROORGANISMOS

La importancia de los microorganismos radica en su participación en los procesos ecológicos que son vitales para el funcionamiento de los ecosistemas, y en los procesos biotecnológicos que son primordiales para las industrias médicas, alimenticias y farmacéuticas (Smith, 2013). Además, los microorganismos son los responsables directos de la descomposición de la materia orgánica y del ciclaje de los nutrientes como el carbono, nitrógeno, azufre, fósforo, entre otros.

2.5. BACTERIAS

Las bacterias son microorganismos unicelulares que poseen un tamaño entre 0,5 y 5 μm , y diversas formas incluyendo esferas, barras y hélices que poseen una pared celular compuesta de peptidoglucanos. Algunas bacterias contienen flagelos u otros sistemas de desplazamiento y movilidad (Prescott, 2009).

Para Schaechter (2003) las bacterias son los organismos de mayor abundancia en el planeta. Son ubicuas, encontrándose en todo hábitat de la tierra, creciendo en el fondo, en manantiales calientes y ácidos, en desechos radioactivos, en las profundidades del mar y de la corteza terrestre.

Existen bacterias que pueden sobrevivir a condiciones extremas del espacio exterior. En 1 g de tierra existen aproximadamente 40 millones de células bacterianas, y en 1 ml de agua dulce existen alrededor de un millón de células bacterianas (Prescott, 2009).

2.5.1. IMPORTANCIA DE LAS BACTERIAS

Las bacterias son importantes e imprescindibles para el proceso del reciclaje de los elementos, puesto que varios pasos importantes de los ciclos biogeoquímicos dependen de estos microorganismos, otra función importante que desempeñan las bacterias es la fijación del nitrógeno en la atmósfera de la tierra (Joklik, 2004).

Las bacterias son utilizadas como indicadores biológicos para medir la calidad bacteriológica de los cuerpos de agua. Las más utilizadas son las del género de las coliformes, por su capacidad de estar presentes en el agua y en los alimentos, este tipo de bacterias dan evidencia de la presencia de contaminación fecal por descarga de desechos, este fenómeno se da generalmente cuando existen asentamientos poblacionales cerca de estas fuentes de agua (Henao, 2015).

2.5.2. USO DE LAS BACTERIAS

La mayoría de las industrias dependen en gran parte de la acción bacteriana. Un sin número de sustancias químicas como el alcohol etílico, ácido acético, alcohol butílico y acetona son producidas por bacterias específicas. Existen otras bacterias que son utilizadas para el curado de tabaco, el curtido de cueros, caucho, algodón, entre otros. Las bacterias junto con las levaduras y los mohos, se han utilizado durante miles de años para la preparación de alimentos fermentados tales como el queso, mantequilla, encurtidos, salsa de soja, chucrut, vinagre, vino y yogurt (Prescott, 2009).

Otro uso que se le da a las bacterias es el de degradar gran variedad de compuestos orgánicos, por lo que se utilizan en el reciclado de basura y la biorremediación. Las bacterias capaces de degradar los hidrocarburos son de uso frecuente en la limpieza de los vertidos de petróleo (Joklik, 2004).

2.5.3. MICROBIOTA BACTERIANA EN LAGUNAS CAMARONERAS

Para Cazal (2012) el agua de las lagunas es considerada como mejor hábitat para el desarrollo de las bacterias, ya que en estos ecosistemas existen la cantidad de agua y aire necesarios para su total desarrollo. Según Forero (2015) estas lagunas dan pie a condiciones óptimas de crecimiento que juegan un papel crucial en la asimilación, transformación y reciclaje de compuestos orgánicos.

De acuerdo a Torres (2007) las bacterias juegan un papel principal ya que están involucrados en la mineralización anaerobia de la materia orgánica en fondos marinos. Su abundancia y distribución se encuentran relacionados con las diferentes variables ambientales

En estos ambientes se pueden encontrar varios tipos de bacterias como las sulfato-reductoras (BSR), muchas bacterias pueden usar a otros aceptores diferentes al sulfato. Se les considera como anaeróbicos estrictos y se les encuentra principalmente en hábitats anóxicos ricos en sulfato (López y Fuentes, 2015).

En el fondo de las lagunas las bacterias obtienen su energía y requerimientos de carbono de la materia orgánica, su nutrición es primordialmente saprofita, es decir que se basa en la degradación de la materia orgánica muerta, siendo parte importante en el reciclaje de nutrientes como el carbono en medios acuáticos (Forero, 2015).

Las bacterias son las responsables de degradar más del 53% de la materia orgánica en lagunas; sin embargo, en condiciones de bajo contenido de sulfatos su importancia disminuye, destacando la función de las bacterias metanogénicas en el proceso dominante en la fase terminal de la mineralización anaeróbica en fondos (Alvarado *et al.*, 2006).

Las bacterias (BSR) se caracterizan por ser los organismos responsables de la reducción del sulfato a sulfuro como parte de su metabolismo, además, están presentes en una variedad de hábitats anaeróbicos como fondos marinos, pantanos, microbiota intestinal, sistemas de tratamiento de aguas residuales industriales o instalaciones de extracción de gas y petróleo (Zambrano *et al.*, 2019).

Para Boyd (2019) la descomposición microbiana de la materia orgánica no se detiene en la fermentación, se produce a través de un proceso conocido como desnitrificación. Las bacterias usan compuestos de hierro y manganeso como fuentes de oxígeno, también liberan metano; el color oscuro debajo de la superficie del fondo de la laguna es evidencia, de igual forma el olor de huevo

podrido es producido por estas misma, el gas nitrógeno producido en la desnitrificación, el metano se difunde en el agua y luego en el aire.

2.6. GÉNERO BACILLUS

El género *Bacillus* comprende un grupo de especies filogenética y fenotípicamente heterogéneas, la clasificación de las especies del género se tiene en cuenta dos características fundamentales: el crecimiento aerobio, la respuesta positiva a la tinción de Gram, la forma bacilar y la formación de endospora. Esto hace que exista una gran cantidad de especies ocupando una gran variedad de hábitats (Hernández *et al.*, 2011).

Las bacterias agrupadas en este género pertenecen a la familia *Bacillaceae*, anaerobios o aerobios facultativos son catalasa positivos. Las células bacterianas de este género tienen un amplio tamaño que varía entre 0,5 a 2,5 μm x 1,2-10 μm . Se encuentran comúnmente en fondos son habitantes comunes de aguas frescas y lagunas (Lozada, 2010).

Según estudios moleculares de la secuencia del RNAr 16S, realizados por Hernández *et al.* (2011) este género se ha subdividido en cuatro grupos. El primero pertenece a *Bacillus sensu stricto* en el cual se incluye *Bacillus subtilis* y otras 27 especies. El segundo, también conocido como *sensu lato*, incluye bacilos formadores de esporas redondeadas, en el que se destacan las especies *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. anthracis* y unidos a estos se encuentran algunos taxos asporógenos como *Caryphanon*, *Exiguobacterium*, *Kurtia* y *Planococcus* debido a que presentan cierta similitud con *Bacillus subtilis*.

Por su parte, el grupo 3 está formado por 10 representantes, dentro de los que se encuentra *B. polymyxa* y *B. macerans*, los cuales se han reclasificado en un nuevo género, *Paenibacillus*. El grupo 4, se encuentra formado por especies que han sido reclasificadas en dos nuevos géneros *Aneuribacillus* y *Brevibacillus*. Por otra parte, se ha creado un nuevo género (*Virgibacillus*) en el que se ubicó la especie *B. panthotenicus*. Finalmente, se han descrito nuevas especies del género aisladas de diversos ecosistemas que incluyen a *B. mojavensis* y *B. vallismortis*, *B. ehimensis* y *B. chitinolyticus*, *B. infernus*, *B. carboniphilus* y *B. horti* (Hernández *et al.*, 2011).

Está ampliamente demostrado que *Bacillus* es uno de los géneros más comunes presentes en los fondos de laguna. Se encuentra, desde las capas más superficiales hasta las más profundas. Este género ha demostrado tener una amplia distribución en todas las regiones geográficas del planeta con un 24% del total de bacterias aisladas en el fondo con diversos beneficios para las plantas (Orberá *et al.*, 2005).

Investigaciones realizadas con diferentes especies de este género se ha comprobado que tienen un gran potencial para su uso en la acuicultura, muchas cepas tienen la capacidad de reducir y producir metabolitos antimicrobianos para el control de patógenos, la solubilización de fosfatos y la fijación biológica del nitrógeno; presentan una alta velocidad de crecimiento y sobreviven en diversas condiciones (Badía *et al.*, 2011).

Por otra parte, se ha demostrado que este género bacteriano presenta actividad para el desarrollo de probióticos, entre ellas, la especie *Bacillus amyloliquefaciens* reportada como un antagonista de amplio espectro y tiene la capacidad de producir enzimas con actividad digestiva (Feria *et al.*, 2019).

2.7. MATERIA ORGÁNICA

La materia orgánica se encuentra compuesta por carbohidratos, ligninas y proteínas. Los microorganismos descomponen la materia orgánica en dióxido de carbono y los residuos más resistentes en humus. Durante el proceso de descomposición los microbios pueden atrapar nitrógeno del fondo (Atlas y Bartha, 2011).

La cantidad de materia orgánica del fondo generalmente depende de la vegetación, el clima, la textura y el drenaje del fondo. Los fondos minerales con mayor contenido de materia orgánica son normalmente los fondos de terrenos vírgenes. Los fondos de bosques y aquellos de climas cálidos tienen una menor cantidad de materia orgánica (Tortora, 2007).

Por su parte Gavino (2017) expresa en su investigación que cuando finaliza un ciclo de cultivo, junto a las heces se ha encontrado hasta un 30% de alimento que no fue aprovechado formando parte de la materia orgánica del fondo del estanque.

2.8. MÉTODO DRAGA VAN VEEN

La Draga Van Veen es un muestreador superficial para lechos de ríos y lagos fácil de usar, que da una indicación rápida del tipo de fondo. Esta draga toma una muestra de la superficie, se suspende de un cable de manera que se puede sumergir fácilmente, las hay de diversos tamaños y capacidades, desde 0,5 a 12 L, son fáciles de limpiar y descontaminar ya que están hechas de acero inoxidable (Van Walt, 2019).

La draga es un protocolo de toma de muestra Van Veen que permite lograr muestras de fondo superficiales. Tiene un mecanismo sencillo para la toma de muestra y cierre instantáneo de la cuchara, lo que le confiere una alta eficacia en la toma de muestras de sedimento superficial. Cuando la parte inferior toca el fondo, el sistema de percha que engancha con el cabo de izado se destensa, de manera que libera el resorte que mantiene la draga abierta. Al subir la draga ésta se cierra por su propio peso reteniendo el fondo arrancado del fondo marino (Esgemar, 2012).

2.9. MÉTODO qPCR

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) significó una valiosa alternativa para estudios moleculares en una amplia gama de campos, que abarcan desde la detección de agentes etiológicos, pasando por genotipificación, análisis de enfermedades genéticas y oncológicas, amplificación y modificación de fragmentos de ADN. Esta técnica continúa siendo un método revolucionario, constituyéndose en la mejor técnica desarrollada por biólogos moleculares cuyo impacto aún continúa haciéndose notar (Bolívar y García, 2014).

La qPCR es una variante de la PCR convencional que consiste en la detección y medición de la ampliación. A medida que este se almacena durante la reacción, esta técnica permite medir la cantidad de ADN sintetizado y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación, mediante la emisión de fluorescencia producida, la cual es proporcional a la cantidad de producto formado (Zapata, 2011).

Por su parte Castro (2009) plantea que esta técnica permite obtener o amplificar una secuencia de ADN en particular en un número elevado de copias, también

se puede partir de ARN como matriz. El número de copias se incrementa exponencialmente según la cantidad de veces que se repita el ciclo de amplificación, en esta reacción se utiliza una enzima denominada Taq polimerasa. La qPCR consta de tres etapas, la primera fase de desnaturalización, en donde la doble cadena de ADN es separada aplicando temperatura, la etapa siguiente se denomina hibridación, es este periodo los oligonucleótidos se acoplan a una región complementaria del ADN, otorgando una región de doble cadena, la cual es reconocida por la polimerasa. En esta fase la temperatura óptima es regida que forma parte los primeros con una temperatura entre 40 y 72 °C, por un tiempo de 10 a 60 s.

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN

La laguna camaronera se encuentra en El Humedal La Segua en la provincia de Manabí, Parroquia San Antonio del Cantón Chone, y en el sitio Larrea del Cantón Tosagua; ubicado en la parte alta del estuario del Rio Chone, a una altitud de 10 -12 msnm con una temperatura de 26 a 27 °C, que alcanza una extensión de 1.745 ha, cuenta con la confluencia de los ríos Carrizal y Chone entre las coordenadas 0° 42,5' de latitud sur 80°09' de longitud oeste, 0°41' de latitud sur y 80° de longitud oeste y 0°44,3' de latitud sur, 80° 12,2' de longitud oeste. Longitud oeste.

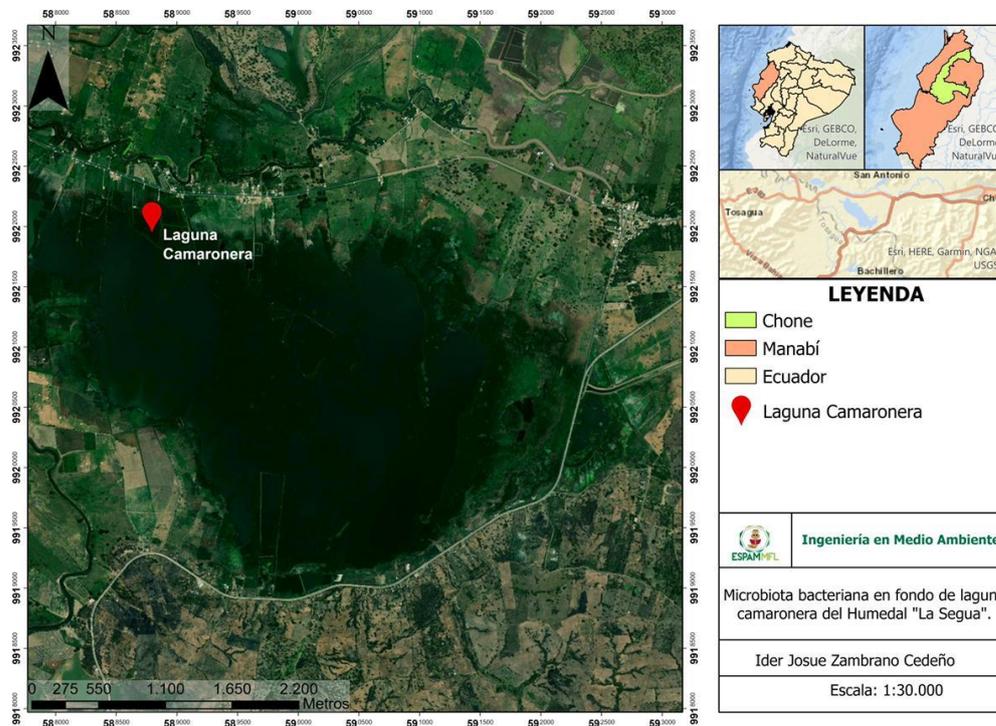


Figura 3.1. Ubicación de la laguna camaronera en El humedal La Segua.

Fuente: Zambrano Cedeño Ider Josué, (2020).

3.2. DURACIÓN DEL TRABAJO

La investigación planteada tuvo una duración enero 2019 hasta octubre 2019 a partir de su aprobación.

3.3. VARIABLES

3.3.1. VARIABLE INDEPENDIENTE:

Microbiota bacteriana.

3.3.2. VARIABLE DEPENDIENTE:

Contenido de materia orgánica en fondo de laguna camaronera.

3.4. TIPO DE INVESTIGACIÓN

3.4.1. INVESTIGACIÓN DESCRIPTIVA

La investigación es del tipo descriptiva, ya que permitió describir la problemática que presenta la acumulación de materia orgánica en la laguna camaronera en el humedal La Segua, así como las características más específicas del proceso productivo del camarón.

3.4.2 INVESTIGACIÓN DE CAMPO

El trabajo se consideró de campo, debido a que permitió obtener información desde la realidad social del área de estudio, mediante el uso de técnicas que ayudaron a diagnosticar los principales problemas de la zona. Además, con esta modalidad se logró delimitar el área escogida para la investigación; asimismo, se pudo recolectar las diferentes muestras de fondo de las camaroneras del humedal que posteriormente fueron analizadas.

3.5. MÉTODO DE INVESTIGACIÓN

3.5.1. MÉTODO BIBLIOGRÁFICO

Este método permitió la búsqueda de información actualizada sobre la temática objeto de estudio y obtener datos e información confiables sobre el tema planteado; asimismo se logró adquirir conocimientos sobre investigaciones ya existentes que sirvieron de referencia para la realización del marco teórico y la metodología.

3.5.2. MÉTODOS CUANTITATIVO - ESTADÍSTICO

A través del método cuantitativo se logró identificar y cuantificar la microbiota bacteriana presente en el fondo de laguna camaronera aplicando qPCR y el contenido de materia orgánica. La estadística se utilizó para representar la información obtenida de los valores de materia orgánica, mismo que fueron interpretados mediante un gráfico estadístico, a través del programa Excel.

3.5.3. MÉTODOS INDUTIVO – DEDUTIVO

Se logró realizar conclusiones y recomendaciones generales especificando sobre la temática basándose en los resultados que obtuvieron en el fondo de la laguna camaronera del humedal La Segua, partiendo desde las ideas más generales.

3.5.4. MÉTODO DE ANÁLISIS - SÍNTESIS

Es el estudio de los hechos, que partió de la caracterización de estudio para estudiarlas en forma individual (análisis). Se denominó como la identificación para estudiarlas de manera holística e integral (síntesis).

3.5.5. APORTE FINAL

Esta investigación fue la identificación de la microbiota bacteriana en el contenido de materia orgánica

3.6. TÉCNICAS

3.6.1. ENTREVISTA

La entrevista (Anexo 1) estuvo dirigida al propietario de la camaronera en el Humedal. Con la aplicación de esta técnica se logró recolectar información relevante sobre el estado de la misma, tecnologías que se aplican y todo lo referente al proceso productivo que desarrolla en el lugar.

3.6.2. OBSERVACIÓN

El uso de esta técnica permitió reconocer el área de estudio, además de obtener información desde los hechos reales presentes en la realidad social de la camaronera.

3.7. PROCEDIMIENTO

3.7.1.FASE I. DESCRIPCIÓN PROCESO PRODUCTIVO DE LA CAMARONERA

3.7.1.1. ACTIVIDAD 1.1. RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

Se realizó una entrevista semiestructurada (Anexo 1) en el lugar de estudio, dirigido al propietario de la camaronera con el fin de conocer acerca del proceso productivo que se desarrolla y las tecnologías que aplican.

3.7.1.2. ACTIVIDAD 1.2. ELABORACIÓN DE FLUJOGRAMA

Como resultado de la entrevista, posteriormente se analizó de forma detallada el proceso descrito y se procedió a la elaboración del diagrama de flujo con la herramienta de Microsoft Office Visio.

3.7.2.FASE II. CUANTIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA BACTERIANA PRESENTE EN FONDO DE LA LAGUNA CAMARONERA DEL HUMEDAL LA SEGUA

3.7.2.1. ACTIVIDAD 2.1. COLECTA DE MUESTRAS DE SEDIMENTOS

Las muestras de sedimento se recolectaron en puntos representativos que fueron divididos en forma aleatoria. Se seleccionó un área de 10 × 10 m, donde se empleó para la toma de muestra la metodología propuesta por Vivien *et al.*, (2019), la cual consiste en introducir a una profundidad de 20 cm del fondo de la laguna una jeringa de 10 ml para extraer el sedimento (Penna *et al.*, 2010).

Se recolectó una muestra de 10 g de sedimento, que se selló en una bolsa de plástico estéril hermética rotulada y se almacenó a -20 °C (Chen *et al.*, 2019).

Para la toma de muestras se establecieron 5 cuadrantes de 100 m² en cada esquina (4) y en el centro (1) método conocido como bandera inglesa, obteniendo al final un total de 25 submuestras (Figura 4.2).

Posteriormente estas muestras fueron transportadas en bolsas de plástico estéril en condiciones de frío (-20 °C) al Laboratorio de Biología Molecular de la ESPAM.

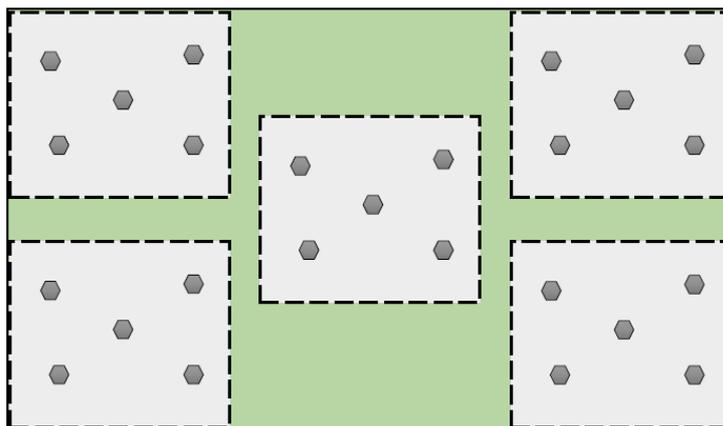


Figura 3.2. Muestreo de sedimento en la laguna camaronera.

Fuente: Zambrano Cedeño Ider Josué, (2020).

3.7.2.2. ACTIVIDAD 2.2. CULTIVO Y AISLAMIENTO DE CEPAS

Para la obtención de colonias bacterianas, estas fueron cultivadas en un medio de Sabouraud Dextrosa y Tryptic Soy Agar (TSA). El sedimento de la laguna camaronera fue homogeneizado antes de tomar una muestra de 1 g, la cual fue diluida en 9 ml de agua destilada estéril y 9 ml de agua peptona estéril (ayuda a una mejor activación de cepas inactivas). Esta constituye la solución madre para las diluciones seriadas, la suspensión madre fue diluida en serie, colocando 1 ml de la muestra en 9 ml de agua destilada estéril.

Los 100 μ L de las diluciones 10^{-1} y 10^{-3} fueron sembradas en medio agar con un esparcidor estéril de acero. Luego las placas fueron incubadas a 30 °C por 24 h. Se registraron los tipos de colonias junto con su conteo, cada tipo de colonia fue purificada mediante repique en un nuevo medio agar, por el método de estriado, hasta obtener colonias individuales puras.

3.7.2.3. ACTIVIDAD 2.3. EXTRACCIÓN DE ADN

Se utilizó el kit Powersoil® (Qiagen) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se obtuvo un volumen final de extracción de bacterias presentes en el fondo de la laguna camaronera, dando énfasis la metodología planteada por (Bravo, 2018). Posteriormente las muestras de los fondos se liofilizaron hasta que sus pesos ya no cambiaron. La concentración del ADN extraído se midió con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Fisher, EE. UU.). Todo el ADN extraído se almacenó a -20 °C para su posterior análisis (Chen *et al.*, 2019).

En la extracción de colonias puras, fue sembrada en caldo de cultivo por 18 h para la extracción de su ADN a partir del sedimento obtenido por centrifugación, continuando con la amplificación se desnaturizo en 2 minutos a 95 °C, el paso de recocido es de 1min, 1min por cada 1 kb de ADN a una extensión de 5min con temperaturas de 74 °C, realizando 25 ciclos para la detención de copias.

3.7.2.4. ACTIVIDAD 2.4. AMPLIFICACIÓN POR qPCR.

Para la identificación de las cepas bacterianas se trabajó con el gen 16SrDNA usando primers universales 16SrDNA27F y 16SrDNA1492R.

La amplificación del ADN bacteriano se realizó mediante PCR, usando oligonucleótidos universales. La relativa simplicidad de este método y sensibilidad extrema nos permiten amplificar fácilmente secuencias a partir de 16S rRNA o un gen funcional único correspondiente a la población en estudio a partir de casi cualquier entorno de 25 ciclos. Acorde a las siguientes condiciones: 45 s para la desnaturalización del ADN a 94° C, 30s de acoplamiento entre los cebadores y el ADN a 54°C, y 90s de extensión a 72°C. Se realizaron 30 ciclos con una extensión final de 10 min a 72°C, por medio de un termociclador de marca techne.

3.7.2.5. ACTIVIDAD 2.5. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS.

La secuencia purificada mediante el Wizard PCR Clean Up System de Promega y el alineamiento de la secuencia se realizó empleando el software online Blast (Basic Local Alignment Search Tool) de libre acceso, se determinó la homología mediante comparación de la secuencia en el GenBank.

El análisis se muestra en el árbol filogenético óptimo con una suma de la longitud de la rama igual a 0,415. El porcentaje es replicado y los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque con 1.000 réplicas junto a las ramas.

El árbol filogenético se diseñó, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de la distancia y están en las unidades del número de diferencias de base nitrogenadas por sitio.

3.7.3.FASE III. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE MATERIA ORGÁNICA EN FONDO DE LA LAGUNA CAMARONERA DEL HUMEDAL LA SEGUA

3.7.3.1. ACTIVIDAD 3.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE MATERIA ORGÁNICA

Para la determinación del contenido de materia orgánica, se procedió a enviar las muestras de fondo, tejidos vegetales y aguas al laboratorio de la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP. Aplicando el protocolo recomendado por Esgemar (2012) aplicando el método de calcinación, con el siguiente procedimiento:

- Se pesó una muestra de 6 o 7 g de fondo seco al aire y tamizado a 2 mm (o en la fracción requerida) y se colocó en crisoles de porcelana.
- Luego se secó el conjunto (la muestra y el crisol) en el horno a 105 °C aproximadamente entre 24 y 48 h una vez pasado este tiempo se retiró del horno y se dejó enfriar en el desecador. Cuando la muestra se enfrió se procedió a pesarla.
- Seguidamente, se calcinó la muestra en una mufla a 650 °C o 700 °C, durante 3 o 4 h.
- Después se retiró el conjunto de la mufla, se dejó enfriar en el desecador y se pesó nuevamente.
- Finalmente, se calculó la diferencia de peso entre las medidas antes y después de calcinar; esta diferencia de peso equivale a la cantidad de materia orgánica que se perdió de la muestra por efecto de la calcinación.
- Se expresó la diferencia de peso en porcentaje (%) con respecto al peso inicial de la muestra (seca a 105 °C) y ese es el porcentaje de materia orgánica que tenía la muestra.

Para el cálculo del contenido de materia orgánica de las muestras se utilizó la siguiente fórmula.

$$100 - [(wf - wt/wts - wt) * 100] = \%MO \quad [3.1.]$$

Donde:

% MO = Concentración de materia orgánica (%)

WT = Peso tarado del crisol (g)

WF = Peso final de la muestra (g)

WTS = Peso tarado del crisol + (2 g.) de la muestra

Para la interpretación de las concentraciones de materia orgánica en el sustrato de lagunas de acuicultura, se utilizó la tabla recomendada por (Boyd, 2008).

Cuadro 3.1. Concentraciones de carbono orgánico en el sedimento de laguna de acuicultura.

Materia orgánica	Comentario
Carbono orgánico (%)	
0 – 0,50	Muy bajo, no soporta un buen crecimiento del bentos
0,51 – 1,00	Bajo para lagunas fertilizadas, pero excelente para lagunas con alimentación
1,01 – 2,50	Óptimo para lagunas fertilizadas y aceptable para lagunas con alimentación
Más de 2,50	Excesivo, propenso a tener zonas anaeróbicas en el fondo

Fuente: (Boyd, 2008).

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DIAGNÓSTICO DEL PROCESO PRODUCTIVO DE LA CAMARONERA

El propietario de la camaronera desconoce de leyes o reglamentos gubernamentales que promuevan el desarrollo del sector camaronero, se evidencia la ausencia de personal técnico capacitado, por tal razón esta camaronera se maneja de manera empírica.

Esto no coincide con lo planteado por Hernández (2013) donde las prácticas de cultivo semiintensivo requieren de un control sobre densidades, calidad de agua y recambio, por ello los muestreos de población y análisis fisicoquímicos deben ser continuos con la finalidad de lograr condiciones óptimas de supervivencia y crecimiento.

Las características de este tipo de crianza son las siguientes: las lagunas deben presentar una superficie de 1 a 5 ha, con una profundidad de entre 1 a 1,2 m, una siembra entre 10 y 30 PL/m². El agua mediante bombeo es cambiada, empleándose un mínimo de aireación artificial. La alimentación consiste en alimentos naturales obtenidos mediante fertilización de laguna, dieta complementada de 2 o 3 veces/día. Se realizan dos cosechas por año, con rendimientos de producción que oscilan entre 500 y 2.000 kg/ha/cosecha (Salazar, 2019).

Las actividades asociadas como son: la preselección de la larva, la fertilización de la laguna, el llenado, la acumulación de materia orgánica, la alimentación, la siembra de las larvas, el manejo de la laguna y la cosecha. Esta información fue posteriormente utilizada para la elaboración del flujograma de proceso, que coinciden con las expuestas por (Cedeño y Vera, 2019).

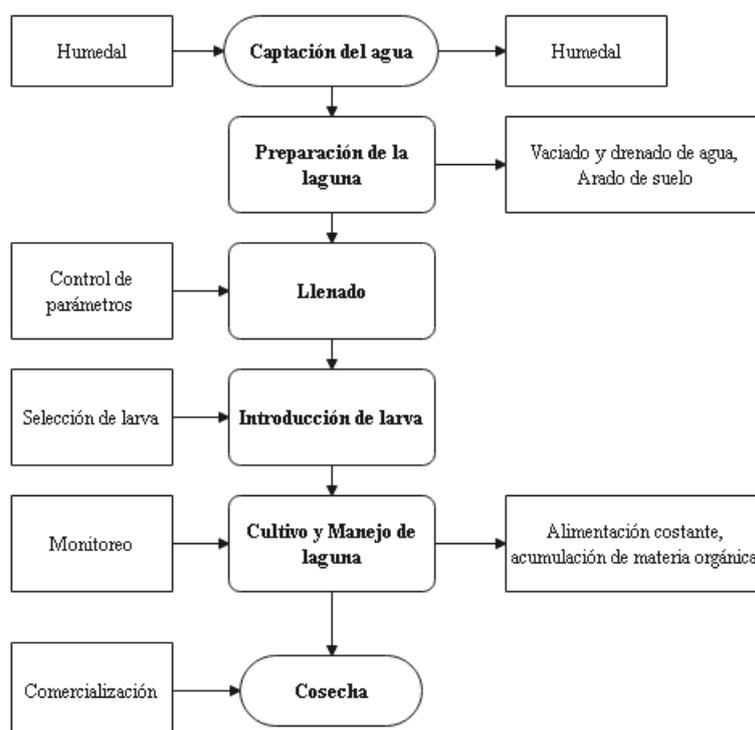


Figura 3.3. Diagrama de flujo del proceso del camarón.

Fuente: Zambrano Cedeño Ider Josué, (2020).

4.1.1. CAPTACIÓN DEL AGUA

Para llevar a cabo el cultivo del camarón, utiliza agua extraída del humedal, con un pH que varía desde 7,5 a 8. Como se conoce el pH indica cuán ácida o básica puede ser el agua. De una manera más práctica Boyd (2008); Gurrola (2016) plantean que las lagunas de agua salobre generalmente tienen un pH de 7 a 8 por la mañana, pero en la tarde generalmente suben entre 8 a 9. La fluctuación diaria del pH en la laguna resulta de los cambios en la fotosíntesis del fitoplancton y otras plantas acuáticas.

4.1.2. PREPARACIÓN DE LA LAGUNA

Luego de la preparación, se espera 21 días para la siembra del camarón, hasta que la materia orgánica esté totalmente seca, eliminando cualquier objeto sólido y orgánico no favorable para el cultivo. Se remueve el fondo manualmente o con máquinas si es necesario, seco totalmente el fondo es tratado con cal viva con el objetivo de obtener una excelente producción.

La desinfección con cal viva es una de las técnicas más usadas por los productores para eliminar patógenos existentes en el medio, pero a su vez el uso excesivo de esta técnica puede atentar contra los formadores de materia

orgánica como es el caso de las bacterias. Para este planteamiento se toma como referencia los estudios realizados por Anjel *et al.*, (2010), donde plantea que el uso de la cal como bactericida es parte del acervo cultural tradicional. Este autor demuestra que la aplicación de hidróxido de calcio y de cal viva como bactericida obtiene resultados favorables.

4.1.3. LLENADO

La Laguna camaronera del Humedal la Segua consta con las siguientes dimensiones:

Cuadro 4.1. Dimensión de la laguna camaronera.

Nº lagunas	Altura (m)	Dimensiones (m ²)	Volumen (m ³)
Laguna 1	1,5	4.965	7.447,6

Este proceso se lo realiza con bombas de agua, con una duración de 1 a 2 días y durante el llenado midiendo parámetros como: pH y salinidad.

Las actividades difieren en parte con lo planteado por Cedeño y Vera (2019) donde toma en cuenta el principio decantador, reservorio y laguna. Esta actividad tarda alrededor de 4 a 5 días. Por otra parte, se plantea que el proceso de llenado debe ser lento y con supervisión estricta, los filtros no deben ser removidos de las estructuras de entrada y salida durante por lo menos los primeros 30 días de cultivo. Se debe establecer un plan de manejo de filtros y bolsos, que contemple la reducción de entrada de organismos no deseables al sistema de producción (Anjel *et al.*, 2010).

4.1.4. INTRODUCCIÓN DE SIEMBRA

El proceso de siembra se realiza en las primeras horas de la mañana o en la noche, a una densidad de 60.000 larvas de procedencia nacional adquiridas en laboratorios existentes en la región; suposiciones aportadas por el propietario del lugar afirma que, si hay una sobrepoblación suelen morir en la laguna los menos aptos, por lo que se deben liberar las densidades en correspondencia con la superficie existente.

Se plantea que esta es una actividad de estricto cumplimiento, y se debe garantizar condiciones que favorezcan el buen desarrollo del cultivo, como son: adecuado nivel hídrico de la laguna, buena población de fitoplancton, parámetros

fisicoquímicos normales; la realización de esta actividad no excluye monitorear dichos parámetros durante el proceso de aclimatación y en el momento de la siembra (Anjel *et al.*, 2010).

Las postlarvas deben ser liberadas a intervalos de 50 m en las lagunas con la ayuda de una manguera parcialmente sumergida. Promedios de sobrevivencia de 85% son considerados aceptables. Si se obtienen promedios menores se debe realizar siembras adicionales hasta completar la densidad de siembra (Boyd *et al.*, 2005).

4.1.5. CULTIVO Y MANEJO DE LAGUNA

Durante el proceso de manejo del cultivo en la granja no se realiza un correcto diagnóstico y control de las enfermedades. Por otra parte el control de los parámetros de calidad del agua lo efectúan con poca frecuencia y de manera empírica.

La principal causa del bajo rendimiento en una laguna está muy relacionada con el desconocimiento de la tecnología para su manejo expresado por (Vera, 2012). El monitoreo de los parámetros del agua es de vital importancia en el correcto manejo de este cultivo, se recomienda que esta se debe realizar diariamente en horas de la mañana, siendo estos: dureza, temperatura, salinidad, pH y amonio; se realizan a 30 cm de fondo de las lagunas, concordando con lo mencionado por (Cuellar *et al.*, 2010).

La temperatura del agua para el cultivo de camarón es considerada como uno de los parámetros de más fácil medición y por ende el más medido en el proceso, los rangos de las temperaturas óptimas para este sistema de cultivo se oscilan entre los 26 °C a 27 °C en el alimento artificial para esta especie debe contar con una cuidadosa selección de sus componentes, se debe tomar en cuenta su digestibilidad y atractabilidad que aporte en el crecimiento y engorde del camarón (Muñoz y Santana, 2019).

El desconocimiento, la frecuencia o ausencia de estudios relacionados con el estado de salud de la laguna, puede provocar pérdidas por causa de la propagación de agentes patógenos (Vera, 2012). Paucar *et al.* (2018) hacen referencia a varias enfermedades tales como: El virus de la Mancha Blanca,

Parasitosis generada por Gregarinas (*Nematopsis* sp), hepatopancreatitis necrotizante; en el caso de las enfermedades fúngicas en la etapa larvaria es amenazada por hongo de los géneros *Lagenidium*, *Sirolopidium* y *Fusarium*; estas enfermedades afectan la vida del camarón y pueden llegar a constituir cuantiosas pérdidas en este cultivo.

4.1.6. COSECHA

Según datos obtenidos de la encuesta realizada en 190 días la cosecha se realiza cuando el camarón logre el peso, tamaño y calidad deseada ya que es mejor para la comercialización y por ende le reporta mayor beneficio. Le suministra mayor cantidad de alimento en la noche y tardar varias horas dependiendo de las condiciones climáticas. La pesca se realiza a través de una compuerta donde drena el agua y el camarón queda atrapado, posteriormente lo colocan en una cubeta con hielos, que son llevadas para la distribución.

Es recomendable que el camarón una vez cosechado, se congele vivo con el fin de garantizar una buena calidad. Se procede a su pesado para ello se depositan en recipientes limpios, si existe sospecha de contaminación con bacterias patógenas se debe desinfectar con cloro siguiendo los protocolos establecidos. Para su transporte hacia la planta procesadora los camarones son colocados en recipientes con suficiente hielo con el objetivo de lograr una temperatura inferior a los 5 °C para garantizar su calidad (Boyd *et al.*, 2005).

Cuadro 4.2 Coordenadas de recolección de muestras por transecto.

Coordenadas de muestreo por transecto										
Muestras	T1		T2		T3		T4		T5	
	Latitud	Longitud								
Muestra 1	0588918	9922161	0588886	9922158	0588877	9922207	0588915	9922210	0588898	9922191
Muestra 2	0588914	9922162	0588880	9922158	0588811	9922207	0588911	9922210	0588901	9922191
Muestra 3	0588915	9922164	0588883	9922161	0588879	9922205	0588913	9922207	0588900	9922190
Muestra 4	0588917	9922165	0588886	9922163	0588879	9922203	0588914	9922205	0588898	9922187
Muestra 5	0588914	9922165	0588881	9922163	0588880	9922204	0588911	9922204	0588902	9922186

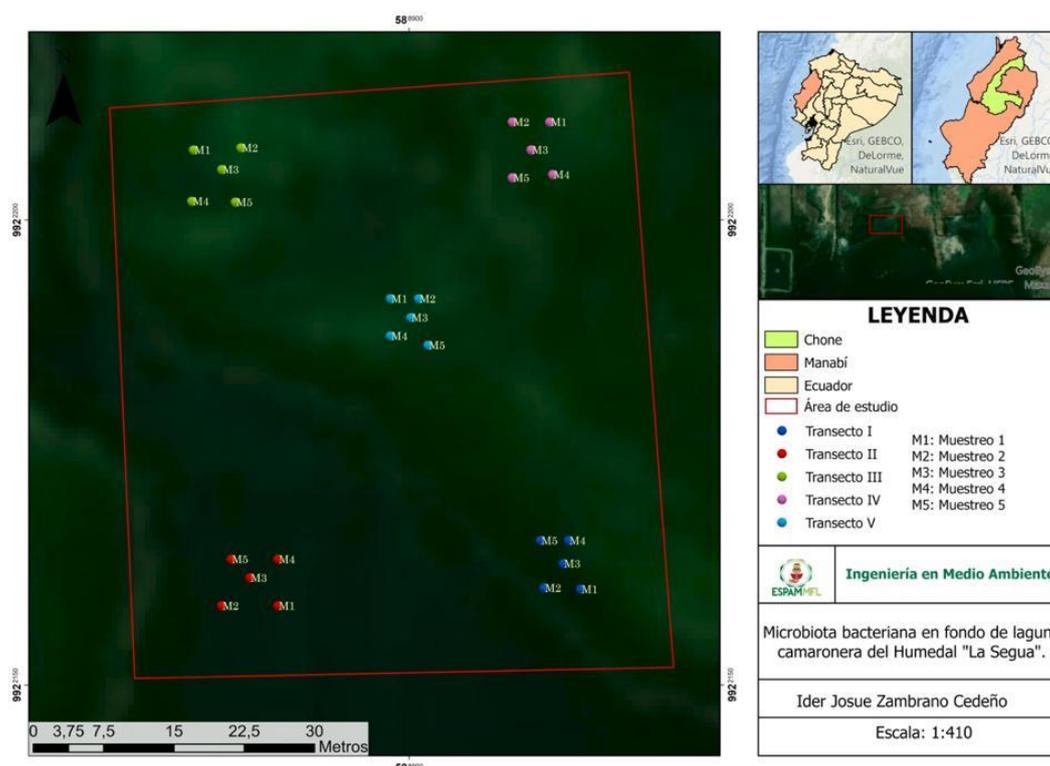


Figura 4.4. Mapa del área de estudio.

Fuente: Zambrano Cedeño Ider Josué, (2020).

4.2. CUANTIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA BACTERIANA PRESENTE EN FONDO DE LA LAGUNA CAMARONERA DEL HUMEDAL LA SEGUA

En la identificación molecular de cepas, se contabilizó un total de $5,6 \times 10^4$ UFC/g de fondo cuadro 4.3. En este medio de cultivo se establecieron cinco colonias de las cuales la colonia BRP, fue la de mayor UFC/g de fondo, seguida de TRP con $2,10 \times 10^4$ UFC/g de fondo.

Cuadro 4.3. Lista de colonias aisladas en SBDx con su respectivo conteo.

Medio	Colonias	Conteo UFC/g fondo	Código
Sabouraud Dextrosa	BRG	1×10^3	1DX
	BRM	$1,5 \times 10^3$	2DX
	CRM	1×10^3	3DX
	TRP	$2,1 \times 10^4$	4DX
	BRP	$3,1 \times 10^4$	5DX
TOTAL		$5,6 \times 10^4$	

Fuente: Servicios Conceptazul S.A, (2020).

En el medio TSA se aislaron inicialmente nueve tipos de colonias con un total de 11 cepas. El conteo total en TSA fue superior a $1,85 \times 10^5$ UFC/g de fondo (Cuadro 4.4). Las colonias diminutas fueron superiores al resto con más de 1×10^5 UFC/g de fondo seguido por las colonias BRP y BlmP. Se purificaron 16 cepas de características morfológicas diferentes (cuadro 4.6).

Cuadro 4.4. Lista de colonias aisladas en TSA con su respectivo conteo.

Medio	Colonias	Conteo UFC/g fondo	Código
Tryptic Soy Agar	CRM	3×10^3	6-1TS
	CRM		6-2TS
	BRM	$1,2 \times 10^4$	7TS
	GrisRp c/pto	7×10^3	8TS
	BRP	$2,46 \times 10^4$	9TS
	CIP	5×10^3	10TS
	BlmP	7×10^3	11TS
	CRmP	$2,0 \times 10^4$	12S
	GRisRp	6×10^3	13TS
	Colonias diminutas	$>1 \times 10^5$	14TS 9-1 14TS 9-2
	TOTAL	$>1,85 \times 10^5$	

Fuente: Laboratorio de I&D y Servicios Conceptazul S.A. (2020).

Estos resultados difieren de los resultados obtenidos por Quimis (2005) en muestras de fondo en sistemas de cultivo semi-intensivos e intensivo con concentraciones de bacterias totales de $3,71 \times 10^7$, $4,00 \times 10^8$, $9,52 \times 10^8$ UFC/g de fondo.

Estudios realizados por Carrasco (2004) confirman que las bacterias totales aisladas en sedimento alcanzan densidades poblacionales muy altas con rangos entre 1×10^7 y 1×10^9 UFC/g de suelo, mientras que en un estudio previo en CENAIM las concentraciones registradas en fondo de lagunas camaroneras se ubicaron entre 1×10^3 y 3×10^8 UFC/g.

Dabadé et al. (2016) durante dos períodos evaluaron la concentración bacteriana en camarones, agua y fondo en dos lagunas de África Occidental, obteniendo como resultado que las concentraciones promedio de bacterias en fondo se comportaron por debajo del límite de detección con valores por debajo de 1×10^1 UFC/g.

Cuadro 4.5. Lista de cepas aisladas en SBDx con su respectiva identificación y porcentaje de homología de secuencia.

Código	Identificación Molecular	Homología
1DX	<i>Bacillus aryabhatai</i> strain HFBP06	99,80%
	<i>Bacillus megaterium</i> strain FDU301	99,50%
2DX	<i>Bacillus aryabhatai</i> strain HFBP06	99,80%
	<i>Bacillus megaterium</i> strain FDU301	99,50%
3DX	<i>Bacillus</i> sp. PN13	99,93%
	<i>Bacillus megaterium</i> strain YM1C5	
4DX	<i>Bacillus altitudinis</i> strain NPB34b	99,86%
	<i>Bacillus altitudinis</i> strain SCU11	
5DX	<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b	99,86%

Fuente: Laboratorio de I&D y Servicios Conceptazul S.A. (2020).

La identificación molecular de las cepas aisladas en SBDx se obtuvo que las bacterias pertenecen al género *Bacillus* ubicadas en cepas y especies diferentes. Como se puede observar (cuadro 4.5) la totalidad de las cepas identificadas mostraron un porcentaje de homología superior al 99% con mayor número para *Bacillus altitudinis* strain NPB34b y *Bacillus altitudinis* 41KF2b que ambas presentaron un 99,86%.

Estudios realizados por López *et al.* (2019) con el fin de evaluar la formación de biopelículas de las bacterias aisladas de fondos marinos en condiciones in vitro en Colombia, obtuvieron como resultado que todos los aislados analizados en su investigación pertenecen al género *Bacillus*, lo que indica la abundancia de bacterias de este género en los fondos acuáticos, coincidiendo con los resultados obtenidos en esta investigación.

Por su parte Díaz y Pucci (2016) también reportan la presencia de bacterias del género *Bacillus*, en sedimento intermareal de la laguna en Comodoro Rivadavia Argentina en este estudio se comprobó la resistencia de *Bacillus* sp antibióticos.

Cuadro 4.6. Lista de cepas aisladas en TSA con su respectiva identificación y porcentaje de homología de secuencia.

Código	Identificación Molecular	Homología
6-1TS	<i>Bacillus marisflavi</i> strain TF-11	99,86%
6-2TS	<i>Bacillus marisflavi</i> strain TF-11	99,45%
7TS	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22	99,79%
	<i>Bacillus megaterium</i> strain ATCC 14581	99,59%
8TS	<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b	99,93%
	<i>Bacillus stratosphericus</i> strain 41KF2a	99,86%
9TS	<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b	99,93%
10TS	<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b	99,93%
11TS	<i>Exiguobacterium aquaticum</i> strain IMTB-3094	99,46%
	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i> strain DSM 6208	99,26%
12S	<i>Acinetobacter lwoffii</i> strain JCM 6840	99,59%
	<i>Acinetobacter lwoffii</i> strain DSM 2403	99,31%
13TS	<i>Acinetobacter lwoffii</i> strain DSM 2403 16S	99,72%
	<i>Prolinoborus fasciculus</i> strain CIP 103579 (95% coverage)	99,79%
14TS 9-1	<i>Arthrobacter oryzae</i> strain KV-651	99,10%
	<i>Arthrobacter humicola</i> strain KV-653	98,61%
14TS 9-2	<i>Arthrobacter plakortidis</i> strain AS/ASP6 (II)	99,17%
	<i>Planococcus maritimus</i> strain TF-9	98,62%

Fuente: Laboratorio de I&D y Servicios Conceptazul S.A, (2020).

Como se puede observar en el cuadro 4.6, las secuencias obtenidas permitieron encontrar homología superior al 99%, la cual permite asignar un resultado a nivel de género y especie en las cepas analizadas, destacando al género *Bacillus* como el de mayor abundancia. Estos resultados coinciden con lo estudiado por Castelblanco *et al.* (2020) en fondos de humedales de Bogotá, donde identificaron cepas amilolíticas y celulolíticas aisladas e identificadas como *Bacillus amyloliquefaciens*, *Stenotrophomonas nitritireducens* y *Yersinia massiliensis* en este estudio que son bacterias con alta capacidad enzimática. Lo que demuestra la abundancia de bacterias del género *Bacillus* en fondos de fondos acuáticos.

En una laguna camaronera en Corea, Yoon *et al.*, (2003) aislaron e identificaron cepas de un grupo de bacterias, destacando las del género *Bacillus* entre ellas

también *Planococcus* y *Planomicrobium*. Este resultado coincide por varios autores donde demuestran la alta actividad bacteriana en los fondos acuáticos, destacándose el género *Bacillus* en muchos de estos estudios.

De igual manera Yang *et al.* (2020) en su estudio de las comunidades microbianas asociadas con la Biodegradación de acetaminofén en fondo de laguna, identificó 16 géneros bacterianos que presentaron propiedades para degradar esta sustancia. Este informe mostró que *Bacillus pumilus*, *Bacillus aerius*, *Bacillus aryabhatai*, *Enterobacter*, *Clostridium sphenoides* y *Lysinibacillus sp.* tienen la capacidad de degradar este compuesto. Sin embargo, no hay información sobre las propiedades de degradación de *Arthrobacter ginkgo*.

Por otra parte Padmanaban *et al.* (2019) en un estudio de la diversidad microbiana y bioprospección de bacterias en fondos marinos profundos inexplorados del La bahía de Bengala y el mar de Andaman. Observó una alta abundancia de bacterias grampositivas destacando como género dominante a *Bacillus*, coincidiendo una vez más con lo planteado por varios autores en este capítulo, que reportan la presencia de este género en la mayoría de los fondos acuáticos. En este estudio se identificó la especie *Bacillus aryabhatai* y *Planococcus halocryophilus*.

Capkin *et al.* (2015); Krakat (2016) citados por Yuan *et al.* (2019) identificaron a las bacterias *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* y *Acinetobacter lwoffii* en ambientes de acuicultura especialmente en fondos al norte de China. Estas especies parecían poseer genes de resistencia a los antibióticos sulfonamidas y tetraciclinas. Este fenómeno de resistencia puede contribuir en posibles fracasos en el tratamiento de enfermedades de especies acuáticas.

Arthrobacter oryzae cepa es KV-651T y *Arthrobacter humicola sp.* cepa KV-653T fueron aisladas por primera vez por Kageyama *et al.*, (2008) en una muestra de fondos de un arrozal en Japón donde se reportaron como nuevas especies para este género. En este estudio en fase de laboratorio determinaron la capacidad de estas especies degradar varias fuentes de carbono y tolerancia del NaCl.

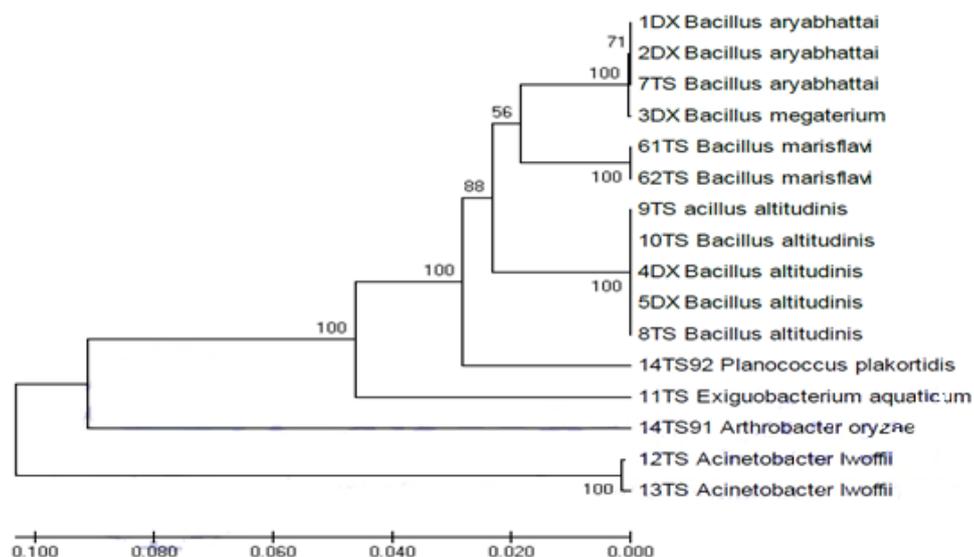


Figura 4.5. Árbol filogenético.

Fuente: Laboratorio de I&D y Servicios Conceptazul S.A, (2020).

En base al análisis del árbol filogenético de las secuencias de la región 16S rDNA de los grupos bacterianos estudiados, se observó que entre las especies *Bacillus aryabhatai* (1DX), *Bacillus aryabhatai* (2DX), *Bacillus aryabhatai* (7TS) y *Bacillus megaterium* (3DX) compartieron una misma clade en base a un alto porcentaje de homología entre las secuencias alineadas. A su vez *Bacillus marisflavi* (61TS) y *Bacillus marisflavi* (62TS) compartieron otra clade compartiendo un 100% de homología.

Por otra parte, *Bacillus altitudinis* (9TS), *Bacillus altitudinis* (10TS), *Bacillus altitudinis* (4DX), *Bacillus altitudinis* (5DX), *Bacillus altitudinis* (8TS) compartieron un 100 % de homología de sus secuencias alineadas. Asimismo, *Acinetobacter twoffii* (12TS) y *Acinetobacter twoffii* (13TS) compartieron un mismo grupo con un 100 % de homología de sus secuencias. El resto de las especies bacterianas secuenciadas no mostraron homología con ninguna otra especie microbiana de las estudiadas en el presente trabajo.

4.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE MATERIA ORGÁNICA EN FONDO DE LA LAGUNA CAMARONERA DEL HUMEDAL LA SEGUA

Los porcentajes de contenido de materia orgánica se resumen en la figura 4.6; donde la mayor cantidad se presentaron en las muestras 1 y 5 con valores de 2,20% y 2% respectivamente. Estos valores se encuentran dentro del rango óptimo para lagunas fertilizadas y aceptable para la laguna con alimentación (Boyd, 2008). El nivel más bajo correspondió a la muestra 4 con 1%, según lo planteado por este autor, este nivel es bajo para la laguna con fertilización y a su vez es excelente para la laguna con alimentación.

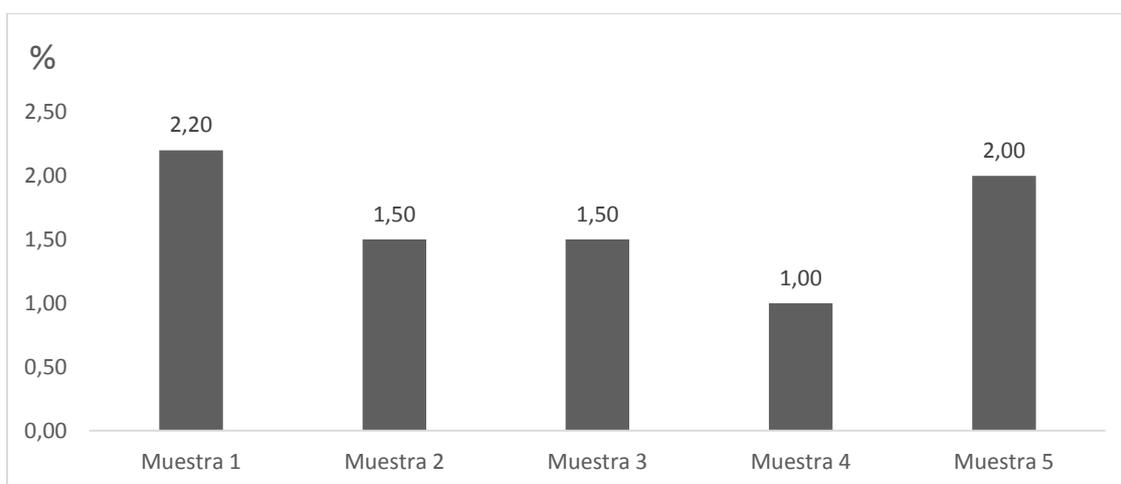


Figura 4.6. Distribución del porcentaje de materia orgánica según la zona de muestreo.

Fuente: Zambrano Cedeño Ider Josué, (2020).

Los valores expresados en la figura anterior concuerdan con los expuestos por Padilla (2019), quien coincide en que tanto lagos como humedales son fuentes ricas en materia orgánica almacenadas en sus sedimentos, estos ecosistemas albergan alrededor de 350 a 535 gigatoneladas de carbono, casi una cuarta parte de C orgánico del suelo a nivel mundial.

Por otra parte, estos resultados difieren de lo expresado por Mayorga *et al.* (2017), donde obtuvo valores bajos y muy bajos de materia orgánica, según el cuadro 3.1 en camaronerías localizadas en el estuario del río Portoviejo, con valores que oscilan de -0,002 5 hasta 0,874 % de materia orgánica.

Tomando como referencia lo expuesto por Boyd (2008) donde plantea que la materia orgánica fresca se degrada más fácil que la que se encuentra en el fondo, esto puede estar influenciado por el inadecuado manejo de la

alimentación en la laguna contribuyendo, a que este no se consuma y forme parte del sedimento afectando, la calidad de este y crear zonas de bajo contenido de oxígeno. La zona número 4 con valores de 2,20% se le debe prestar atención ya que está próxima al rango excesivo de 2,50% y puede manifestar ausencia de oxígeno en el fondo.

Estos resultados también pueden estar influenciados por la actividad bacteriana, aspecto que guarda estrecha relación con el contenido de materia orgánica. Hernández (2010) afirma que las bacterias heterótrofas toman energía para su desarrollo a partir de la actividad de la transformación de la materia orgánica. Estas bacterias aeróbicas como parte de su metabolismo obtienen energía a partir de la descomposición de la materia orgánica, jugando un papel protagónico en la degradación del carbono orgánico.

En relación con lo ante expuesto, Zhao *et al.* (2020) plantea que los microorganismos que viven en el entorno de la acuicultura son esenciales para el metabolismo de nutrientes y ciclo de energía. Este autor demostró la existencia de dos tipos de bacterias degradadoras de la materia orgánica (*Bacillus sp.* y *Pseudomonas sp.*), estas fueron aisladas en lagunas de crías de *A. japonicus* y se demostró que influyen en la degradación de la demanda química de oxígeno de los fondos de estas zonas.

Kageyama *et al.* (2008) reportan la capacidad de *Arthrobacter oryzae sp.* cepa KV-651T y *Arthrobacter humicola sp.* cepa KV-653T de utilizar para su proceso metabólico varias fuentes de carbono y soportar niveles de salinidad de hasta 5% y valores de pH de 4–11 en fase de laboratorio. Estas especies fueron colectadas en ecosistemas arroceros de Japón lo que justifica su presencia en estos ambientes de abundante humedad.

Las comunidades bacterianas en el entorno de la acuicultura pueden reflejar las características ecológicas de este ecosistema, de ahí la importancia del cuidado de estos ambientes. Por ejemplo, se ha reportado que algunas de las bacterias en entornos de acuicultura pueden acelerar la descomposición de alimento residual y heces para purificar la calidad del agua y socavar los niveles de eutrofización. Otros microorganismos presentes pueden convertir sustancias

tóxicas, como amoníaco, nitrito e hidrógeno sulfuro, en formaciones poco tóxicas o no tóxicas para proteger la supervivencia de especies de cultivo en lagunas de acuicultura (Zhao *et al.*, 2020).

Los resultados expuestos en esta investigación se corresponden a lo planteado por Lopez & Arias (2017), donde refiere a que *Bacillus* spp, como una de las bacterias más usadas en la recuperación de los suelos debido a su especificidad en la degradación de materia orgánica. Esta correlación de materia orgánica debido de la acumulación en el fondo predomina presencia de microbiota lo cual es beneficiado para esta laguna camaronera.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Al finalizar el proceso productivo del camarón en el fondo estudiados en esta laguna representan un potencial de actividad microbiana, que podría ser explotadas para nuevos estudios.
- Mediante la técnica de qPCR se enfatiza el género *Bacillus* reportado como uno de los mayores consumidores de materia orgánica en estos fondos camaronero; entre ellas con un 99% de homología *Exiguobacterium, Acinetobacter, Prolinoborus, Arthrobacter Planococcus*.
- El contenido de materia orgánica en el fondo de laguna camaronera es óptimo para esta actividad, según los datos obtenidos con valores de 1 a 2,20% lo cual está influenciado por la actividad bacteriana presente.

5.2. RECOMENDACIONES

- Monitorear anualmente la laguna camaronera para estudiar el comportamiento y evolución de la microbiota.
- Complementar con criterios parámetros físicos y químicos asociados a la materia orgánica para poder establecer correlaciones con la degradación de la materia orgánica, producto de la actividad ejercida por las bacterias en el fondo de la laguna.
- Aprovechar los fondos camaroneros con el fin de recircularlo y así evitar impactos ambientales como la eutrofización actividades de concienciación con los productores para que adopten nuevas tecnologías.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, D. (2018). Control de buenas prácticas de manejo de los insumos en el cultivo semi intensivo de *Litopenaeus vannamei*. [Tesis de Ingeniería Acuícola, Universidad Técnica de Machala]. http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/12902/1/DE00005_EXAMENCOMPLEXIVO.pdf
- Andueza, F. y Alarcon, D. (2019). Microbiota bacteriana de la laguna de Cuicocha y sus aplicaciones biotecnológicas. [Tesis de Ingeniería Ambiental, Universidad Central Del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/19013/1/T-UCE-0012-FIG-119.pdf>
- Anjel, J., Lara, C., Morales, V., Gracia, A., y Suárez, O. (2010). Manual de buenas prácticas de manejo para el cultivo del camarón blanco *Penaeus vannamei*. Panama, New Concept Publications https://utm.edu.ec/fcv/acuicultura/images/acuicultura/pdf_revistas/Manual_de_buenas_practicas_de_manejo_para_el_cultivo_de_camaron_blanco.pdf
- Arteaga, E. 2012. La contaminación de la ciénaga “La Segua”, la pérdida de su flora –fauna y propuesta educativa. [Tesis. Licenciatura en Ciencias de la Educación. UTE. Chone-Manabí, EC]. <http://repositorio.ute.edu.ec/xmlui/handle/123456789/2853>
- Asamblea Nacional. (2008). Constitución de la República del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Badía, M., Hernández, B., Mahillon, J., Pérez, J., y Heydrich, M. (2011). Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Revista Brasileira de Agroecologia, 6(1). https://orgprints.org/23097/1/Bad%C3%ADa_Aislamiento.pdf
- Bolívar, A., Rojas, A., y García-Lugo, P. (2014). PCR y PCR Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. Rev. Avances en Biomedicina, 3(1), 25-33. https://www.redalyc.org/pdf/3313/Resumenes/Resumen_331330398005_1.pdf
- Boyd, C. (2008). Análisis de suelos del fondo de los estanques. Auburn University, Department of Fisheries and Allied Aquacultures.
- Boyd, C. (2019). ¿Cuál es el papel de las bacterias en los estanques acuícolas? Acuicultura, 33-35.
- Boyd, C., Kwei, C., Pantoja, C., Lightner, D., Brock, J., Johnson, K. y Treece, G. (2005). Buenas Prácticas de Manejo para el Cultivo de Camarón. Graphic Services.

- Bravo, P. (2018). Bacterias asociadas a muestras de sedimentos y zooplancton en el Golfo de México. [Maestría en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/2517/1/tesis_Bravo%20Ba%C3%A1s_%20Pablo_15_oct_2018.pdf
- Buenfil, J. 2009. Adaptación a los impactos del cambio climático en los humedales costeros del golfo de México. https://wwflac.awsassets.panda.org/downloads/humedales_vol_1.pdf
- Burgos, J. y Pazmiño, G. 2017. Ictiofauna como Bio indicador de Calidad de Agua en el Humedal La Segua –Chone. [Tesis. Ingeniería en Medio Ambiente, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, MFL. <http://repositorio.esпам.edu.ec/bitstream/42000/603/1/TMA122.pdf.6>
- Carrasco, L. L. (2004). Métodos de estudio de los cambios estructurales en ecosistemas microbianos edáficos y su aplicación ambiental. *Ciencia al día*, 5(1), 24.
- Castelblanco, E., Martín, J., Morales, S., y Rodríguez, J. (2020). Aislamiento e identificación de microorganismos potencialmente amilolíticos y celulolíticos de suelos de humedales de Bogotá. *Rev. Colomb. Biotecnol*, 36(44). http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-34752020000100036&script=sci_abstract&lng=es
- Castro, J. (2009). Desarrollo y Análisis del Sistema PCR. 1-160. (file:///C:/Users/Home/Downloads/Dialnet-ImplementacionDeUnMultiplexPCRParaElDiagnosticoDel-6325513%20(1).pdf).
- Cedeño, J., y Vera, M. (2019). Variabilidad fisicoquímica del agua durante el proceso productivo del camarón patiblanco (*litopenaeus vannamei*) en una laguna camaronera, sitio El Pueblito, Chone. Calceta: [Tesis. Ingeniería en Medio Ambiente, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, MFL. <http://repositorio.esпам.edu.ec/handle/42000/983>
- Centro de Ecología Aplicada. (2006). Conceptos y criterios para la evaluación ambiental de humedales. Chile: Ministerio de Agricultura. Pag. Web. <https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/GUIAV67JUNIO2007.pdf>
- Chen, J., Su, Z., Dai, T., Huang, B., Mu, Q., Zhang, Y., y Wen, D. (2019). Occurrence and distribution of antibiotic resistance genes in the sediments of the East China Sea bays. *Journal of Environmental Sciences*, 156-167. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S100107421832895X>
- Consejo de Evaluación de los Ecosistemas en el Mundo. 2005. Los ecosistemas y el bienestar humano: humedales y agua. Informe de síntesis: un Informe de la Evaluación de los Ecosistemas del Milenio. Washington DC, US.

https://www.millenniumassessment.org/documents/MA_WetlandsandWater_Spanish.pdf.

Convención de Ramsar. 1993. La Evolución Jurídica de la Convención de Ramsar. www.ramsar.org/cda/es/ramsar-pubs-books-legal-development-of/main/ramsar/1-30-101%5E23880_4000_2__.

Convención de Ramsar. 2007. ¿Qué son los humedales? <https://www.ramsar.org/sites/default/files/documents/library/info2007sp-01.pdf>.

Convención de Ramsar. 2016. Introducción a la Convención sobre los humedales. Manual de la Convención de Ramsar. 5 ed. (https://www.ramsar.org/sites/default/files/documents/library/handbook1_5ed_introductiontoconvention_s_final.pdf).

Convención de Ramsar. 2018. Los humedales desaparecen tres veces más rápido que los bosques. <https://www.iagua.es/noticias/ramsar/humedales-desaparecen-tres-veces-mas-rapido-que-bosques>.

Correa, F; Urrutia, J; Figueroa, R. 2011. Estado del conocimiento y principales amenazas de los humedales boscosos de agua dulce de Chile. Santiago, CL. Revista chilena de historia natural. 84(3). https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttextpid=S0716-078X2011000300002.

Cortés, L. 2017. Aproximación al paisaje de los humedales urbanos de Bogotá dentro de la estructura ecológica principal de la ciudad. Cuadernos de Geografía: Revista Colombiana de Geografía. 27(1). <http://www.scielo.org.co/pdf/rcdg/v27n1/0121-215X-rcdg-27-01-00118.pdf>.

Dabadé, D. S., Wolkers-Rooijackers, J. C., Azokpota, P., Hounhouigan, D. J., Zwietering, M. H., Nout, M. R., & Besten, H. M. (2016). Bacterial concentration and diversity in fresh tropical shrimps (*Penaeus notialis*) and the surrounding brackish waters and sediment. *International Journal of Food Microbiology*, 218, 96-104. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.11.013>.

Delgadillo, O; Camacho, A; Pérez; Andrade, M. 2010. Depuración de aguas residuales por medio de humedales artificiales. Cochabamba, BO. <https://core.ac.uk/download/pdf/48017573.pdf>.

Díaz, E; Alvarado, A; Camacho, K. 2012. El tratamiento de agua residual doméstica para el desarrollo local sostenible: el caso de la técnica del sistema unitario de tratamiento de aguas, nutrientes y energía (SUTRANE) en San Miguel Almaya. Revista Quivera. 14(1) 78-97. <https://www.redalyc.org/pdf/401/40123894005.pdf>

- Díaz, R., Pucci, O. H., Y Pucci, G. N. (2016). Patrones de resistencia a antibióticos de bacterias aisladas en el sedimento intermareal de la playa en Comodoro Rivadavia (Argentina). *Higiene y Sanidad Ambiental*, 16(4). [https://saludpublica.ugr.es/sites/dpto/spublica/public/inline-files/bc580e0738ef3c7_Hig.Sanid_.Ambient.16.\(4\).1461-1466.\(2016\).pdf](https://saludpublica.ugr.es/sites/dpto/spublica/public/inline-files/bc580e0738ef3c7_Hig.Sanid_.Ambient.16.(4).1461-1466.(2016).pdf)
- Domínguez, R; Palma, M; Praus, S. 2015. La situación jurídica de las actuales áreas protegidas de Chile. http://bdrnap.mma.gob.cl/recursos/privados/Recursos/CNAP/GEF-SNAP/Praus_Palma_Dominguez_2011.pdf
- Durán, A. (2019). Identificación y cuantificación relativa de genes involucrados en la biosíntesis de biosurfactantes en bacterias marinas. [Tesis de Maestro en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos]. <http://riaa.uaem.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/20.500.12055/703/DUJARN07T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- EEUU, B. N. (2015). PCR for detection of the Vibrio. *BMC Microbiol*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4624192/>.
- Esgemar. (2012). Sistema de Muestreo. Página Web 1-2. <http://www.esgemar.com/pdf/DRAGA-VANVEEN.pdf>
- Faillace, J., Vergara, R., y Suarez, A. (2016). Evaluación de una fórmula alimenticia para camarón de cultivo (*L. vannamei*) con inclusión de proteína vegetal a base de harina de soya. *Rev. AquaTIC*, 12-29. <http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/271>
- Fayanás, E. 2011. Los humedales. (En línea). EC. Consultado, 20 de ene. 2019. Formato HTML. Disponible en <https://www.nuevatribuna.es/articulo/medio-ambiente/los-humedales/20110713152234057824.html>.
- Fabricio, F., Macías, P., y Díaz Ponce, M. A. R. I. E. L. A. (2020). Actividades antropogénicas en la parroquia san Antonio y su incidencia en la calidad del agua del Humedal la Segua
- Feria, M., Castañeda, A., Toledo, O., Castillo, D., Cueva, M., Y Cedeño, V. (2019). Caracterización molecular ómica de una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* aislada de la microbiota del paiche *Arapaima gigas* con actividad antagonista contra bacterias patógenas de peces. *Rev Inv Vet Perú*, 30(2) 908-922. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172019000200040&script=sci_arttext
- Fontilene, N., Nunes, D., y Fernández, M. (2014). Trayectoria tecnológica e innovación. <http://www.redalyc.org/pdf/391/39138004001.pdf>. *Rev. Humanidades Médicas*, 6(2). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-81202006000200008
- Forero, N. (2015). Descripción de comunidades microbianas cultivables en las raíces de especies seleccionadas en el estudio de humedales construidos en el páramo Chingaza. T[esis de ingeniera ambiental, Universidad De

Los Andes, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental]. <https://repositorio.uniandes.edu.co/>

Galeano, J. (2011). El uso del suelo en el caso de los humedales. *Verba liuris*, (25), 119-147. <https://revistas.unilibre.edu.co/index.php/verbaiuris/article/view/2188>

García, P. (2017). Acción y control de los vibrios en el ciclo de engorde de los camarones *Litopenaeus vannamei*. [Tesis de Ingeniería Acuícola, Universidad Técnica de Machala]. http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/11350/1/DE00012_EXAMENCOMPLEXIVO.pdf

Gurrola, J. (2016). Caracterización de la calidad de agua en un sistema intensivo de cultivo de camarón blanco *litopenaeus vannamei*, en condiciones de alta salinidad con recambio de agua limitado. [Tesis de Maestro en Ciencias Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, Centro de Investigaciones Biológicas, La Paz, Baja California Sur]. <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/505>

Henao, S. (2015). Indicadores de calidad ambiental de humedales. [Tesis de Ingeniero Ambiental, Universidad Católica de Manizales, Facultad de Ingeniería Y Arquitectura]. <http://repositorio.ucm.edu.co:8080/jspui/bitstream/handle/10839/1136/Santiago%20Hernandez%20Henao.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Hernández, B., Badía, M., y Pérez., M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 42(3) 131-138. <https://biblat.unam.mx/es/revista/revista-cenic-ciencias-biologicas/articulo/potencialidades-del-genero-bacillus-en-la-promocion-del-crecimiento-vegetal-y-el-control-biologico-de-hongos-fitopatogenos>

Hernández, J., y Fernández, L. (2013). Diagnóstico y predicción del hábitat en la camaronicultura. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-55462013000300014&script=sci_abstract

Hernández, M. E. (2010). Suelos de humedales como sumideros de carbono y fuentes de metano. *Terra Latinoamericana*, 28(2) 139-147.

Hernández, P. (2010). Los humedales construidos como sistemas para el tratamiento de agua residual industrial y urbana. Caracterización de las comunidades de bacterias presentes en estos ecosistemas. [Tesis de Medicina General, Universidad de León, Dpto. De Biodiversidad y Gestión Ambiental, Área de Ecología]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=26904>

Ibáñez, J. 2016. Humedales y Suelos Hídricos: Aspectos Básicos y Necesidad de Investigación. <https://www.madrimasd.org/blogs/universo/2016/06/06/147080>

- Instituto Valenciano de Microbiología. (2018). Bacterias productoras de H₂S (reductoras de sulfato, reductoras de sulfito, reductoras de azufre y otras moléculas de azufre) - Cultivo cualitativo y cuantitativo. Identificación molecular (PCR y secuenciación). IVAMI. <https://www.ivami.com/es/microbiologia-de-alimentos/5444-bacterias-productoras-de-h2s-reductoras-de-sulfato-reductoras-de-sulfito-reductoras-de-azufre-y-otras-moleculas-con-azufre-cultivo-cualitativo-y-cuantitativo-e-identificacion-molecular>
- Jarpa, G. (2016). Enriquecimiento de actividad nitrificante en sedimentos marinos mediante sistemas discontinuos. [Universidad de Concepción, facultad de ciencias naturales y oceanográficas. <http://www.eula.cl/giba/wp-content/uploads/2017/09/tesis-mayra-jarpa-2016.pdf>
- Jarpa, M., Aguilar, A., Belmonte, M., Decap, J., Abarzúa, M. y Vidal, Gladys. (2016). Determinación de la capacidad nitrificante de un sedimento marino proveniente de un centro de cultivo de salmones. *Interciencia*, 32(10) 679-685. http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0378-18442007001000008&script=sci_arttext
- Kageyama, A., Morisaki, K., mura, S. O., y Takahashi, Y. (2008). *Arthrobacter oryzae* sp. nov. and *Arthrobacter humicola* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*(58), 53-56. <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijso.64875-0>
- Larios, E. J., Coello, C. R., Sosa, D. Y., y Tejeda, L. C. (2019). Aislamiento e Identificación de bacterias nativas con potencial probiótico en el camarón (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en Honduras, 2018. *Revista Portal de la Ciencia*(16). <https://www.camjol.info/index.php/PC/article/view/8096/7960>
- Lopez, P. C., & Arias, E. T. (2017). *Revisión acerca de la utilización de microorganismos en el mejoramiento de sedimentos en granjas camaroneras*. Universidad de Machala. , Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias. Carrera de Ingeniería Acuícola. Obtenido de <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/10512>
- López, P., y Fuentes, J. (2015). Las bacterias sulfato-reductoras. GEOMINAS. <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/22284/Capitulo2.pdf>
- Lozada, J. P. (2010). Aislamiento y caracterización de bacillus spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. [Tesis de Microbiólogo Agrícola y Veterinario, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad De Ciencias Básicas, Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria , Bogota]. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8434>.
- Mayorga, T. E., Grijalva, C. A., Rodríguez, M. H., & Morales, J. J. (2017). Distribución y abundancia de meiobentos en tres estanques de cultivo de *penaeus vannamei* en camaronera. *La Técnica*(18), 58-69.

- McNeely, J. (2002). La biodiversidad forestal a nivel del ecosistema: ¿cuál es el lugar de la población? Unión Mundial para la Naturaleza (UICN) Gland, SUI. <http://www.fao.org/3/y3582s/y3582s03.htm>.
- Ministerio de Medio Ambiente. (2017). La Segua, una vitrina natural en Manabí. Asociación de Municipalidades Ecuatorianas. Recuperado: <http://ame.gob.ec/ec/2017/07/12/la-Segua-una-vitrina-natural-Manabí/>.
- Muñoz, D. (2012). Identificación de la Bacteria de Genero Vibrio asociadas a zonas productoras de moluscos bivalvos, estado de sucre, Venezuela. Revista Científica, 1-10. <https://www.redalyc.org/pdf/959/95923384010.pdf>.
- Muñoz, J. Y Santana, M. A. (2019). Variabilidad físicoquímica del agua durante el proceso productivo del camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) en una laguna camaronera, sitio el pueblito, Chone. [Tesis de Ingeniero en medio ambiente, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López]. <http://repositorio.espam.edu.ec/xmlui/handle/42000/983>
- Niare, B., Devarajan, N., Poté, J., Y Moritz, R. (2019). Quantification and characterization of mercury resistant bacteria in sediments contaminated by artisanal small-scale gold mining activities, Kedougou region, Senegal. Journal of Geochemical Exploration. Rev. Journal of Geochemical Exploration (205). <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0375674218305806>
- Orberá Ratón, T., Pérez Portuondo, I., Ferrer Salas, D., Cortés Ramos, N., González, y Giro, Z. (2005). Aislamiento de cepas del genero bacillus sp. con potencialidades para la bioprotección y la estimulación del crecimiento vegetal. Revista Cubana de Química, XVII(1) 189-195. <https://www.redalyc.org/pdf/4435/443543685078.pdf>
- Ortega, F., Parra, G., Y Guerrero, F. (2006). Usos del suelo en las cuencas hidrográficas de los humedales del Alto Guadalquivir: Importancia de una adecuada gestión. Limnetica, 25(3) 723-732. <https://www.limnetica.com/es/usos-del-suelo-en-las-cuencas-hidrogr%C3%A1ficas-de-los-humedales-del-alto-guadalquivir-importancia-de>
- Ortiz, M. L., y Carrara, X. C. (2017). Microbiología ambiental en México Diagnóstico, tendencias en investigación y áreas de oportunidad. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pacheco, A. d., Vera, M. N., & Palma, C. R. (2017). Análisis de las condiciones geográficas y ecológicas del humedal La Segua, provincia de Manabí, Ecuador. Revista la Técnica (18) 70-88. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6087654>

- Padilla, C. (2019). Sustancias húmicas como mediadores redox durante la oxidación anaerobia de metano y la reducción de óxido nitroso por la microbiota de un sedimento de un humedal costera. San Luis Potosí: Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
- Padmanaban, V. P., Verma, P., Gopal, D., Sekar, A. K., & Ramalingam, K. (2019). Phylogenetic identification and metabolic potential of bacteria isolated from deep sea sediments of Bay of Bengal and Andaman Sea. *Indian Journal of Experimental Biology*, 57, 561-572. <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/49549>
- Pan, J., Perillo, V., & Cuadrado, D. (2019). Quantification of microbial mat response to physical disruption in siliciclastic sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/96057>
- Paucar, R. Pezo, J. M., & Macías, S. C. (2018). Enfermedades, tratamientos y recomendaciones en el cultivo del camarón. *Espirales*, 2(22). https://redib.org/Record/oai_articulo1949440-enfermedades-tratamientos-y-recomendaciones-en-el-cultivo-del-camar%C3%B3n
- Penna, A., Battocchi, C., Garcés, E., Angles', S., Cucchiari, E., Totti, C. Bastianini, M. (2010). Detection of microalgal resting cysts in European costa sediments using a PCR-based assay. *Deep-Sea Research II*, 288-300. <https://digital.csic.es/handle/10261/21772>.
- Piedrahita, Y. (2018). *La industria de cultivo de camarón en Ecuador, parte 2*. Obtenido de Global Acuaculture Alliance : <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/la-industria-de-cultivo-de-camaron-en-ecuador-parte-2/>
- Pinzón, C. (2017). Métodos profilácticos y terapéuticos para el control de flora y fauna presente en una piscina camaronera. [Tesis de Acuicultura, Universidad Técnica de Machala]. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/10518>
- PROMEGA. (2016). PCR Protocolo. Rev. PROMEGA Corporación, 6-8. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4796903.pdf>
- Quimis, Y. (2005). Análisis microbiológico y caracterización de poblaciones bacterianas en sistemas de engorde de camarón durante un ciclo de cultivo. [Universidad Estatal Península de Santa Elena, Facultad de Ciencias del Mar]. <https://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/828>
- Salazar, A. (2019). Detección de especies patogénicas del género vibrio en langostino blanco (*Litopenaeus vannamei*) de centros de crianza de la región Tumbes, mediante la aplicación de un protocolo de PCR múltiple. [Tesis de Maestro en Sanidad Acuícola , Universidad Peruana Cayetano Heredia]. <http://repositorio.upch.edu.pe/handle/upch/7028>
- Senplades. (2017). Plan Nacional de Desarrollo 2017-2021-Toda una Vida. Quito: Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo. Recuperado:

<https://www.planificacion.gob.ec/plan-nacional-de-desarrollo-2017-2021-toda-una-vida/>

- Serrano, C. y Arevalo, N. (2014). Diagnóstico del sector camaronero en el cantón El Guabo 2013. [Tesis de Acuacultura, Universidad Técnica de Machala]. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/1985><http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/1985>
- Solórzano, T. y Zambrano, E. (2010). Los humedales de la ciénaga la Segua y/o la sabana y su incidencia en el desarrollo socioeconómico de las comunidades en el cantón Chone-San Antonio 2007-2008. [Tesis de Magister en Gerencia de Proyectos Educativos y Sociales, Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí]. <file:///C:/Users/Edison%20V%C3%A9lez/Downloads/ULEAM-POSG-GPES-0013.pdf>
- Sotomayor, M. y Balcázar, J. (2003). Inhibición de vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas prebióticas. *AquaTIC*, (19), 9-15. http://www.revistaaquatic.com/aquatic/pdf/19_2.pdf
- Suárez, M., Medina, Z., Montiel, M., Ibarra, J. y Salcedo, A. (2015). Distribución de *Vibrio sp.* en agua y sedimento de estanques productores de camarón *Litopenaeus vannamei* cultivados con agua del lago de Maracaibo (Venezuela). *Revista Científica*, 25 (4), 293-299. <https://www.redalyc.org/pdf/959/95941173003.pdf>
- Tahim, E. F., Damaceno, M. N., & Junior, I. F. (2014). Trayectoria tecnológica e innovación en la industria del cultivo de camarón en el nordeste de Brasil. *Revista Galega de Economía*, 23(3), 9-32.
- Thompson, F., Lida, T., y Swing, J. (2004). Biodiversity of Vibrios. *Microbiol. Mol. Biol.*, 68 (3). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC515257/>
- Torres, M. (2009). Determinación de la diversidad y actividad bacteriana sulfatorreductora y metanogénica en los sedimentos de dos ecosistemas estuario-lagunares del estado de Chiapas. [Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma Metropolitana]. <http://148.206.53.233/tesiuami/UAMI14761.pdf>
- Torres, M., Fernández, F., Sosa, I., y Vives, F. (2006). Dinámica de las bacterias anaeróbicas en las fases terminales de la mineralización de la materia orgánica en el sedimento de los ecosistemas Carretas-Pereyra y Chantuto-Panzacola. *Rev. Hidrobiológica*, 16(2). http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0188-88972006000200008&lng=es&nrm=iso
- UNESCO (Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura). 2018. Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2018: Soluciones basadas en la naturaleza para la gestión del agua. Recuperado: <http://www.unesco.org/new/es/natural-sciences/environment/water/wwap/wwdr/2018-nature-based-solutions/>

- Van Walt, E. (2019). Draga Van Veen. Obtenido de Van Walt ES Equipos y servicios ambientales. Recuperado: <https://www.vanwalt.com/es/equipo/draga-van-veen/>
- Venegas, Y. (2014). Estudio de las comunidades bacterianas en el sedimento de un humedal empleado en el tratamiento del drenaje de una mina de carbón (Guacheta, cundinamarca). [Tesis de Microbiología Industrial y Ecología, Pontificia Universidad Javeriana]. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/16186>
- Vera, K. (2012). Procedimientos para la sincronización de la producción de camarón (*Litopenaeus vannamei*) en la camaronera Carabay-San Vicente. [Tesis de Ingeniería en Administración Pública y de Empresas Agroindustriales y Agropecuarias, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López]. <http://repositorio.esпам.edu.ec/bitstream/42000/375/1/TAE18.pdf>
- Vienvilay, P., Fernando, B., y Rodriguez, L. (2010). Determinación y cuantificación de bacterias acidolácticas por PCR en tiempo real. Revista MVZ Córdoba, 15 (1) 1897-1906. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69319041002>
- Vivien, R., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Pawlowski, J., Werner, I., y Ferrari, B. (2019). Testing different (e) DNA metabarcoding approaches to assess aquatic oligochaete diversity and the biological quality of sediments. Ecological Indicators, 1 (2041). <https://www.nature.com/articles/s41598-020-58703-2>
- Yang, C., Chen, Y., & Chang, B. V. (2020). Microbial Communities Associated with Acetaminophen Biodegradation from Mangrove Sediment. Sustainability doi:10.3390/su12135410, 12(5410), 1-18. <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:6mcEICEgb4EJ:https://www.mdpi.com/2071-1050/12/13/5410/pdf+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=ec>
- Yoon, J. H., Weiss, N., Kang, K. H., Oh, T.-K., y Park, Y. (2003). *Planococcus maritimus* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat in Korea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53, 2013–2017. https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/67/8/2549_ijsem001960.pdf?expires=1608092515&id=id&accname=guest&checksum=82A24ED60201A18CD6552B46F360A39B
- Yuan, K., Wang, X., Chen, X., Zhao, Z., Fang, L., Chen, B., Jiang, J., Luan, T. & Chen, B. (2019). Occurrence of antibiotic resistance genes in extracellular and intracellular DNA from sediments collected from two types of aquaculture farms. Chemosphere, 520-527. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31229713/>
- Zambrano, A., Herrera, N., Trueba, G., Sierra, R., León, A., y Ochoa, V. (2019). Construcción y operación de una cámara anaeróbica de bajo costo para la

siembra y el cultivo de bacterias sulfato reductoras. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 11 (2), 44-59.
<https://revistas.usfq.edu.ec/index.php/avances/article/view/1303>

Zapata, G. (2011). *Aplicación de Método de Diagnóstico e Identificación Molecular*. [Tesis de Ingeniería en Biotecnología, Escuela Politécnica del Ejército]. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/4975/1/T-ESPE-033011.pdf>

Zhao, Z., Jiang, J., Pan, Y., Dong, Y., Chen, Z., Zhang, G., Gao, S., Sun, H., Guan, X., Wang, B., Xiao, Y. & Zhou, Z. (2020). Temporal dynamics of bacterial communities in the water and sediments of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) culture ponds. *Aquaculture*, 528. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848620307924?dgcid=rss_sd_all

ANEXOS

Anexo 1

ENTREVISTA APLICADA AL PROPIETARIO DE LAS CAMARONERAS DEL HUMEDAL LA SEGUA



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ “MANUEL
FÉLIX LÓPEZ”**

ENTREVISTA DIRIGIDA AL PROPIETARIO (A) DE LAS CAMARONERAS DEL HUMEDAL LA SEGUA

AUTOR: Ider Josué Zambrano Cedeño

OBJETIVO: *El objetivo de la presente encuesta es conocer el criterio del propietario de la camaronera acerca de la situación actual en El Humedal.*

Nombre del Entrevistado	Paulina Teresa Bermeo
Nombre de la Camaronera	La Yolanda
Ubicación	La Segua
Su camaronera es	Propia
¿Cuál es el número de laguna que cuenta su camaronera?	1 laguna
¿Qué medida sugiere Usted que se debería tomar para mejorar la economía del sector camaronero?	Asesoría Técnica
¿Conoce usted disposiciones, leyes o reglamentos Gubernamentales que promuevan el desarrollo del sector camaronero?	No Cumplen con las leyes
¿Tiene usted con un técnico para manejar su camaronera?	No
¿Qué tipo de cultivo realiza en su camaronera?	Semiintensivo
¿Con qué frecuencia actualmente siembra su laguna?	Tres veces al año

¿Cuál es la dimensión de su camaronera?	Una profundidad de 6m, Largo 30m y Ancho 15m
¿De cuántas hectáreas es su camaronera?	2 ha
Considera usted ¿tiene las medidas adecuadas de sus camaroneras para la capacidad de su producción?	Si
¿Qué cantidad de larva tiene de su siembra?	1 ha 50.0000 animales.
¿Cuál es el tamaño del camarón para la cosecha?	9-12 gr
¿Cuál es el tiempo del proceso de crecimiento del camarón; y en qué tiempo cosecha?	90-120 días
¿Cuál es el tipo de camarón que usted produce en su propiedad?	<i>Litopenaeus vanname</i>
Podría explicarnos brevemente el proceso que se realiza para llevar a cabo su producción	Preparación de las laguna, llenado, introducción y cultivo de larvas, Cultivo, Cosecha
Dentro del proceso de producción de las larvas de camarón en qué momento se puede observar si estas tienen algún tipo de enfermedad o de mal formación.	Durante el monitoreo, presencia de las aves en los comederos por mortalidad
Al momento de la siembra, ¿qué variables son favorable?	Temperatura, pH, calidad de agua y que la laguna estén totalmente sana.
¿Cómo realiza usted el control y monitoreo del comportamiento del camarón a lo largo del proceso de producción?	Semanal
¿Qué tipo de Alimento utiliza?	Skretting, purina, nicovita
¿Cuál es la forma de la alimentación?	Por boleo
¿Utiliza alguna fórmula en su alimentación?	No
¿Qué insumos utiliza usted en su camaronera?	Fertilizantes, Desinfectantes, Alimentación suplementaria
¿Cada qué tiempo fertiliza sus camaroneras?	Cada 2 semanas y después de la cosecha

¿Existe algún tipo de fumigación alrededor de su camaronera?	No
¿Cree usted que la materia orgánica sería una de las principales causa de mortalidad del camarón?	Si
¿Cuál sería la principal causa de la acumulación de materia orgánica?	Alimentación
¿Conoce una medida para disminuir la materia orgánica	No
¿Qué método usa para retirar el sedimento de su camaronera?	Maquinaria y Manual con pala
¿A qué porcentaje de acumulación de fondo le hace mantenimiento?	30cm
¿Cada que tiempo usted hace la respectiva remoción del sedimento?	Cada 2 meses
¿Dónde deposita el sedimento extraído?	En un muro
¿De dónde obtiene el agua para mantener su camaronera?	Del Humedal
¿Cuál es el pH idóneo del agua de la camaronera?	Rango de 7.5 – 8
¿Cada que tiempo cambia de agua en su camaronera?	Cuando se termina cada cosecha
¿Usted tiene conocimiento sobre alguna bacteria se pueda utilizar para degradar la materia orgánica?	Si
¿Considera usted que se está aprovechando en su totalidad, o cree que hay la posibilidad de aprovechar aún más los recursos en su propiedad, para lograr una producción óptima?	No

Anexo 2. Cronología fotográfica



Foto 1 Delimitación de la zona de muestreo.



Foto 2 Utilización de la Draga Van Veen.



Foto 3 Georreferenciación.



Foto 4 Muestra de Sedimento.



Foto 5 Preparación en placas.

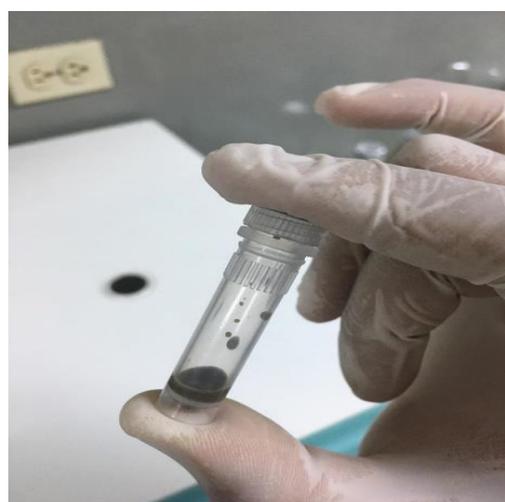


Foto 6 Dilución de la muestra.



Foto 7 Adición de reactivos.



Foto 8 Muestra preparadas.

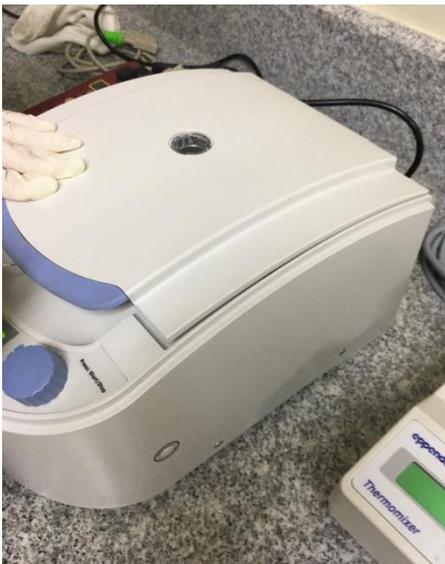


Foto 9 Termociclador.



Foto 10 Colonias aisladas.

Anexo 4.

Análisis de secuencias

1DX_Bacillus_aryabhatai

GCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGA
 GTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTCATGGGAGATGATTG
 AAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGAC
 CTGAGAGGGTGATCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCT
 GACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAGTACGAGAGTAAGTCTGCTGACCTT
 GACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAA
 GCGCGCGCAGGCGGTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGA
 AAAGCGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAG
 GCGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTCTAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTTA
 GTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGGTGCAGAACTGAACTCAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTGG
 AGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTAGAGATAGAGCGTTCCCTTCGGGGGACA
 GAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGATCTTAGTTGCCAGC
 ATTTAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGCCGTTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA
 CACGTGCTACAATGGATGGTCAAAGGGCTGCAAGACCGGAGGTCAAGCCAATCCATAAAACCTTCTCAGTTCGGATTGAGGCTGCAACT
 CGCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAANTACGTTCCCGGCGCTGTACACACCGCCCGTACACCA
 GAGAGTTTGAACACCCGAAGTCGGTGGAGTAANCGTAAGGAGCTAGCCGCTAAGTGGGA

2DX_Bacillus_aryabhatai

GGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTG
 AGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTCATGGGAGATGATT
 GAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGA
 CCTGAGAGGGTGATCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGT
 TGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAGTACGAGAGTAAGTCTGCTGACCTT
 GACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAA
 GCGCGCGCAGGCGGTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGA
 AAAGCGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAG
 GCGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTCTAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTTA
 GTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGGTGCAGAACTGAACTCAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTGG
 AGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTAGAGATAGAGCGTTCCCTTCGGGGACA
 GAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGATCTTAGTTGCCAGC
 ATTTAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGCCGTTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA
 CACGTGCTACAATGGATGGTCAAAGGGCTGCAAGACCGGAGGTCAAGCCAATCCATAAAACCTTCTCAGTTCGGATTGAGGCTGCAACT
 CGCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAANTACGTTCCCGGCGCTGTACACACCGCCCGTACACCA
 GAGAGTTTGAACACCCGAAGTCGGTGGAGTAACCGTAAGGAGCTAGCCGCTAAGTGGGACAGATGATT

3DX_Bacillus_megaterium

TCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGG
 GTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTCATGGGAGATG
 ATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGC
 CGACTGAGAGGGTGATCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAA
 AGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTCGGTGCCTAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAGTACAAGAGTAAGTCTGTTG
 ACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGG
 GTAAGCGCGCAGGCGGTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAA
 GAGAAAGCGGAATTCACGCTGATGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTTTTGGTCTGTAAGTACGC
 TGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTCTAAGTGTAGAGGGTTCCGCC
 TTTAGTCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGGTGCAGAACTGAACTCAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGG
 GTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGTCTGACATCCTCTGACAACCTAGAGATAGAGCGTTCCCTTCGGGG
 GACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGATCTTAGTTGC
 CAGCATTAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGCCGTTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG
 TACACAGCTGCTACAATGGATGGTCAAAGGGCTGCAAGACCGGAGGTCAAGCCAATCCATAAAACCTTCTCAGTTCGGATTGAGGCTGC
 AACTCGCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAANTACGTTCCCGGCGCTGTACACACCGCCCGTACAC
 ACGAGAGTTTGAACACCCGAAGTCGGTGGAGTAACCGTAAGGAGCTAGCCGCTAAGTGGGACAGAT

4DX_Bacillus_altitudinis

GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGA
 GTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG
 AAAGACGGTTTCGGCTGCTACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGA
 CCTGAGAGGGTGATCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGT
 TGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTGTTGTTAGGGAAGAACAGTGAAGAGTAAGTCTGCTGACCTT
 GACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAA
 GGGCTCGCAGGCGGTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCAATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGG
 AGAGTGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTGCTGTAAGTACGCTGAG

GAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTA
 GTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCCGAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGG
 AGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCAAGAACCTTACCAGGCTTGGATCTCTGCAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGA
 GTGACAGGTGGTGCATGTTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATT
 CAGTTGGGCACCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGTACACAC
 GTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGTGCAGACCGCAAGGTTAGCCAATCCCAACAATCTGTTCTCAGTTCCGATCGCAGTCTGCAACTCGA
 CTGCGTGAAGTGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGA
 GTTTGCAACACCCGAAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCCGCAAGGTGGGGCAGA

>5DX_Bacillus_altitudinis

GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGTCCCGATGTTAGCGGGGACGGGTGAG
 TAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGTTCAAGGATGA
 AAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGGCGACGATGCGTAGCCGAC
 CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCT
 GACGGAGCAACGCCGCTGAGTGTGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAGTGAAGAGTAAGTCTTGCACCTT
 GACGGTACCTAACCGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTTGGCGTAA
 GGGCTCGCAGCGGTTTCTAAGTCTGATGTAAAGCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGAAACTGGGAACTGAGTGACAAGAGG
 AGAGTGAATCCACGTGTAGCGGTAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAG
 GAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTA
 GTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCCGAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGG
 AGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCAAGAACCTTACCAGGCTTGGATCTCTGCAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGA
 GTGACAGGTGGTGCATGTTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATT
 CAGTTGGGCACCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGTACACAC
 GTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGTGCAGACCGCAAGGTTAGCCAATCCCAACAATCTGTTCTCAGTTCCGATCGCAGTCTGCAACTCGA
 CTGCGTGAAGTGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGNGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGA
 GTTTGCAACACCCGAAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCCGCAAGGT

>61TS_Bacillus_marisflavi

GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGATCGATGGGAGCTTGTCCCTGAGATCAGCGGGGACGGGTGA
 GTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACCTACCCCGCATGGGGGAAAGT
 GAAAGGTGGCTTCGGCTATCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAGGCGACGATGCGTAGCCG
 ACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAG
 TCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAGTCCGCTTCGAATAGGGCGCG
 CCTTGACGGTACCTAACCGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTAAGGCGT
 AAGCGCGCAGGTGGTTTCTAAGTCTGATGTAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAACTGGGAACTGAGTGACAGAAGA
 GGAAGTGAATCCAAGTGTAGCGGTAAATGCGTAGATATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTG
 AGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGTTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTT
 TAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCCGAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGT
 GGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGCAAGAACCTTACCAGGCTTGGATCCTCTGACAACCTTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGG
 ACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCC
 AGCATTAGTTGGGCACTAAGATGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT
 ACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCAGGTTTAGCCAATCCCAAAAACCGTTCTCAGTTCCGATTGATGGCTGCA
 ACTCGCTACATGAAGTGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTACACCA
 CGAGAGTTTGAACACCCGAAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCCGCTAAGGTG

>62TS_Bacillus_marisflavi

GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGATCGATGGGAGCTTGTCCCTGAGATCAGCGGGGACGGGTGA
 GTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACCTACCCCGCATGGGGGAAAGT
 GAAAGGTGGCTTCGGCTATCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAGGCGACGATGCGTAGCCG
 ACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAG
 TCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAGTCCGCTTCGAATAGGGCGCG
 CCTTGACGGTACCTAACCGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTAAGGCGTAA
 GCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAAGTCTGATGTAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAACTGGGAACTGAGTGACAGAA
 GAGGAAAGTGAATCCAAGTGTAGCGGTAAATGCGTAGATATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTG
 TGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGTTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCC
 TTTAGTCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCCGAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCG
 GTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGCAAGAACCTTACCAGGCTTGGATCCTCTGACAACCTTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGG
 GACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGC
 CAGCATTAGTTGGGCACTAAGATGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT
 TACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCAGGTTTAGCCAATCCCAAAAACCGTTCTCAGTTCCGATTGATGGCTGC
 AACTCGCTACATGAAGTGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTACACCA
 ACGAGAGTTTGAACACCCGAAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCCGCTAAGGTG

>7TS_Bacillus_aryabhatai

GCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAAGTATTAGAAGCTTGTCTTATGACGTTAGCGGGGACGGGTGA
 GTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCTTATGGGAGATGATTG
 AAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACCGCTCACCAGGCAACGATGCATAGCCGAC
 CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCT
 GACGGAGCAACGCCGCTGAGTGTGAAGGTTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAGTACGAGAGTAAGTCTGCTGATCTT

GACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTTGGGCGTAA
 GCGCGCGCAGGCGGTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTTCATTGGAACCTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGA
 AAAGCGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTGGTCTGTAAGTGCAGCGTGA
 GCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGTAAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTA
 GTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGG
 AGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCTTGTGACATCCTCTGACAACCTTAGAGATAGAGCGTTCCCTTCGGGGGACA
 GAGTGACAGGTGTCATGGTTGTCGTACGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGC
 ATTTAGTTGGGCACTAAAGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGTACAC
 CACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATAAACCAATTCAGTTCGGATTGATAGGCTGCAACT
 CGCTACATGAAGCTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGNGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTACACCACG
 AGAGTTTGAACCCGAAGTCGGTGAGTAACCGTAAGGAGCTAGCCG

>8TS_Bacillus_altitudinis

GCTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGATGTTAGCGCGGACGGGTGAG
 TAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGA
 AAGACGGTTTCCGGTGTCACTTACAGATGGACCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGAC
 CTGAGAGGGTGATCGGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCT
 GACGGAGCAACCGCGTGAGTGTGAAGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGACAAGTGAAGAGTAACTGCTTGCACCTT
 GACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTTGGGCGTAA
 GGGCTCGCAGGCGGTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTTCATTGGAACCTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGG
 AGAGTGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTGGTCTGTAAGTGCAGCTGAG
 GAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTA
 GTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGG
 AGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCTTGTGACATCCTCTGACAACCTTAGAGATAGGCGTTCCCTTCGGGGGACA
 GTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATT
 CAGTTGGGCACTAAAGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGTACACAC
 GTGCTACAATGGACAGAAACAAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCAACAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGA
 CTGCGTGAAGCTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGA
 GTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGAGGCCAGCCCGGAAGGTGGGGCAGATG

>9TS_acillus_altitudinis

GGCTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGATGTTAGCGCGGACGGGTGA
 GTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG
 AAAGACGGTTTCCGGTGTCACTTACAGATGGACCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGA
 CCTGAGAGGGTGATCGGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTC
 TGACGGAGCAACCGCGTGAGTGTGAAGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGAAGAGTAACTGCTTGCACCTT
 GACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTTGGGCGTAA
 GGGCTCGCAGGCGGTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTTCATTGGAACCTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGG
 AGAGTGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTGGTCTGTAAGTGCAGCTGAG
 GAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTA
 GTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGG
 AGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCTTGTGACATCCTCTGACAACCTTAGAGATAGGCGTTCCCTTCGGGGGACA
 GTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATT
 CAGTTGGGCACTAAAGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGTACACAC
 GTGCTACAATGGACAGAAACAAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCAACAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGA
 CTGCGTGAAGCTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGA
 GTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGAGGCCAGCCCGGAAGGTGGGGCAGATGAT

>10TS_Bacillus_altitudinis

GGCTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGATGTTAGCGCGGACGGGTGA
 GTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG
 AAAGACGGTTTCCGGTGTCACTTACAGATGGACCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGA
 CCTGAGAGGGTGATCGGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTC
 TGACGGAGCAACCGCGTGAGTGTGAAGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGAAGAGTAACTGCTTGCACCTT
 GACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTTGGGCGTAA
 GGGCTCGCAGGCGGTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTTCATTGGAACCTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGG
 AGAGTGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTGGTCTGTAAGTGCAGCTGAG
 GAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTA
 GTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGG
 AGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCTTGTGACATCCTCTGACAACCTTAGAGATAGGCGTTCCCTTCGGGGGACA
 GTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATT
 CAGTTGGGCACTAAAGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGTACACAC
 GTGCTACAATGGACAGAAACAAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCAACAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGA
 CTGCGTGAAGCTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGA
 GTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGAGGCCAGCCCGGAAGGTGGGGCAGATGATTGGG

>11TS_Exiguobacterium_aquaticum

GGCTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCTAATACATGCAAGTCGAGCGCAGGAAATCGACGGAACCCCTTCGGGGGAAAGTGCAGGAAATGAG
 CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAAGAACCCTGCCCTCAGGCTGGGATAACCACGAGAAATCGGGGCTAATACCGGATGGTTCATCGGACCG

CATGGTCCGAGGATGAAAGGCCTTCGGCGTCGCTGGGGATGGCTTTCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCCACCAAGGCGAC
 GATGCATAGCCGACTGAGAGGGTATCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGACAGCAGTAGGGAATCTCCACA
 ATGGACAAAGCTGTAGGACCAACGCCGCTGAACGATGAAGCCCTTCGGTTCGTAAGTTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTCCCGCAGGC
 AATGGCGGCACCTTGCAGCGTTCGAGAAAGCCAGCGCTAAGTACGTTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTTGGCAAGCCTTTCGGGA
 ATTATTGGGCGTAAGCGCGCAGGCGCCTCTAAGTCTGATGTAAAGCCCGGCTCAACCGGGGAGGGCCATTGGAACTGGGAGGCTT
 GAGTATAGGAGAGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTTGGCCT
 ATAAGTACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTGTAGTCCACGCGGTAACAGATGAGTGTAGGTTGGAG
 GGTTTCGCCCTTCAGTGTGAAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGGCTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGACC
 CGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGTTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAACTCTTGACATCCCCCTGACCGGTACAGAGATGACCTTC
 CCCTTCGGGGGAGGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTGT
 CCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTA
 TGAGTTGGGCTACACACGTCTCAATGGACGCTACAAAGGCGAGCGAAGCCGCGAGGTTGAGCCAATCCCAGAAAGCCGTTCTCAGTTCGGA
 TTGACGGTGCAACTCGCTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCC
 CCGTACACACGAGAGTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAAGTAACTTAGGGAGCCAGCCGCGAAGGTGGGACAGATGATTGGG

>12TS_Acinetobacter_lwoffii

CTCAGATTGAACGCTGGCGGAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGGAAAGAGTAGCTTACTTAACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAT
 GCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAAGGGATGCTAATACCGCATACTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGC
 CTTGCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGTTCTGAGAGGATGAT
 CCGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGACAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGAAACCTGATCCAGCCATGC
 CGCGTGTGTAAGAAGGCTTTGGTTGTAAGCACTTTAAGCAGAGGAGGACTACCGAGATTAATACTCTGGATAGTGACCTTACTCGCA
 GAATAAGCAACCGCTACTGTGCCAGCAGCGGTAATACAGAGGTTGCCAGCGTTAATCGGATTACTGGCGTAAGCGCGTACTGCTGAG
 CCAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTTAACCTGGGAATTGCATTGATACTGGTGGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGAATTCCAG
 GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGCGAAGGCGAGCCATCTGGCTAATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCATGG
 GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACAGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCTTTGAGGCTTATAGTGGCGCAGTAAACG
 GATAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATT
 CGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGTCTTGACATAGTAAGAACCCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTACATACAGGTGCTGCAT
 GGCTGTCGTAGCTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTTCTTATTTGCCAGCGGGTTAAGCCGGAACTTT
 AAGGATACTGCCAGTGAACAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAGTCAATCATATGCCCTTACGACCAGGGGTACACACGTGCTACAATGGT
 CGGTACAAAGGGTTGCTACCTCGCGAGAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCG
 GAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTTGTGCACCA
 GAAGTAGGTAGTAACTTAGGGGGGACGCTTACCACGGTGTGGCAGATGACTGG

>13TS_Acinetobacter_lwoffii

GGCTCAGATTGAACGCTGGCGGAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGGGAAAAGTAGCTTACTTAACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTA
 ATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAAGGGATGCTAATACCGCATACTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGG
 GCCTTGCCTAATAGATGAGCCTAAGTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGTTCTGAGAGGATG
 ATCCGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGACAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGAAACCTGATCCAGCCAT
 GCCGCTGTGTGAAGAAGGCTTTTGGTTGTAAGCACTTTAAGCAGAGGAGGAGGCTACCGAGATTAATACTCTGGATAGTGACCTTACTCG
 CAGAATAAGCACCGGCTAAGTCTGTGCCAGCAGCGGTAATACAGAGGTTGAAGCGTTAATCGGATTACTGGCGTAAGCGCGCTAGG
 TGGCAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTTAACCTGGGAATTGCATTGATACTGGTGGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGAATTC
 CAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGCGAAGGCGAGCCATCTGGCTAATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCAT
 GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACAGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCTTTGAGGCTTATAGTGGCGCAGTAAACG
 GCGATAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAT
 TTCATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGTCTTGACATAGTAAGAACCCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTACATACAGGTGCTGC
 ATGGCTGTCGTAGCTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTTCTTATTTGCCAGCGGGTTAAGCCGGAACT
 TTAAGGATACTGCCAGTGAACAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAGTCAATCATATGCCCTTACGACCAGGGGTACACACGTGCTACAATG
 GTCGGTACAAAGGGTTGCTACCTCGCGAGAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGT
 CGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTTGTGCAC
 CAGAAGTAGGTAGTAACTTAGGGGGGACGCTTACCACGGTGTGGCAGATGACTGG

>14TS91_Arthrobacter_oryzae

GCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCAGCTTGGTGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACA
 CGTGAGTAACCTGCCCTAACTCTGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATATGACTCCTCATCGCATGGTGGGGGTGAAAGCT
 TTTTGTGGTTTTGGATGACTCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGGAC
 CGGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGACAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGACGCGACG
 CCGGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGTAGAGGAAGAAGCGTAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGCTAACT
 ACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTTGTCGCTGCTGCCGT
 GAAAGTCCGGGGCTAACTCCGATCTCGGTGGGTACGGGCACTAGAGTGTAGGGGAGACTGGAATCTGGTGTAGCGGTGAAAT
 GCGCAGATATCAGGAGGAACCCGATGGCGAAGGCAAGTCTCTGGGCATTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGAGCGCAACAGGATT
 AGATACCTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGACATTCACGTTTTCCGCGCGTAGTAAACGATTAAGTGCCTCCG
 CTGGGAGTACGGCCCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGAGCATCCGGATTAATTCATGCAACGCGA
 AGAACCTTACCAAGGCTGACATGGACCGGACCGGGCTGAAACAGTCTTCCCTTTGGGGCTGGTTCCAGAGTGGTGCATGGTTGTCGTGAG
 CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTGTTCTATGTTGCCAGCAGTGTGGTGGGACTCATAGGAGACTGC
 CGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATATGCCCTTATGTTGGGCTTACGATGCTACAATGGCCGGTACAAAGG
 GTTGCAGTACTGTAGGTGGAGCTAATCCAAAAAGCCGCTCAGTTGCGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCATGAAGTCGGAGTTCGCTAGT
 AATCGCAGATCAGCAACGCTCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTACAGAAAGTTGTAACACCCGAAGCCGGT
 GCCTAACCCCTTGGGGAGGGAGCTGTCGAAAGTGG

>14TS92_Planococcus_plakortidis

GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTAATACATGCAAGTCGAGCGGAACCATTGGAGCTTGCTCCTTTGGTTTAGCGGCGGACGGGTGAGT
AACACGTGGGCAACCTGCCCTGCAGATCGGGATAACTCCGGGAAACCGGTGCTAATACCGAATAGTTTTCGGCCTCTCATGAGGCTGCACGGAA
AGACGGTTTCGGCTGTCACTGCAGGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGGGTAACGGCCCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACC
TGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCT
GACGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTGAGGGAAGAACAAGTACCAAGTAACTACTGGTACCTTG
ACGGTACCTCACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAACTACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGGAATTATTGGGCGTAAA
GCGCGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTTGATGTGAAAAGCCACGGCTTCAACCGTGGAGGGTTCATCTGGAACCTGGGGGACTTGAGTGCAGAA
GAGGAAAGTGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGANGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACG
CTGAGGCGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCGGCC
CCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGC
GGTGGAGCATGTGTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCCGCTGACCGCCTTGAGACAAGGCTTCCCTTCGG
GGACAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTT
GCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGG
GCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGTCGCNAACCCGCGAGGGGGAGCCAATCCAGAAAAACCGTTCAGTTTCGGATTGCAGGC
TGCAACTCGCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGNCTTGACACACCGCCGTC
CACCACGAGAGTTGTAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTATGGGAGCCAGCCGCC