

Removal of nitrogen compounds in ornamental aquaculture effluents using *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. Bacteria

Blas-Cadillo, Silvia Rocío.¹, Diaz-Crespo, Mariana Alexandra.², and Ruiz-Huaman, Carmen Milagros.³

^{1,2,3} Environmental Engineering Program, Faculty of Engineering, Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, PE, u202011310@upc.edu.pe, u202018220@upc.edu.pe, pcicrui@upc.edu.pe

Abstract– High concentrations of inorganic nitrogen in aquaculture effluents pose a toxic risk to fish production and the environment. In this context, aerobic nitrifying and denitrifying bacteria play a key role. This study evaluated the ability of *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp., isolated from effluents, to reduce ammonium nitrogen, nitrite, and nitrate in wastewater from an ornamental fish farm (Lima, Peru). Four biological treatments were implemented (control, T1: *Pseudomonas* sp., T2: *Bacillus* sp., T3: consortium) in aerobic reactors to promote simultaneous nitrification and denitrification processes. The reactors were inoculated with a bacterial concentration of 1.5×10^7 CFU/ml. During the experiment, nitrogen compounds exceeded optimal levels in the control. In contrast, the bacterial consortium (T3) showed the highest effectiveness, removing nearly 100% of ammonium nitrogen (1.00 ± 0.22 mg/L), nitrite (0.066 ± 0.048 mg/L), and nitrate (16.67 ± 8.17 mg/L) within 96 and 168 hours, respectively. Additionally, T3 maintained stable physicochemical conditions (20°C – 23°C , pH 7.47–7.72, DO > 5 mg/L), optimizing its degradative capacity. The results confirm that the consortium of *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. is effective in removing inorganic nitrogen, standing out as a potential biotechnology for treating and reusing wastewater in ornamental aquaculture.

Keywords– ornamental aquaculture, wastewater, nitrogen compounds, bacterial remediation

Remoción de compuestos nitrogenados en efluentes acuícolas ornamentales con bacterias *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp.

Blas-Cadillo, Silvia Rocío.¹, Diaz-Crespo, Mariana Alexandra.², and Ruiz-Huaman, Carmen Milagros.³

^{1,2,3} Carrera de Ingeniería Ambiental, Facultad de Ingeniería, Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, Perú, u202011310@upc.edu.pe, u202018220@upc.edu.pe, pcicrui@upc.edu.pe

Resumen– Las altas concentraciones de nitrógeno inorgánico en efluentes acuícolas representan un riesgo tóxico tanto para la producción pesquera como para el medio ambiente. En este contexto, las bacterias nitrificantes y desnitrificantes aeróbicas desempeñan un papel clave. Este estudio evaluó la capacidad de *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp., aisladas de efluentes, para reducir nitrógeno amoniacal, nitrito y nitrato en aguas residuales de un criadero de peces ornamentales (Lima, Perú). Se implementaron cuatro tratamientos biológicos (control, T1: *Pseudomonas* sp., T2: *Bacillus* sp., T3: consorcio) en reactores aeróbicos para propiciar procesos simultáneos de nitrificación y desnitrificación. Los reactores fueron inoculados con una concentración bacteriana de 1.5×10^7 UFC/ml. Durante los 7 días experimentales, los compuestos nitrogenados excedieron los valores óptimos en el control. En contraste, el consorcio bacteriano (T3) mostró la mayor eficacia, removiendo casi el 100% de nitrógeno amoniacal (1.00 ± 0.21 mg/L), nitrito (0.066 ± 0.048 mg/L) y nitrato (16.67 ± 8.17 mg/L) en 96 y 168 horas, respectivamente. Además, T3 mantuvo estabilidad en las condiciones fisicoquímicas (20°C – 23°C , pH 7.47–7.72, OD > 5 mg/L), optimizando su capacidad degradadora. Los resultados confirman que el consorcio de *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. es eficaz para la eliminación de compuestos nitrogenados, destacándose como una biotecnología potencial para el tratamiento y reutilización de aguas residuales en acuicultura ornamental.

Palabras clave– acuicultura ornamental, aguas residuales, compuestos nitrogenados, remediación bacteriana

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la acuicultura mundial ha experimentado un crecimiento notable, lo que ha incrementado los ingresos de este sector. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), en 2020, la producción acuícola mundial alcanzó los 115,9 millones de toneladas y en 2022, la producción registró un récord de 183 millones de toneladas [1], [2]. Dentro de este mercado, la industria de peces ornamentales también ha ganado relevancia, con más de 2,000 millones de peces vivos transportados anualmente desde más de 50 países exportadores, principalmente del Sudeste Asiático y América del Sur [3], [4]. Esta industria se ha convertido en un negocio multimillonario con una valoración aproximada de 56,000 millones de dólares, involucrando a más de 115 países, entre importadores y exportadores [5], [6].

En el comercio de peces ornamentales, Perú es uno de los principales exportadores, con exportaciones por un valor de 39,422,030 dólares entre 2008 y 2018 [6]. En América Latina y el Caribe, Perú se posiciona como el tercer país en exportación

de peces ornamentales, representando el 13.3% de la participación regional, y ocupando el puesto 22 a nivel global, lo que evidencia la creciente demanda de especies acuáticas [7]. La región Loreto lidera la producción en el país y La Libertad en la costa. Esta situación resalta la importancia del sector en la economía nacional, lo que a su vez plantea la necesidad de abordar la sostenibilidad de la industria para garantizar su desarrollo a largo plazo. Asimismo, contribuir al cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), específicamente (i) ODS 6: Agua limpia y saneamiento, y (ii) ODS 12: Producción y consumo responsables.

No obstante, este crecimiento ha planteado serias preocupaciones sobre el manejo de las aguas residuales generadas, las cuales son vertidas sin tratamiento o pobremente tratadas en sistemas hídricos cercanos [8].

Se estima que los océanos reciben 6.2 millones de toneladas de nitrógeno anualmente debido a la liberación de aguas residuales, lo que contribuye a la eutrofización y a la alteración de los ecosistemas acuáticos [9]. En particular, la acuicultura podría ser responsable de más de 2.8 millones de toneladas anuales de desechos nitrogenados [10]. Los efluentes acuícolas contienen altas concentraciones de nitrógeno en formas como nitrógeno amoniacal, nitrito y nitrato, que provienen de la excreción de los peces y del 75% de los alimentos no consumidos [11]. Estos compuestos representan un riesgo significativo para la vida en el agua, ya que el nitrógeno amoniacal y el nitrito, incluso en bajas concentraciones, pueden ser muy tóxicos para los organismos acuáticos; por ejemplo, el amoníaco genera convulsiones y muerte en cultivos acuícolas [12], y el amonio a 0.425 mg/l altera sus funciones [13], [14], [15]. La descarga de efluentes de acuicultura pobremente tratados y con niveles altos de nitrato contamina sistemas de agua potable, amenazando la salud pública [16]. Los lactantes son más susceptibles a desarrollar metahemoglobinemia conocida como “Síndrome del bebé azul”, provocando taquicardia, cianosis y asfixia; y, en los adultos se incrementa el riesgo de padecer cáncer [17].

La biorremediación se presenta como una estrategia eficaz para reducir la contaminación orgánica e inorgánica en cuerpos de agua contaminados mediante la aplicación de microorganismos vivos [12], [18]. En específico, la bioaumentación es un proceso en el que se adicionan bacterias cultivadas al agua para acelerar la degradación de contaminantes, como el nitrógeno, a través de procesos de nitrificación y desnitrificación [19], [20], [21]. En estudios recientes, las bacterias heterótrofas nitrificantes y aeróbicas

desnitrificantes (HNDA) han mostrado gran potencial debido a su capacidad para reducir el nitrógeno de manera eficiente en condiciones aeróbicas y procesos simultáneos de nitrificación y desnitrificación [15], [22], [23]. Estas bacterias, como los géneros de *Pseudomonas* sp y *Bacillus* sp, presentaron altas tasas de remoción de nitrógeno inorgánico, alcanzando hasta un 98% de eliminación de estos compuestos en pocos días [12], [18], [24]. Los procesos biológicos ejecutados por estas bacterias, en comparación con los humedales o la fitorremediación, presentan tasas de remoción entre 70% y 90% [25], [26], [27], [28].

Ambos géneros de bacterias son compatibles para trabajar en consorcio e impulsan la eliminación de compuestos nitrogenados de los efluentes acuícolas con tasas de eficiencia superiores al 84% en un plazo de 5 días [12], [14]. Las condiciones ideales para maximizar su capacidad degradadora se mantiene en OD > 5mg/L, pH de 7,5-8,5 y a 25-30°C [15]. Estas bacterias tienen potencial para el tratamiento de aguas residuales de acuicultura con recirculación tanto para alargar la vida útil del agua y evitar la muerte de los peces por contaminación [23], [29], [30].

En Perú, el control de los efluentes acuícolas aún presenta desafíos complejos. Aunque los Estándares de Calidad del Agua y Valores Máximos Permisibles del país regulan parámetros clave como el amoníaco y los nitratos en las aguas receptoras de efluentes acuícolas y/o vertidas al alcantarillado, la implementación de tecnologías de tratamiento eficientes sigue siendo una necesidad crítica para proteger los ecosistemas acuáticos y la salud pública [31]. Sumado a ello, es importante controlar el nitrógeno inorgánico desde la fuente, por lo que, se considera investigaciones referentes para los valores óptimos del agua destinados al reúso en la crianza de peces [32], [33]. La acuicultura ornamental, en particular, sigue en expansión en el departamento de Lima, y su manejo adecuado es crucial para evitar impactos negativos como la muerte de especies y problemas de insalubridad [34].

Es así que, este estudio tuvo como objetivo evaluar la eficacia de remoción de compuestos nitrogenados inorgánicos en efluentes de peces ornamentales mediante el uso de bacterias nativas, *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. Asimismo, se analizaron los tiempos requeridos para la eliminación del nitrógeno inorgánico y las variaciones en los parámetros fisicoquímicos del agua, como el pH, la temperatura y el oxígeno disuelto, durante la aplicación de los diferentes tratamientos biológicos.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Muestreo

El agua residual fue recolectada de un criadero de peces ornamentales ubicado en Chorrillos, Lima-Perú (12°11'39"S 77°00'47"W). Se obtuvieron 96 litros de agua residual provenientes de un cultivo de peces Guppy. La toma de muestra se realizó siguiendo los lineamientos establecidos en la Norma Técnica Peruana NTP 214.060:2016, aplicable a aguas residuales no domésticas. Las muestras se transportaron en

recipientes plásticos, adecuadamente esterilizados, al laboratorio de Agua y Energías Renovables de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (Lima, Perú) para su posterior análisis.

B. Aislamiento bacteriano y preservación

Para el aislamiento del género bacteriano *Pseudomonas* sp., se utilizó el medio selectivo agar Cetrimida. Se prepararon 9.34 g de medio en 200 ml de agua destilada dentro de un frasco de 500 ml. La mezcla fue agitada durante 1 minuto para asegurar su completa disolución y posteriormente esterilizada en autoclave a 121°C durante 15 minutos. El medio esterilizado se vertió en placas Petri estériles y se dejó solidificar. Para el aislamiento de *Bacillus* sp., se empleó agar nutritivo, preparado con 5.06 g de medio y 200 ml de agua purificada. Este proceso se replicó siguiendo los mismos pasos descritos. Todas las placas fueron almacenadas a 4°C hasta su uso.

Las muestras biológicas de agua residual, previamente filtradas, fueron enriquecidas utilizando caldo Cetrimida para *Pseudomonas* sp. El proceso de enriquecimiento consistió en mezclar el caldo con 100 ml de agua residual acuícola, homogenizar la solución y llevarla a una estufa a 37°C durante 24 horas para favorecer el aumento de biomasa (Fig. 1). De manera similar, para *Bacillus* sp., se empleó caldo nutritivo mezclado con agua residual acuícola y tratado en baño María a 100°C.

La siembra se realizó utilizando técnicas de agotamiento (cuatro fases) y estrías continuas, siguiendo las directrices del *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey* y las prácticas descritas en manuales de microbiología [35], [36], [37].

La preservación por congelamiento de las cepas bacterianas consistió en la selección de dos a más colonias de cada placa, los cuales fueron inoculados en crioviales con solución de glicerol al 25%. En total se almacenaron 34 viales criogénicos a congelación.

C. Identificación bioquímica

Se realizaron cinco pruebas microbiológicas y bioquímicas para la identificación de las cepas de *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. aisladas (Fig. 1). En primer lugar, se llevó a cabo la prueba de reducción de nitrato, donde se prepararon 20 placas con medio de cultivo sólido de agar nitrato, sembrando 10 con *Pseudomonas* sp. y 10 con *Bacillus* sp., incubándolas a 37°C durante 48 horas para observar la reducción del nitrato. Posteriormente, se realizó la tinción de Gram para la identificación entre bacterias Gram positivas y Gram negativas. La prueba de catalasa consistió en añadir una gota de peróxido de hidrógeno a 20 colonias bacterianas, observando la formación de burbujas, lo que indica la presencia de la enzima catalasa. En la prueba de oxidasa, se utilizó tiras reactivas sobre una superficie estéril, aplicando una pequeña cantidad de colonia, y se observó un cambio de color a azul o púrpura en menos de 30 segundos, lo que confirmó la presencia de citocromo c oxidasa. Finalmente, se realizó la prueba de fermentación de manitol, sembrando las cepas en agar manitol.

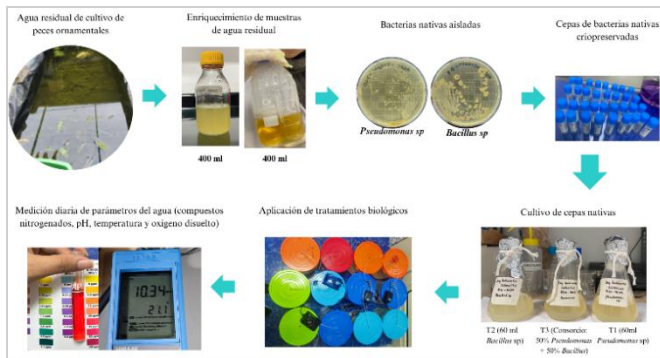


Fig. 1 Aislamiento de bacterias nativas del agua residual y aplicación del experimento.

D. Tratamiento de agua residual en reactores

El experimento se configuró para siete días. Se utilizó 12 reactores de flujo discontinuos con una capacidad de 6 litros de agua residual [38]. Estas aguas mezcladas se filtraron con tela y embudo de filtración para eliminar materia sólida y orgánica visible, con algunas modificaciones, dado que se decidió utilizar el agua sin esterilizar para evaluar la capacidad de los tratamientos en condiciones reales. Los reactores se alimentaron con aireación constante.

Para aplicar la técnica de bioaugmentación, las cepas preservadas en congelación de *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. se cultivaron en matraces cónicos de 250 ml con 200 ml de caldo nutritivo durante 24 h a 37°C y con pH 7.0, para recuperar la actividad celular. El consorcio se preparó con 50% de cepas *Pseudomonas* sp y 50% de cepas de *Bacillus* sp. La bioaugmentación se realizó añadiendo 1% de inóculo (v/v, 60 ml) de cultivo de los tratamientos biológicos (T1: *Pseudomonas* sp, T2: *Bacillus* sp, T3: consorcio) a los reactores [12], [14], [19], [22]. La concentración inicial de bacterias se ajustó a 1.5×10^8 UFC/ml con el patrón 0.5 McFarland y se monitoreó su crecimiento utilizando en un espectrofotómetro UV a 600 nm [39].

E. Métodos analíticos

Las concentraciones de nitrógeno amoniacal, nitrito y nitrato se determinaron utilizando reactivos del kit de nitrógeno API (Freshwater Master Test Kit), adaptado a métodos estándar de la APHA 2012. Para la medición de parámetros fisicoquímicos como oxígeno disuelto (OD), temperatura y pH, se utilizaron un multiparámetro y un potenciómetro de HANNA Instruments. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, y los resultados se tabularon con su respectivo promedio y desviación estándar. Para el análisis estadístico, se aplicó un ANOVA de una vía, ANOVA para diseño de bloques, y la prueba Tukey en el software Minitab 20, considerando un nivel de significancia del 5% ($p < 0.05$). La capacidad de remoción de nitrógeno se calculó utilizando la siguiente fórmula adaptada de [14], [15], [23]:

$$\text{Capacidad de remoción (\%)} = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} \times 100 \quad (1)$$

Ecuación (1), donde C_i es la concentración inicial de nitrógeno amoniacal, nitrito o nitrato, medida en mg/l, y C_f es la concentración final de estos compuestos.

III. RESULTADOS

A. Identificación de bacterias

Las características morfológicas y bioquímicas permitieron identificar a las cepas aisladas como *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. Las colonias de *Pseudomonas* sp. presentaron una textura lisa, brillante y elevación plana o ligeramente convexa, mientras que las de *Bacillus* sp. mostraron una apariencia más rugosa o granular, con variaciones en sus formas y una textura seca en algunas áreas.

En la tinción de Gram, *Pseudomonas* sp. resultó Gram negativa, con bacilos de color rosado, mientras que *Bacillus* sp. fue Gram positiva, con formas variadas de cocos y bastones. Ambas cepas reaccionaron positivamente en las pruebas de catalasa y oxidasa, y demostraron capacidad de crecimiento en medios selectivos, incluyendo agar nitrato y agar manitol. Estos resultados mostraron su potencial como bacterias heterótrofas nitrificantes y desnitrificantes aeróbicas (HNDA).

B. Nitrificación y desnitrificación aeróbica

El análisis estadístico reveló diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos biológicos en la remoción de nitrógeno amoniacal ($p=0.00$), nitrito ($p=0.006$) y nitrato ($p=0.00$). Las concentraciones iniciales de estos compuestos en los reactores excedían los estándares recomendados para agua de cultivo de peces: nitrógeno amoniacal (<0.2 mg/l), nitrito (<0.1 mg/l) y nitrato (<5 mg/l) [32], [33].

Según la prueba de comparación de medias, los tres tratamientos bacterianos (T1, T2 y T3), mostraron una capacidad significativa para reducir el nitrógeno amoniacal en comparación con el grupo control (Tabla I). En este experimento, el consorcio (T3) fue el más eficaz, logrando diferencias estadísticamente significativas en todas las variables evaluadas. Cabe destacar que, para $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, la prueba revela que los tres tratamientos no son significativamente diferentes, pero la menor media de concentración de este compuesto en siete días, lo tiene el T3 (0.193 mg/l).

TABLA I
PRUEBA POST HOC TUKEY PARA COMPARACIÓN DE MEDIAS DE TRATAMIENTOS

Trat.	$\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$		NO_2^-		NO_3^-	
	Media	Grupo*	Media	Grupo*	Media	Grupo*
Ctrl	2.01	A	0.13	A	22.15	A
T1	0.30	B	0.12	A	17.50	B
T2	0.29	B	0.12	A	17.15	B
T3	0.19	B	0.063	B	10.59	C

Nota. * Las medias que no comparten letra de grupo son significativamente diferentes.

Con mayor énfasis, la Fig. 2 presenta las concentraciones de NH_4^+ y NO_2^- (eje vertical izquierdo) y de NO_3^- (eje vertical derecho) en T3. Este tratamiento mostró el mejor desempeño, logrando una reducción cercana del 100% de todos los compuestos en menor tiempo. En contraste, en el grupo control las concentraciones aumentaron progresivamente, alcanzando valores finales de $2,667 \pm 0,500 \text{ mg/l}$ para $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, $0,250 \pm 0 \text{ mg/l}$ para NO_2^- y $25,56 \pm 5,27 \text{ mg/l}$ para NO_3^- .

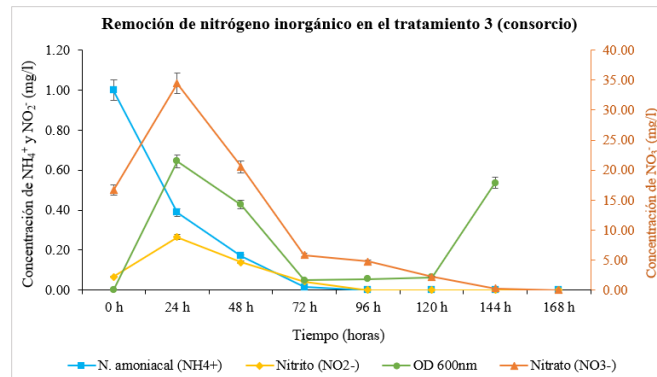


Fig. 2 Eficacia del consorcio bacteriano en la reducción de nitrógeno amoniacal, nitrito y nitrato, y su crecimiento (OD600nm) durante 7 días de tratamiento en agua residual.

Los tratamientos T1 (*Pseudomonas* sp.) y T2 (*Bacillus* sp.) también demostraron eficacia, pero las concentraciones finales de nitrato superaron los límites recomendados, registrando $6.11 \pm 1.32 \text{ mg/l}$ y $6.67 \pm 1.77 \text{ mg/l}$, respectivamente.

El consorcio eliminó completamente el nitrógeno amoniacal y el nitrito en 96 horas (Fig. 2), mientras que T1 y T2 lograron el mismo objetivo en 144 y 168 horas, respectivamente. En cuanto al nitrato, T3 logró su remoción completa a las 168 horas, mientras que T1 y T2 registraron reducciones parciales del 63.33% y 60.00%, respectivamente. El orden de eficacia en la remoción de ambos compuestos fue: T3 (96 h) > T1 (144 h) > T2 (168 h).

La remoción de nitrógeno amoniacal fue gradual en todos los tratamientos, mientras que el nitrito aumentó a las 24 y 48 horas, seguidos de un descenso posterior (Fig. 2). De similar forma para el nitrato, destacando T1 y T3 con concentraciones máximas de $34,44 \pm 5,27 \text{ mg/l}$ y $34,44 \pm 8,17 \text{ mg/l}$, respectivamente.

El crecimiento bacteriano, evaluado mediante la densidad óptica ($\text{OD}_{600\text{nm}}$), mostró un patrón relacionado con la remoción de compuestos nitrogenados, en los diferentes tratamientos inoculados con una concentración inicial de $1.5 \times 10^7 \text{ UFC/ml}$ (Fig. 2). A las 24 horas, T3 redujo alrededor del 61% de $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, coincidiendo con el pico de $\text{OD}_{600\text{nm}}$ (0.65); simultáneamente, las concentraciones de NO_2^- y NO_3^- fueron máximas. Sugiriendo una fase de rápido crecimiento y alta actividad degradadora de las bacterias nativas. Posteriormente, entre las 48 y 72 horas, se observó un descenso en la $\text{OD}_{600\text{nm}}$ a 0.1, seguido de una recuperación gradual hasta las 168 horas.

T3 mostró un crecimiento sostenido, mientras que T2 experimentó un rápido incremento inicial en 48 h seguido de

estabilización. T1 presentó un patrón intermedio, con un crecimiento menos constante que T3. Estas variaciones en el crecimiento bacteriano se relacionan con la dinámica de la eliminación de nitrógeno inorgánico en aguas de acuicultura, reflejando la actividad metabólica diferencial de las cepas involucradas.

C. Variación del pH, la temperatura y el oxígeno disuelto

El análisis de varianza y los coeficientes de variación (CV) indicaron diferencias significativas en la estabilidad de los parámetros fisicoquímicos pH ($p=0.005$), oxígeno disuelto (OD) ($p=0.032$) y temperatura ($p=0.002$) entre los tratamientos bacterianos. Se observaron fluctuaciones notorias en las mediciones, pero, a excepción de la temperatura, el tratamiento con consorcio (T3) mostró la menor variación en pH y OD.

En relación con el pH, T3 presentó la mayor estabilidad, con una varianza de 0.0073 y CV de 1.12%. Por el contrario, T1 y T2 exhibieron mayores fluctuaciones, con varianzas de 0.0077 y 0.0093, y CV de 1.16% y 1.28%, respectivamente.

Para el OD, la varianza en T3 fue la más baja (0.0064), con un CV de 0.91%, lo que indica una mayor estabilidad en comparación con T1 y T2, cuyos CV fueron de 4.58% y 4.75%. Según la prueba de Tukey, las medias del OD entre tratamientos no mostraron diferencias significativas, oscilando entre 8.79 y 9.08 mg/l (Tabla II).

TABLA II PRUEBA ESTADÍSTICA TUKEY PARA PH, OD Y TEMPERATURA						
Tratam.	pH		OD (mg/l)		Temperatura (°C)	
	Media ^a	Grupo	Media	Grupo	Media	Grupo
Control	7.51	B	9.08	A	20.98	B
T1	7.58	A-B	9.01	A	21.20	A-B
T2	7.52	B	8.79	A	21.35	A
T3	7.63	A	8.79	A	21.37	A

^aLas medias que no comparten letra de grupo son significativamente diferentes.

En cuanto a la temperatura, los tratamientos mostraron un comportamiento similar, con varianzas de 0.378 (control), 0.426 (T1), 0.456 (T2) y 0.462 (T3), y CV entre 2.93% y 3.18%. La prueba de Tukey señaló diferencias significativas entre el control y T2-T3, pero no entre los tratamientos (Tabla II). Pero, se identificó una diferencia significativa entre la media en horas de medición iniciales (24 h, 22.03 °C), horas intermedias (72 h, 20.99 °C) y horas finales (120 h, 20.37 °C).

La Fig. 3 muestra la evolución de los parámetros fisicoquímicos del agua en cada tratamiento durante el periodo de medición. El pH (Fig. 3a), en T3 disminuyó de 7.56 a 7.47 a las 24 horas; sin embargo, luego presentó un incremento gradual, alcanzando valores entre 7.64 y 7.72. En contraste, T1 y el control mostraron una leve reducción después de las 120 horas, registrando 7.53 y 7.45, respectivamente.

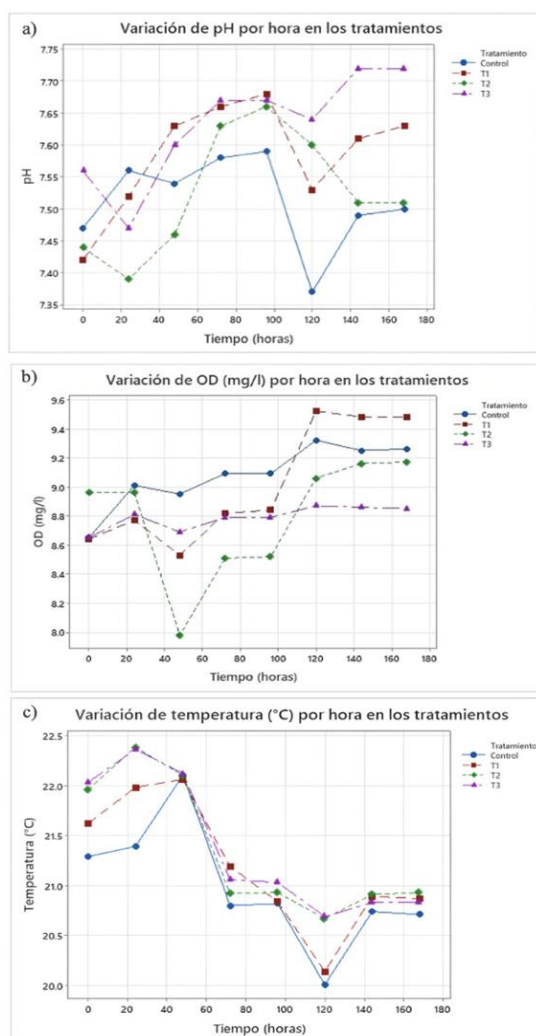


Fig. 3 Comportamiento de (a) pH (°C), (b) oxígeno disuelto (mg/l) y (c) temperatura por tratamiento aplicado en los reactores.

El OD presentó una disminución en T2, pasando de 8.96 mg/l a 7.98 mg/l a las 48 horas (Fig. 3b). Sin embargo, en T3, se estabilizó entre las 72 y 168 horas, con concentraciones entre 8.60 mg/l y 8.62 mg/l. Los tratamientos T1 y T2 mostraron incrementos más marcados a partir de las 96 horas. En la temperatura (Fig. 3c) se detectaron dos picos en la serie de tiempo, un incremento durante las primeras 48 horas y una caída a las 120 horas, con valores mínimos en T1 (20.14 °C).

Los resultados señalan que T3 promovió la mayor estabilidad en el pH y OD. En cambio, la temperatura mostró un comportamiento similar entre tratamientos, con fluctuaciones vinculadas principalmente a las horas de medición, más que al efecto de los tratamientos bacterianos.

IV. DISCUSIÓN

A. Identificación de bacterias

Los resultados permitieron caracterizar morfológica, bioquímica y funcionalmente a las cepas aisladas, evaluando su eficacia en la reducción de compuestos nitrogenados y su

impacto sobre parámetros fisicoquímicos del agua. Las cepas presumibles de *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.* presentaron características compatibles con bacterias nitrificantes y desnitrificantes, tales como actividad catalasa positiva y la capacidad para reducir nitrógeno inorgánico [40], [41]. Estas propiedades concuerdan con estudios previos que destacan su rol en los ciclos biogeoquímicos del nitrógeno en ambientes acuáticos [42], [43]. Durante los procesos de nitrificación y desnitrificación aeróbica, estas bacterias utilizan el oxígeno y nitrato como aceptores de electrones en su metabolismo, facilitando la conversión simultánea de nutrientes en nitrógeno gaseoso [44], [45]. Esta investigación aporta al conocimiento de la desnitrificación aeróbica mediante evaluación de cepas aisladas de estanques acuícolas y aplicadas directamente en aguas residuales acuícolas no esterilizadas, proporcionando información relevante sobre el comportamiento bacteriano en ambientes complejos y no controlados.

B. Nitrificación y desnitrificación aeróbica

Este estudio demostró la eficacia de *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.* en la remoción de compuestos nitrogenados (nitrógeno amoniacal, nitrito y nitrato) en agua residual real no esterilizada. El uso del consorcio bacteriano logró una eliminación completa del nitrógeno amoniacal en 96 horas, superando a los tratamientos individuales, que alcanzaron su máxima eficiencia en 144 horas. Este comportamiento coincide con investigaciones previas que evidencian la superioridad de consorcios microbianos debido a sus efectos sinérgicos, eliminando el nitrógeno en más del 84% en 120 horas [42], [46]. Asimismo, estudios que integraron bacterias nativas con microalgas y cianobacterias comunicaron que, en 96 horas, la tasa de eliminación fue alta con concentraciones finales de $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ inferiores a 1 mg/l [16].

La sinergia microbiana observada en este experimento favoreció la degradación acelerada del nitrógeno inorgánico, reduciendo los niveles de amoníaco a valores inferiores a 0.2 mg/l, adecuados para su reutilización en acuicultura [47], [48], [49]. Además, los valores obtenidos cumplen con los límites recomendados para amoníaco (0.5 mg/l), amoníaco no ionizado (0.05 mg/l) y nitrógeno amoniacal total (1 mg/l) en efluentes acuícolas [19], [50].

En contraste, los tratamientos individuales, *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.*, mostraron un desempeño más lento, presumiblemente debido a la adaptación inicial de las bacterias indígenas al medio no esterilizado, a la competencia por nutrientes y a la mortalidad celular en etapas tempranas [38]. Estas observaciones concuerdan con reportes que documentan retrasos en la activación de cepas individuales en condiciones no óptimas [14], [51]. La acumulación inicial de nitrógeno amoniacal refuerza el supuesto de un período de aclimatación antes del crecimiento logarítmico de las bacterias [11], [52].

La detección de nitritos y nitratos durante las primeras 24 horas sugiere un proceso activo de nitrificación, en el que NH_4^+ fue oxidado secuencialmente a NO_2^- y posteriormente a NO_3^- [30], [53]. Se observó un incremento transitorio de nitrito,

seguido de su rápido declive. En contraste, un estudio reciente con cepas inmovilizadas de *Bacillus subtilis* sp. N4, bajo condiciones estrictamente controladas e iniciando con una concentración de 20 mg/l de nitrito, reportó un crecimiento máximo a las 12 horas y una remoción del 99% en 24 horas, alcanzando una concentración final de 1.01 mg/l [45]. Es importante precisar que, a diferencia de dicho estudio donde el nitrito era el sustrato inicial, en el presente experimento este compuesto se produjo *in situ* a lo largo del tiempo.

En condiciones reales, *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp., aplicadas de manera suspendida, lograron tasas de remoción de nitratos de 63.33% y 60.0%, respectivamente. Aunque las concentraciones residuales aún superaron el umbral recomendado (<5 mg/l) para su reutilización en sistemas acuícolas, estos resultados son comparables a los reportados por [38] y [54], con eficacias de 29.2% y 60% utilizando cepas de *Bacillus subtilis* NX-2 y *Rhodobacter azotoformans* en ambientes no controlados. Cabe señalar que, con métodos de evolución dirigida y optimización de síntesis proteica, se han logrado tasas de remoción superiores al 80% en 48 a 72 horas.

Por otro lado, [11] y [19] comunicaron eficiencias del 95% y 72.86% en 28 y 40 horas, diferencias atribuibles a la composición del agua, duración del tratamiento, las condiciones ambientales o la naturaleza de las cepas empleadas, que podrían no ser estrictamente desnitrificantes [23], [55]. A pesar de ello, el efluente tratado en este estudio es apto para vertimientos según el consenso científico para sistemas de mayor escala (2-110 mg/l) [50]; y según los *Estándares de Calidad Ambiental* para agua en Perú, en la Categoría 3-D1: riego de vegetales (100 mg/l), y en la Categoría 4 para lagunas, lagos y ríos (13 mg/l) [31]. Además, las cepas individuales demostraron ser capaces en la prevención de acumulaciones de nitrato superiores a 40 mg/l, que favorecen la eutrofización en ambientes acuáticos [56].

El consorcio bacteriano destacó por su capacidad para remover nitritos y nitratos en un plazo de 96 a 168 horas, demostrando alta eficiencia en procesos de desnitrificación aeróbica y un potencial para aplicaciones a pequeña y mediana escala de acuicultura o reactores de tratamiento de agua residual. Esta eficiencia se atribuye a la comunicación y cooperación entre ambas cepas, que optimizan la actividad enzimática [14], [47].

Sin embargo, el tiempo de respuesta observado en este estudio fue más prolongado en comparación con condiciones estrictamente controladas, donde se han reportado reducciones superiores al 88% en menos de 24 horas aplicando cultivos mixtos de *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Acitenobacter* sp. y *P. Chengduensis* [47], [51], [57]. Otros autores han mostrado que, incluso bajo condiciones óptimas en reactores de laboratorio de 5 litros, la estabilización de la remoción de nitrógeno inorgánico (nitrato, nitrito y amonio) puede requerir periodos de hasta 7 días, alcanzando eficiencias de 87.37% para aguas de sistemas RAS y 65% para efluentes de estanques acuícolas [58], con *Bacillus* sp., *Halomonas* sp. y *Pseudomonas* sp. como géneros dominantes. Estas discrepancias pueden

explicarse por diferencias en el volumen tratado, tipo de agua, tipo de operación del reactor (continuo vs. discontinuo) y la ausencia de pretratamientos en el presente estudio, factores que reflejan un enfoque más realista, pero también más exigente para las bacterias.

La influencia de los microorganismos nativos del agua no esterilizada, también podría haber ralentizado el proceso, debido a la competencia ecológica. Estudios anteriores destacan que la inmovilización bacteriana mejora la retención de biomasa y, por tanto, la eficiencia de eliminación de nitrógeno en biorreactores discontinuos [59]. Pese a esto, la compatibilidad entre *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. permitió mitigar estas limitaciones, probablemente a la producción de compuestos antimicrobianos por parte de *Bacillus* sp. [12], [36].

La presencia de genes clave en las rutas de nitrificación y desnitrificación aeróbica, como *napA*, *narG*, *nirS* y *nirK*, en ambas cepas, respalda la alta eficiencia observada [53], [57]. Estos hallazgos consolidan el potencial del consorcio como herramienta biotecnológica efectiva para el tratamiento de aguas residuales en acuicultura y en general, particularmente en sistemas de recirculación a pequeña y mediana escala.

C. Variación del pH, la temperatura y el oxígeno disuelto

Las tasas de remoción de compuestos nitrogenados en este estudio estuvieron estrechamente relacionadas con las condiciones fisicoquímicas del medio [60], [61], [62]. Valores de pH entre 6 y 8, oxígeno disuelto (OD) superior a 5 mg/L y temperaturas entre 20°C y 40°C se mantuvieron constantes durante los experimentos, lo que favoreció la actividad microbiana. Estas condiciones, reportadas como óptimas, impulsaron la eliminación eficaz de amoniacal, nitrito y nitrato en todos los tratamientos [19], [22], [23], [38], [43].

El consorcio de *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. demostró mayor estabilidad y eficiencia, atribuida a su capacidad de cooperación metabólica, que reduce la acumulación de intermediarios capaces de alterar los parámetros del agua [63], [64]. Esta cooperación facilitó intercambios metabólicos entre las especies, donde *Pseudomonas* sp. libera aminoácidos como L-valina y L-leucina, aprovechados por *Bacillus* sp. para la síntesis de proteínas [64]. En cambio, se documenta que las cepas individuales presentan una susceptibilidad inherente a las fluctuaciones ambientales, lo que compromete la eficiencia de remoción en la complejidad de los reactores con aguas residuales sin esterilizar, sistemas de escala real, las cuales introducen incertidumbres operacionales y múltiples variables [58].

De todos los parámetros evaluados, la temperatura presentó la mayor variación, especialmente en el tratamiento con consorcio bacteriano. Este comportamiento podría deberse al calor generado durante la fase exponencial de crecimiento, cuando la tasa de degradación de compuestos es más alta [39], [43], [62]. Aunque este fenómeno biológico está documentado, otros autores sugieren que las fluctuaciones térmicas pueden ser influenciadas por factores como condiciones climáticas, errores en la medición, ubicación de muestras o las características del reactor [38], [65]. En este estudio, los cambios de temperatura

durante la transición estacional (abril a junio) pudieron contribuir a las variaciones registradas.

Respecto al pH, los tratamientos mostraron comportamientos diferenciados. Los tratamientos con *Bacillus* sp. y el consorcio exhibieron una caída inicial del pH en las primeras 24 horas, debido a la producción de subproductos ácidos durante la nitrificación [11], [39], [43]. Pero, *Pseudomonas* sp más *Bacillus* sp lograron estabilizar rápidamente el pH hacia niveles levemente alcalinos, favoreciendo la continuidad del proceso [36], [66]. Por otro lado, los tratamientos individuales presentaron mayor variabilidad, lo cual podría explicarse por la duración más prolongada de las etapas de degradación. En particular, el tratamiento con *Bacillus* mostró una mayor oscilación en pH y oxígeno disuelto, asociada a su rápida adaptación y alta actividad metabólica, que generó cambios significativos en la composición del medio [38], [66].

El oxígeno disuelto se mantuvo en niveles adecuados (>5 mg/L) durante todo el experimento, garantizando la actividad enzimática de las bacterias [12], [43]. Aunque, las primeras 48 horas evidenciaron fluctuaciones iniciales debido a la alta demanda biológica de oxígeno asociada al crecimiento acelerado de las bacterias, seguido de una estabilización hacia las etapas finales del proceso [15], [67]. Este patrón indica que el suministro de aire fue suficiente para mantener el metabolismo bacteriano, aunque es importante evitar una aireación excesiva, ya que podría dificultar la eliminación de nitratos, como lo sugieren estudios previos con especies de *Bacillus* aeróbicas [68].

La estabilización de estos parámetros propició que las bacterias lograran llevar a cabo la nitrificación y desnitrificación de manera simultánea en un reactor aireado, tal como lo reportado de que las bacterias HNDA, en consorcio, se adaptan rápidamente a los cambios en la calidad del agua [58]. Este enfoque representa una ventaja significativa frente a la desnitrificación convencional, ya que simplifica el sistema de tratamiento [11], [47], [69], reduce costos asociados a la separación de biorreactores óxicos y anóxicos, y la cantidad necesaria de lodos activados [51], [62], [70]. Estos hallazgos subrayan el potencial del consorcio de *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. para el desarrollo de biotecnologías sostenibles dirigidas al tratamiento de aguas residuales con altos niveles de nitrógeno.

V. CONCLUSIONES

El estudio realizado demostró que el consorcio bacteriano conformado por *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. es altamente efectivo para la eliminación de compuestos nitrogenados presentes en efluentes de acuicultura ornamental. Este consorcio logró una remoción completa de nitrógeno amoniacal, nitrito y nitrato, superando significativamente la eficacia de los tratamientos con cultivos individuales. La eliminación de nitrógeno amoniacal y nitrito se alcanzó en un periodo de 96 horas, mientras que la remoción de nitrato requirió 168 horas. Además, el tratamiento con el consorcio

bacteriano permitió mantener condiciones fisicoquímicas estables en el medio, minimizando las fluctuaciones en parámetros críticos. Los valores óptimos observados para maximizar la actividad nitrificante y desnitrificante incluyeron un pH en el rango de 7.47 a 7.72, una temperatura de entre 20°C y 23°C, y concentraciones de oxígeno disuelto superiores a 5 mg/L. Estos resultados resaltan el potencial del consorcio bacteriano como una solución eficiente y sostenible para el tratamiento de aguas residuales en la acuicultura ornamental.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas por facilitar el acceso a sus instalaciones, brindar orientación profesional y proporcionar los materiales necesarios para llevar a cabo esta investigación.

REFERENCIAS

- [1] FAO, "El estado mundial de la Pesca y la Acuicultura 2022," FAO. Accessed: Sep. 02, 2023. [Online]. Available: <https://www.fao.org/3/cc0461es/online/sofia/2022/aquaculture-production.html>
- [2] OCDE and FAO, "OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2023-2032," OECD, Paris, Oct. 2023. doi: 10.1787/2AD6C3AB-ES.
- [3] P. Monticini, "The ornamental fish trade - Production and Commerce of Ornamental Fish: Technical-Managerial and Legislative Aspects," Roma, 2010. Accessed: Jun. 24, 2024. [Online]. Available: <http://www.fao.org/3/a-bb206e.pdf>
- [4] M. Vanderzwalmen *et al.*, "Monitoring water quality changes and ornamental fish behaviour during commercial transport," *Aquaculture*, vol. 531, p. 735860, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.AQUACULTURE.2020.735860.
- [5] A. Nlewadim and O. Alum-Udendi, "Exotic Fish Species Introductions and Risks to Biodiversity and Ecosystems: a Review and Nigerian Perspectives," *World Aquaculture*, vol. 23, no. 9, pp. 63–67, Sep. 2023, Accessed: Jun. 24, 2024. [Online]. Available: <https://www.was.org/Magazine/2023/03/62/#zoom=true>
- [6] PNIPA, "Cadena de valor de peces ornamentales: Estudio prospectivo," Lima, Apr. 2021. Accessed: Sep. 02, 2023. [Online]. Available: <https://repositorio.pnipa.gob.pe/handle/20.500.12864/302>
- [7] PNIPA, "Cadena de valor de peces ornamentales: Estudio prospectivo," Lima, Apr. 2021. Accessed: Sep. 02, 2023. [Online]. Available: <https://repositorio.pnipa.gob.pe/handle/20.500.12864/302>
- [8] Y. Wei *et al.*, "The exogenous compound bacteria alter microbial community and nutrients removal performance in the biofilm unit of the integrated aquaculture wastewater bioremediation systems," *Aquac Rep*, vol. 27, p. 101414, Dec. 2022, doi: 10.1016/J.AQREP.2022.101414.
- [9] S. 'Mowbray, "Nuevo informe revela la cadena de daños que provocan las aguas residuales al planeta," Feb. 17, 2022. Accessed: May 01, 2024. [Online]. Available: <https://es.mongabay.com/2022/02/nuevo-informe-revela-cadena-de-danos-que-provocan-las-aguas-residuales-al-planeta/>
- [10] R. Vinothkumar *et al.*, "Heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacteria: Characterization and comparison of shrimp pond and effluent discharge channel in aspects of composition and function," *Aquaculture*, vol. 539, p. 736659, Jun. 2021, doi: 10.1016/J.AQUACULTURE.2021.736659.
- [11] M. Deng, X. Zhao, Y. Senbati, K. Song, and X. He, "Nitrogen removal by heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas* sp. DM02: Removal performance, mechanism and immobilized application for real aquaculture wastewater treatment," *Bioresour Technol*, vol. 322, p. 124555, Feb. 2021, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2020.124555.

- [12] E. M. John, K. Krishnapriya, and T. V. Sankar, "Treatment of ammonia and nitrite in aquaculture wastewater by an assembled bacterial consortium," *Aquaculture*, vol. 526, p. 735390, Sep. 2020, doi: 10.1016/J.AQUACULTURE.2020.735390.
- [13] P. H. Hoang, T. M. Nguyen, N. C. T. Le, K. S. Phan, T. T. T. Mai, and P. T. Ha, "Characterization of Isolated Aerobic Denitrifying Bacteria and Their Potential Use in the Treatment of Nitrogen-Polluted Aquaculture Water," *Curr Microbiol*, vol. 79, no. 7, pp. 1–10, Jul. 2022, doi: 10.1007/S00284-022-02898-2/FIGURES/5.
- [14] F. Huang, L. Pan, Z. He, M. Zhang, and M. Zhang, "Culturable heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterial consortia with cooperative interactions for removing ammonia and nitrite nitrogen in mariculture effluents," *Aquaculture*, vol. 523, p. 735211, Jun. 2020, doi: 10.1016/J.AQUACULTURE.2020.735211.
- [15] J. Lu, Y. Zhang, J. Wu, and J. Wang, "Nitrogen removal in recirculating aquaculture water with high dissolved oxygen conditions using the simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification system," *Bioresour Technol*, vol. 305, p. 123037, Jun. 2020, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2020.123037.
- [16] Y. Aranda-Vega *et al.*, "Biodegradability and bioavailability of dissolved substances in aquaculture effluent: Performance of indigenous bacteria, cyanobacteria, and green microalgae," *Environmental Pollution*, vol. 345, p. 123468, Mar. 2024, doi: 10.1016/J.ENVPOL.2024.123468.
- [17] UNEP, "Cuatro razones para limitar la contaminación por nitrógeno," UNEP. Accessed: Nov. 24, 2023. [Online]. Available: <https://www.unep.org/es/noticias-y-reportajes/reportajes/cuatro-razones-para-limitar-la-contaminacion-por-nitrogeno>
- [18] A. Kalaycı Kara, Ö. Fakioğlu, R. Kotan, M. Atamanalp, and G. Alak, "The investigation of bioremediation potential of *Bacillus subtilis* and *B. thuringiensis* isolates under controlled conditions in freshwater," *Arch Microbiol*, vol. 203, no. 5, pp. 2075–2085, Jul. 2021, doi: 10.1007/S00203-021-02187-9/TABLES/3.
- [19] M. Gogoi, P. Bhattacharya, S. Kumar Sen, I. Mukherjee, S. Bhushan, and S. R. Chaudhuri, "Aquaculture effluent treatment with ammonia remover *Bacillus albus* (ASSF01)," *J Environ Chem Eng*, vol. 9, no. 4, p. 105697, Aug. 2021, doi: 10.1016/J.JECE.2021.105697.
- [20] C. Huan *et al.*, "Nitrogen removal characteristics of efficient heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium and application in biological deodorization," *Bioresour Technol*, vol. 363, p. 128007, Nov. 2022, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2022.128007.
- [21] T. Liu, B. Wang, M. Liu, K. Jiang, and L. Wang, "Stutzerimonas frequens strain TF18 with superior heterotrophic nitrification-aerobic denitrification ability for the treatment of aquaculture effluent," *Process Biochemistry*, vol. 130, pp. 156–165, Jul. 2023, doi: 10.1016/J.PROCBIO.2023.04.018.
- [22] M. Deng, Z. Dai, Y. Senbati, L. Li, K. Song, and X. He, "Aerobic Denitrification Microbial Community and Function in Zero-Discharge Recirculating Aquaculture System Using a Single Biofloc-Based Suspended Growth Reactor: Influence of the Carbon-to-Nitrogen Ratio," *Front Microbiol*, vol. 11, p. 544066, Aug. 2020, doi: 10.3389/FMICB.2020.01760/BIBTEX.
- [23] H. Shu *et al.*, "Nitrogen removal characteristics and potential application of the heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria *Pseudomonas mendocina* S16 and *Enterobacter cloacae* DS'5 isolated from aquaculture wastewater ponds," *Bioresour Technol*, vol. 345, p. 126541, Feb. 2022, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2021.126541.
- [24] J. Lu, Y. Zhang, J. Wu, and J. Wang, "Nitrogen removal in recirculating aquaculture water with high dissolved oxygen conditions using the simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification system," *Bioresour Technol*, vol. 305, p. 123037, Jun. 2020, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2020.123037.
- [25] P. Bhatt, P. B. Brown, J. Y. Huang, A. S. Hussain, H. T. Liu, and H. Simsek, "Algae and indigenous bacteria consortium in treatment of shrimp wastewater: A study for resource recovery in sustainable aquaculture system," *Environ Res*, vol. 250, p. 118447, Jun. 2024, doi: 10.1016/J.ENVRES.2024.118447.
- [26] B. Li, R. Jia, Y. Hou, C. Zhang, J. Zhu, and X. Ge, "The Sustainable Treatment Effect of Constructed Wetland for the Aquaculture Effluents from Blunt Snout Bream (*Megalobrama amblycephala*) Farm," *Water* 2021, Vol. 13, Page 3418, vol. 13, no. 23, p. 3418, Dec. 2021, doi: 10.3390/W13233418.
- [27] H. Li, Z. Cui, H. Cui, Y. Bai, Z. Yin, and K. Qu, "Hazardous substances and their removal in recirculating aquaculture systems: A review," *Aquaculture*, vol. 569, p. 739399, May 2023, doi: 10.1016/J.AQUACULTURE.2023.739399.
- [28] S. Paolacci, V. Stejskal, D. Toner, and M. A. K. Jansen, "Wastewater valorisation in an integrated multitrophic aquaculture system; assessing nutrient removal and biomass production by duckweed species," *Environmental Pollution*, vol. 302, p. 119059, Jun. 2022, doi: 10.1016/J.ENVPOL.2022.119059.
- [29] J. Jian *et al.*, "Nitrogen removal performance and sludge characteristics of wastewater from industrial recirculating aquaculture systems via anammox coupled with denitrification," *Journal of Water Process Engineering*, vol. 49, p. 103092, Oct. 2022, doi: 10.1016/J.JWPE.2022.103092.
- [30] M. Yi *et al.*, "Efficient nitrogen removal of a novel *Pseudomonas chengduensis* strain BF6 mainly through assimilation in the recirculating aquaculture systems," *Bioresour Technol*, vol. 379, p. 129036, Jul. 2023, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2023.129036.
- [31] MINAM, "Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM .- Aprueban Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua y establecen Disposiciones Complementarias," Sistema Nacional de Información Ambiental . Accessed: Feb. 06, 2023. [Online]. Available: <https://sinia.minam.gob.pe/normas/aprueban-estandares-calidad-ambiental-eca-agua-establecen-disposiciones>
- [32] Y. He, "Design of water quality monitoring platform based on Embedded System," *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*, vol. 631, no. 1, Jan. 2021, doi: 10.1088/1755-1315/631/1/012020.
- [33] R. K. Mohanty, A. Kumar, A. Mishra, D. K. Panda, and D. Patil, "Water Budgeting and Management: Enhancing Aquacultural Water Productivity," India, 2014. Accessed: Sep. 16, 2023. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/281237512_Water_Budgeting_and_Management_Enhancing_Aquacultural_Water_Productivity
- [34] MINAM, "Línea de base de los peces ornamentales con fines de bioseguridad en el Perú," Lima, Dec. 2021. Accessed: Sep. 02, 2023. [Online]. Available: https://bioseguridad.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2021/12/ldb_pecesornam_2021.pdf
- [35] S. Sanz, *Prácticas de microbiología*, 2nd ed. Unirioja, 2011. Accessed: Nov. 19, 2023. [Online]. Available: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/libro/100835.pdf>
- [36] D. J. Brenner *et al.*, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 2. New York: Springer, 2005.
- [37] P. Vos *et al.*, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 3. New York: Springer, 2009.
- [38] Z. Li *et al.*, "Ammonia assimilation: A double-edged sword influencing denitrification of *Rhodobacter azotoformans* and for nitrogen removal of aquaculture wastewater," *Bioresour Technol*, vol. 345, p. 126495, Feb. 2022, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2021.126495.
- [39] L. Dou, W. Chen, L. Pan, and F. Huang, "Characterization of *Vibrio* sp. strain AB15 and *Pseudomonas fluorescens* strain NB14 from the biofloc of shrimp culture ponds capable of high ammonia and nitrite removal efficiency," *J World Aquac Soc*, vol. 52, no. 4, pp. 843–858, Aug. 2021, doi: 10.1111/JWAS.12789.
- [40] D. J. Brenner *et al.*, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 2. New York: Springer, 2005.
- [41] P. Vos *et al.*, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 3. New York: Springer, 2009.
- [42] E. M. John, K. Krishnapriya, and T. V. Sankar, "Treatment of ammonia and nitrite in aquaculture wastewater by an assembled bacterial consortium," *Aquaculture*, vol. 526, p. 735390, Sep. 2020, doi: 10.1016/J.AQUACULTURE.2020.735390.

- [43] W. Fu *et al.*, "Isolation and Identification of an Efficient Aerobic Denitrifying *Pseudomonas stutzeri* Strain and Characterization of Its Nitrite Degradation," *Catalysts* 2021, Vol. 11, Page 1214, vol. 11, no. 10, p. 1214, Oct. 2021, doi: 10.3390/CATAL11101214.
- [44] T. Hu, J. Wei, Y. Ding, S. Li, W. Zhang, and J. Zhang, "Characterisation of *Pseudomonas mosselii* H6 for aerobic denitrification: stoichiometry and reaction kinetics," *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, vol. 38, no. 1, p. 2402445, Dec. 2024, doi: 10.1080/13102818.2024.2402445;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:TBEQ20;WGROU:STRING:PUBLICATION.
- [45] T. Y. Huang, H. J. Ju, M. Y. Huang, Q. M. Kuo, and W. T. Su, "Optimal nitrite degradation by isolated *Bacillus subtilis* sp. N4 and applied for intensive aquaculture water quality management with immobilized strains," *J Environ Manage*, vol. 374, p. 123896, Feb. 2025, doi: 10.1016/J.JENVMAN.2024.123896.
- [46] F. Huang, L. Pan, Z. He, M. Zhang, and M. Zhang, "Culturable heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterial consortia with cooperative interactions for removing ammonia and nitrite nitrogen in mariculture effluents," *Aquaculture*, vol. 523, p. 735211, Jun. 2020, doi: 10.1016/J.AQUACULTURE.2020.735211.
- [47] Z. Su *et al.*, "Nitrogen removal performance, quantitative detection and potential application of a novel aerobic denitrifying strain, *Pseudomonas* sp. GZWN4 isolated from aquaculture water," *Bioprocess Biosyst Eng*, vol. 44, no. 6, pp. 1237–1251, Jun. 2021, doi: 10.1007/S00449-021-02523-9/FIGURES/8.
- [48] R. K. Mohanty, A. Kumar, A. Mishra, D. K. Panda, and D. Patil, "Water Budgeting and Management: Enhancing Aquacultural Water Productivity," India, 2014. Accessed: Sep. 16, 2023. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/281237512_Water_Budgeting_and_Management_Enhancing_Aquacultural_Water_Productivity
- [49] Y. He, "Design of water quality monitoring platform based on Embedded System," *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*, vol. 631, no. 1, Jan. 2021, doi: 10.1088/1755-1315/631/1/012020.
- [50] F. Alitaleshi, A. Daghbandan, and A. Pendashteh, "Performance of rice husk biocarrier on ammonia nitrogen removal in the MBBR treating aquaculture wastewater using biological attached growth process: Performance and kinetic study," *J Environ Chem Eng*, vol. 12, no. 1, p. 111446, Feb. 2024, doi: 10.1016/J.JECE.2023.111446.
- [51] Z. Lu *et al.*, "Iron-based multi-carbon composite and *Pseudomonas furukawaii* ZS1 co-affect nitrogen removal, microbial community dynamics and metabolism pathways in low-temperature aquaculture wastewater," *J Environ Manage*, vol. 349, p. 119471, Jan. 2024, doi: 10.1016/J.JENVMAN.2023.119471.
- [52] L. Xia, X. Li, W. Fan, and J. Wang, "Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Acinetobacter* sp. ND7 isolated from municipal activated sludge," *Bioresour Technol*, vol. 301, p. 122749, Apr. 2020, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2020.122749.
- [53] Y. Xie, X. Tian, Y. He, S. Dong, and K. Zhao, "Nitrogen removal capability and mechanism of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium *Halomonas* sp. DN3," *Bioresour Technol*, vol. 387, p. 129569, Nov. 2023, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2023.129569.
- [54] L. Sun *et al.*, "A strategy for nitrogen conversion in aquaculture water based on poly- γ -glutamic acid synthesis," *Int J Biol Macromol*, vol. 229, pp. 1036–1043, Feb. 2023, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2022.12.314.
- [55] M. Yi *et al.*, "Immobilized denitrifying bacteria on modified oyster shell as biofilter carriers enhance nitrogen removal," *J Environ Chem Eng*, vol. 11, no. 1, p. 109214, Feb. 2023, doi: 10.1016/J.JECE.2022.109214.
- [56] API, "API Freshwater Master Test Kit Instruction Manual," 2024.
- [57] M. Yi *et al.*, "Efficient nitrogen removal of a novel *Pseudomonas chengduensis* strain BF6 mainly through assimilation in the recirculating aquaculture systems," *Bioresour Technol*, vol. 379, p. 129036, Jul. 2023, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2023.129036.
- [58] M. Ning, X. Li, Z. Lu, Y. Yang, and W. Liu, "Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification (HNAD) in marine aquaculture wastewater treatment: Nitrogen removal performance, mechanism and microbial community characteristics," *Journal of Water Process Engineering*, vol. 70, p. 107006, Feb. 2025, doi: 10.1016/J.JWPE.2025.107006.
- [59] P. H. Hoang, T. M. Nguyen, N. C. T. Le, K. S. Phan, T. T. T. Mai, and P. T. Ha, "Characterization of Isolated Aerobic Denitrifying Bacteria and Their Potential Use in the Treatment of Nitrogen-Polluted Aquaculture Water," *Curr Microbiol*, vol. 79, no. 7, pp. 1–10, Jul. 2022, doi: 10.1007/S00284-022-02898-2/FIGURES/5.
- [60] X. Y. Gao, Y. Liu, L. L. Miao, and Z. P. Liu, "Pseudomonas sp. AOB-7 utilizes PHA granules as a sustained-release carbon source and biofilm carrier for aerobic denitrification of aquaculture water," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 104, no. 7, pp. 3183–3192, Apr. 2020, doi: 10.1007/S00253-020-10452-Y/FIGURES/6.
- [61] D. Dong, H. Sun, Z. Qi, and X. Liu, "Improving microbial bioremediation efficiency of intensive aquacultural wastewater based on bacterial pollutant metabolism kinetics analysis," *Chemosphere*, vol. 265, p. 129151, Feb. 2021, doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.129151.
- [62] P. H. Hoang, T. M. Nguyen, N. C. T. Le, K. S. Phan, T. T. T. Mai, and P. T. Ha, "Characterization of Isolated Aerobic Denitrifying Bacteria and Their Potential Use in the Treatment of Nitrogen-Polluted Aquaculture Water," *Curr Microbiol*, vol. 79, no. 7, pp. 1–10, Jul. 2022, doi: 10.1007/S00284-022-02898-2/FIGURES/5.
- [63] T. A. Aragaw, "Functions of various bacteria for specific pollutants degradation and their application in wastewater treatment: a review," *International Journal of Environmental Science and Technology* 2020 18:7, vol. 18, no. 7, pp. 2063–2076, Nov. 2020, doi: 10.1007/S13762-020-03022-2.
- [64] X. Sun *et al.*, "Bacillus velezensis stimulates resident rhizosphere *Pseudomonas stutzeri* for plant health through metabolic interactions," *ISME J*, vol. 16, no. 3, pp. 774–787, Mar. 2022, doi: 10.1038/S41396-021-01125-3.
- [65] M. A. Hassan, M. A. Fathallah, M. A. Elzoghby, M. G. Salem, and M. S. Helmy, "Influence of probiotics on water quality in intensified *Litopenaeus vannamei* ponds under minimum-water exchange," *AMB Express*, vol. 12, no. 1, pp. 1–12, Dec. 2022, doi: 10.1186/S13568-022-01370-5/TABLES/4.
- [66] A. S. Vega-Carranza *et al.*, "Investigating the Effect of Bacilli and Lactic Acid Bacteria on Water Quality, Growth, Survival, Immune Response, and Intestinal Microbiota of Cultured *Litopenaeus vannamei*," *Animals* 2024, Vol. 14, Page 2676, vol. 14, no. 18, p. 2676, Sep. 2024, doi: 10.3390/ANI14182676.
- [67] L. Wang *et al.*, "Nitrogen Removal for Low Concentration Ammonium Wastewater by Adsorption, Shortcut Simultaneous Nitrification and Denitrification Process in MBBR," *Water* 2023, Vol. 15, Page 1334, vol. 15, no. 7, p. 1334, Mar. 2023, doi: 10.3390/W15071334.
- [68] P. R. Rout, R. R. Dash, P. Bhunia, and S. Rao, "Role of *Bacillus cereus* GS-5 strain on simultaneous nitrogen and phosphorous removal from domestic wastewater in an inventive single unit multi-layer packed bed bioreactor," *Bioresour Technol*, vol. 262, pp. 251–260, Aug. 2018, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2018.04.087.
- [69] E. Janka, S. Pathak, A. Rasti, S. Gyawali, and S. Wang, "Simultaneous Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification of Water after Sludge Dewatering in Two Sequential Moving Bed Biofilm Reactors (MBBR)," *Int J Environ Res Public Health*, vol. 19, no. 3, p. 1841, Feb. 2022, doi: 10.3390/IJERPH19031841.
- [70] Q. Li *et al.*, "Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification by *Bacillus* sp. L2: Mechanism of Denitrification and Strain Immobilization," *Water (Switzerland)*, vol. 16, no. 3, p. 416, Feb. 2024, doi: 10.3390/W16030416/S1.