



**UNIVERSIDAD ESTADAL
" PENÍNSULA DE SANTA ELENA "**
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

**"CARACTERIZACIÓN DE COMUNIDADES BACTERIANAS
EN SISTEMAS DE ENGORDE DE CAMARÓN MEDIANTE
ELECTROFORESIS EN GELES DE GRADIENTE
DENATURANTE (DGGE)"**

TESIS DE GRADO

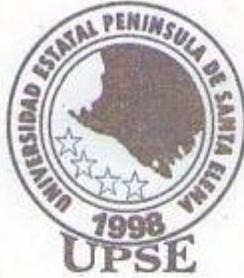
Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

MARTHA EDITH BORBOR SUÁREZ

LA LIBERTAD - ECUADOR

2006



**UNIVERSIDAD ESTATAL
" PENÍNSULA DE SANTA ELENA "**
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

**"CARACTERIZACIÓN DE COMUNIDADES BACTERIANAS
EN SISTEMAS DE ENGORDE DE CAMARÓN MEDIANTE
ELECTROFORESIS EN GELES DE GRADIENTE
DENATURANTE (DGGE)"**

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

MARTHA EDITH BORBOR SUÁREZ

LA LIBERTAD - ECUADOR

2006



UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

“Caracterización de Comunidades Bacterianas en sistemas de engorde de camarón mediante electroforesis en geles de gradiente denaturante (DGGE).”

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

MARTHA EDITH BORBOR SUÁREZ

LA LIBERTAD – ECUADOR

2006

DECLARACIÓN EXPRESA.

UNIVERSIDAD ESTATAL

PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

“Caracterización de Comunidades Bacterianas en sistemas de engorde de camarón mediante electroforesis en geles de gradiente denaturante (DGGE).”

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

MARTHA EDITH BORBOR SUÁREZ

LA LIBERTAD – ECUADOR

2006

DECLARACIÓN EXPRESA.

“La responsabilidad por los hechos, ideas y resultados expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, a la Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE) y a la Fundación CENAIM-ESPOL.”

A Dios

A mis padres:

Hernández María Esther Suárez

Edith Edith Suárez de Borbor

Martha Edith Borbor Suárez

CI: 091971931-0

DEDICATORIA

A Dios porque en el momento que estaba escribiendo esta tesis, Dios me permitió iluminar mi vida y ayudarme en cada momento a cumplir con forma la voluntad de mis padres que fueron y serán siempre.

A Dios

A mis padres y hermanos por haberme permitido crecer y ser quien soy hoy en día, por haberme enseñado y apoyado incondicionalmente. Siempre les agradeceré por haberme permitido

A mis padres:

Hermógenes Justo Borbor Soriano

Edith Elizabeth Suárez de Borbor

A los Directivos de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI) por haberme permitido ser parte de esta gran institución y por haberme permitido ser parte de esta gran institución.

Al personal de la Facultad de Ingeniería por haberme permitido ser parte de esta gran institución y por haberme permitido ser parte de esta gran institución.

Agradecer a los Autores de los Textos de los Principios de Ingeniería, en especial al Profesor Alejandro Noriega, por haberme permitido ser parte de esta gran institución y por haberme permitido ser parte de esta gran institución.

AGRADECIMIENTO

A Dios porque sin su bendición yo no podría continuar preparándome, gracias por iluminar mi vida y ayudarme en todo momento y también por darme la felicidad de tener padres tan buenos y especiales.

A mis padres y hermanos por todo su cariño, comprensión, paciencia, por sus sabios consejos y apoyo incondicional. Gracias por apoyarme en todo momento. Siempre los llevaré en mi corazón con admiración y respeto.

A los Directivos del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM-ESPOL) por la beca otorgada para mi participación en el programa de Tesis de Pregrado en el área de Microbiología Molecular de esta noble institución

Mi gratitud al M.Sc. Enrique Blacio Game, Coordinador de Asuntos Académicos en la Fundación CENAIM-ESPOL por permitirme participar en el desarrollo de esta tesis en tan prestigiosa institución.

Agradezco a las Autoridades de la Universidad Estatal Península de Santa Elena, en especial al Rector Abogado Xavier Tomalá Montenegro quien ha sabido liderar esté gran establecimiento, para la formación profesional de los Peninsulares.

Gracias al M.Sc. Ricardo Cedeño, por sus valiosos conocimientos compartidos, por las ideas y críticas constructivas en fin por su colaboración en el desarrollo de esta tesis. De igual manera al Biólogo Galo Valarezo por su guía en esta tesis.

A la Oc. Irma Betancourt, por su ayuda durante el procesamiento de las muestras de agua y sedimento, por su constante apoyo y por su amistad. De igual manera a la Ac. M. Sotomayor, al Ac. J. Melena, al Ac. P. Lombeida, a Paquita y Rosa, por el apoyo que me brindaron en la realización de esta tesis.

A los integrantes de los Laboratorios de Biología Molecular, Microbiología, Genética, Inmunología, Análisis Ambiental Químico y Húmedo del CENAIM, por facilitarme los diversos equipos para el procesamiento de las muestras.

Al Señor Álvaro Bonaguero Administrador de la camaronera OPUMARSA por su colaboración y por facilitarme el ingreso para coleccionar las muestras de agua y sedimento de las piscinas de engorde de camarón, necesarias para la realización de esta tesis.

A mis compañeros de Pregrado Maritza, Yomara, Jorge, Alfonso, Marcelo, y Francisco, por el apoyo que me brindaron de manera sincera y honesta. A Yessenia Pozo compañera y amiga, por los ratos de desahogo, buenos y malos que hemos pasado juntas. De igual manera a Alfonso, Rodrigo y William quienes me apoyaron de una u otra manera en la realización de esta tesis.

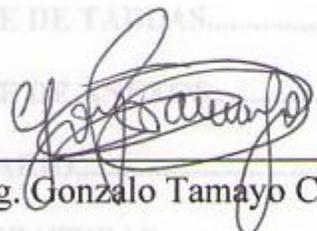
TRIBUNAL DE GRADO

INDICE GENERAL.....viii

INDICE DE FIGURAS.....xii

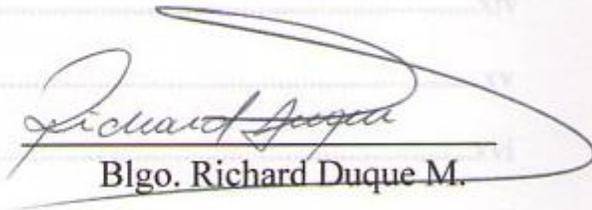
INDICE DE TABLAS.....xiv

INDICE DE ABREVIATURAS.....xvi



Ing. Gonzalo Tamayo C.

Decano de la Facultad



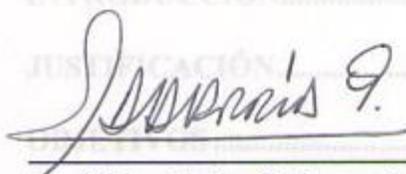
Blgo. Richard Duque M.

Director de Escuela

ABREVIATURAS.....xvi

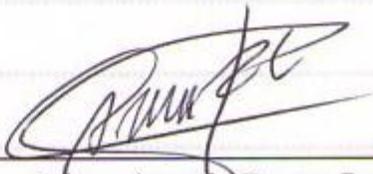
RESUMEN.....xvii

INTRODUCCIÓN.....1



Blga. Erika Salavarría P.

Tutor de Tesis



Blga. Angela Reyes L.

Docente del Área

JUSTIFICACIÓN.....5

OBJETIVO GENERAL.....7

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....7

HIPÓTESIS DEL TRABAJO.....8

1. COMUNIDADES BACTERIANAS: GENERALIDADES.....9



Ab. Pedro Reyes Láinez

Secretario General-Procurador

1.1. Ecología microbiana.....9

1.2. Microorganismos en sistemas acuáticos.....11

1.3. Interacciones patógeno - hospedador.....16

1.4. Genética Microbiana.....19

1.5. Técnicas para estudiar la diversidad microbiana.....22

ÍNDICE GENERAL

	Págs.
ÍNDICE GENERAL.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xv
GLOSARIO.....	xvi
ABREVIATURAS.....	xxi
RESUMEN.....	xxiv
INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN.....	5
OBJETIVOS.....	7
OBJETIVO GENERAL.....	7
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
HIPÓTESIS DEL TRABAJO.....	8
2. PROCEDIMIENTO EMPLEADO PARA LA CARACTERIZACIÓN DE COMUNIDADES BACTERIANAS	
1. COMUNIDADES BACTERIANAS: GENERALIDADES	
1.1. Ecología microbiana.....	9
1.2. Microorganismos en sistemas acuáticos.....	11
1.3. Interacciones patógeno – hospedador.....	16
1.4. Genética Microbiana.....	19
1.5. Técnicas para estudiar la diversidad microbiana.....	22

1.5.1. Técnicas de identificación basadas en Bioquímica.....	22
1.5.1.1. CLPP (Perfiles fisiológicos a nivel de comunidad).....	23
1.5.1.2. FAME (Análisis de los ésteres metilos ácidos grasos).....	23
1.5.2. Técnicas Inmunológicas.....	24
1.5.2.1. Dot – Blot.....	24
1.5.2.2. Colony – Blot.....	25
1.5.3. Métodos dependientes de cultivo o Método microbiológico clásico.....	25
1.5.3.1. Medios sólidos.....	28
1.5.3.2. Medios líquidos.....	30
1.5.4. Métodos Moleculares independientes de cultivo.....	31
1.5.4.1. PCR – Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	34
1.5.4.1.1. Técnicas derivadas de la PCR.....	37
1.5.4.2. DGGE.....	43
1.5.4.2.1. Aplicaciones del DGGE.....	46
1.5.5. Índices de diversidad.....	49

2. PROCEDIMIENTO EMPLEADO PARA LA CARACTERIZACIÓN DE COMUNIDADES BACTERIANAS

2.1. Área de estudio.....	52
2.2. Diseño Experimental y Tratamientos.....	52
2.3. Manejo del Experimento.....	54
2.3.1. Colecta de muestras.....	54
2.3.2. Extracción, Purificación y amplificación (PCR - 16S RNA) del DNA bacteriano.....	55

2.3.3. Electroforesis.....	61
2.3.3.1. Electroforesis en geles de agarosa.....	61
2.3.3.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	62
2.3.4. Tinción y documentación.....	63
2.3.5. Análisis de imagen.....	65
2.3.6. Índices de diversidad.....	65
2.3.6.1. Índice de Riqueza de Especies.....	65
2.3.6.2. Índice de Shannon – Weaver.....	66
2.3.6.3. Índice de Homogeneidad de Especies (evenness).....	66
2.3.7. Parámetros abióticos.....	67
2.3.8. Materia Orgánica Total (agua - sedimento).....	68
2.3.9. Sólidos Suspendidos Totales en Agua.....	70
2.4. Datos Evaluados.....	70

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LA DIVERSIDAD DE COMUNIDADES BACTERIANAS

3.1. Análisis Molecular-Resultados del DGGE.....	72
3.1.1. Extracción de DNA, Amplificación por PCR y Electroforesis en Geles de Agarosa.....	72
3.1.2. Electroforesis en Geles con Gradiente Denaturante (DGGE).....	73
3.1.2.1. Análisis de Imagen.....	76
3.1.3. Índices de Diversidad.....	78
3.1.3.1. Índice de Riqueza de Especies, Índice de Shannon Weaver, Índice de Homogeneidad de Especies en Agua y Sedimento.....	80

3.2. Parámetros Abióticos.....	91
3.2.1. Temperatura (°C).....	91
3.2.2. Salinidad (g. L ⁻¹).....	94
3.2.3. Oxígeno disuelto (mg. L ⁻¹).....	99
3.2.4. Potencial de Hidrógeno (pH).....	103
3.2.5 Sólidos Suspendedos Totales en Agua (mg. L ⁻¹)	107
3.2.6. Materia Orgánica Total.....	110
3.2.6.1. Materia Orgánica del Agua (mg. L ⁻¹).....	110
3.2.6.2. Materia Orgánica del Sedimento (%).....	114

CONCLUSIONES

RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

	Págs.
Figura 1	Forma de las bacterias.....12
Figura 2	Estructura celular de las bacterias.....13
Figura 3	Camarón <i>Litopenaeus vannamei</i> con lesiones visibles en el exoesqueleto.....18
Figura 4	Distribución de los microorganismos en Dominios: Bacteria, Arquea y Eucaria.....20
Figura 5	Desnaturalización del DNA. Los puentes de hidrógeno se rompen dejando al DNA en forma de cadena sencilla.....35
Figura 6	Alineamiento: Hibridación de las cadenas desnaturalizadas del DNA blanco con los iniciadores.....36
Figura 7	Extensión y conclusión de la PCR.....37
Figura 8	Pasos para la obtención de “huellas digitales” de comunidades microbianas por el método DGGE.....46
Figura 9	Electroforesis en gel de agarosa (2 %) del fragmento (16S rDNA) amplificado por PCR.....73
Figura 10	Gel de poliacrilamida con gradiente denaturante teñido con nitrato de plata.....74
Figura 11	Análisis de imagen (Gene Profiler 4.05).....76
Figura 12	Índices de diversidad en agua: Riqueza de Especies, Shannon Weaver y Homogeneidad de Especies durante los ciclos de cultivo de las piscinas # 15, # 20 y G-1.....84
Figura 13	Índices de diversidad en sedimento: Riqueza de Especies, Shannon Weaver y Homogeneidad de Especies durante los ciclos de cultivo de las piscinas # 15, # 20 y G-1.....85

Figura 14	Temperatura registrada para las piscinas # 15, # 20 y G-1 durante el ciclo de cultivo.....	93
Figura 15	Salinidad registrada durante el ciclo de cultivo para las piscinas # 15 y # 20.....	95
Figura 16	Salinidad registrada durante el ciclo de cultivo para la piscina G-1.....	96
Figura 17	Oxígeno disuelto del agua registrada durante el ciclo de cultivo para las piscinas # 15 y # 20.....	100
Figura 18	Oxígeno disuelto del agua registrada durante el ciclo de cultivo de la piscina G-1.....	101
Figura 19	Datos registrados de pH para las piscinas # 15 y # 20 durante el ciclo de cultivo.....	104
Figura 20	Datos registrados de pH para la piscina G-1 durante el ciclo de cultivo.....	104
Figura 21	Sólidos Suspendidos Totales (SST) para las piscinas # 15 y # 20 registrada durante el ciclo de cultivo.....	107
Figura 22	Sólidos Suspendidos Totales (SST) para la piscina G-1 registrada durante el ciclo de cultivo.....	107
Figura 23	Materia orgánica del agua (MOA) para las piscinas # 15 y # 20 registrada durante el ciclo de cultivo.....	111
Figura 24	Materia orgánica del agua (MOA) para la piscina G-1 registrada durante el ciclo de cultivo.....	111
Figura 25	Porcentaje de Materia orgánica del sedimento registrada durante el ciclo de cultivo para la piscina # 15.....	114
Figura 26	Porcentaje de Materia orgánica del sedimento registrada durante el ciclo de cultivo para la piscina # 20.....	114
Figura 27	Porcentaje de Materia orgánica del sedimento registrada durante el ciclo de cultivo para la piscina G-1.....	115

ÍNDICE DE TABLAS

	Págs.
Tabla # 1.	Concentraciones de la mezcla de PCR.....60
Tabla # 2.	Condiciones de amplificación para 16S rDNA bacteriano de las muestras de agua y sedimento.....61
Tabla # 3.	Pasos para la tinción con Nitrato de Plata.....64
Tabla # 4.	Registro de los Índices de Diversidad calculados para las muestras de agua, piscinas # 15, # 20 y G-1 durante el período de muestreo.....78
Tabla # 5.	Registro de los Índices de Diversidad calculados para las muestras de sedimento, piscinas # 15, # 20 y G-1 durante el período de muestreo.....79
Tabla # 6.	Índices de Diversidad calculados a partir de datos generados por DGGE.....80
Tabla # 7.	Registro de temperatura de las piscina # 15, # 20 y G-1 durante el período de muestreo.....91
Tabla # 8.	Registro de salinidad para las piscinas # 15, # 20 y G-1 durante el período de muestreo.....94
Tabla # 9.	Registro de oxígeno disuelto del agua para las piscinas # 15, # 20 y G-1 durante el período de muestreo.....98
Tabla # 10.	Registro de pH para las piscinas # 15, # 20 y G-1 durante el período de muestreo.....103
Tabla # 11.	Registro de Sólidos Suspendidos Totales (SST) durante el período de muestreo.....106
Tabla # 12.	Registro de materia orgánica del agua durante el período de muestreo.....109
Tabla # 13.	Registro de materia orgánica del sedimento durante el período de muestreo.....113

ÍNDICE DE ANEXOS

	Págs.
Anexo # 1.	Sistema Intensivo con invernadero: Piscina G-1 de la “Estación Experimental CENAIM”.....145
Anexo # 2.	Sistema Semi-intensivo abierto: Piscinas # 15 de la Camaronera “OPUMARSA”.....145
Anexo # 3.	Muestras de agua y de sedimento colectadas semanalmente en los sistemas de cultivo.....146
Anexo # 4.	Parámetros abióticos: Medición de pH junto a la toma de la muestra. Utilizando un equipo de mano pH testr2 “double junction” (OAKTON ® Instruments).....146
Anexo # 5.	Parámetros abióticos: Medición de salinidad junto a la toma de la muestra. Utilizando un refractómetro de mano marca ATAGO, Modelo 5 / Mill.....147
Anexo # 6.	Parámetros abióticos: Equipos utilizados para la determinación de Sólidos Suspendidos Totales y Materia Orgánica del Agua.....147
Anexo # 7.	Purificación del DNA bacteriano, utilizando el Sistema de Purificación (Wizard PCR Preps DNA Purification System – Promega ®).....148
Anexo # 8.	Amplificación (PCR – 16S RNA) del DNA bacteriano: Amplificación por PCR, utilizando el equipo PTC – 200 MJ Reseach ®.....148

GLOSARIO

Ácido desoxirribonucleico

Molécula compuesta de un anillo de desoxirribosa, una base nitrogenada y un grupo fosfato que en su conjunto forman una estructura de doble cadena tipo helicoidal. Constituye el material genético de todo tipo de células y virus de DNA, y tiene como función transmitir la información genética de una generación a otra.

Ácidos húmicos

Nombre genérico para una gran variedad de compuestos orgánicos, los cuales son productos de descomposición de la materia vegetal.

Ácido nucleico

Biomoléculas formadas por macropolímeros de nucleótidos, o polinucleótidos. Está presente en todas las células y constituye la base de la herencia que se transmite de una a otra generación. Existen dos tipos, el ácido desoxirribonucleico (DNA) y el ácido ribonucleico (RNA).

Bacteria

Organismo unicelular, microscópico, sin clorofila ni núcleo, pero con gránulos de cromatina dispersos en el protoplasma y provistos a veces de flagelos o cilios mediante los cuales se mueve en un medio líquido. Muchas de sus especies viven

en las aguas, dulces o marinas; abundan en sustancias orgánicas, en el sedimento y en materias orgánicas en putrefacción; otras son parásitas.

Electroforesis

Un método de separación de moléculas grandes (tales como fragmentos de DNA o proteínas) a partir de una mezcla de moléculas similares. Se pasa una corriente eléctrica a través de un medio conteniendo la mezcla y cada tipo de molécula viaja a través del medio a una tasa diferente, dependiendo de su carga eléctrica y del tamaño. La separación se basa en estas diferencias. Los geles de agarosa y de acrilamida son los medios comúnmente usados para la electroforesis de proteínas y ácidos nucleicos.

Enfermedad

Alteración o desviación del estado fisiológico en una o varias partes del cuerpo, por causas en general conocidas, manifestada por síntomas y signos característicos y cuya evolución es más o menos previsible.

Enzimas de restricción

Enzimas bacterianas sintetizadas como reacción defensiva frente a la invasión de DNA extraño, como, por ejemplo, bacteriófagos DNA, a los que degrada mientras que el propio está protegido por metilaciones específicas. Cada una de estas enzimas cortan el DNA siempre en el mismo sitio, en loci específicos o secuencias objetivo.

Factores ambientales

Diversos componentes del medio ambiente entre los cuales se desarrolla la vida en nuestro planeta. Dentro de sus componentes están los factores bióticos y factores abióticos.

Factores abióticos

Los caracterizados por la ausencia de vida; incluyen temperatura, humedad, pH y otros factores físicos y químicos.

Huella genética

Representación gráfica de determinadas secuencias del genoma que funcionan como un código de barras de la identidad de un individuo.

Iniciadores

Secuencias cortas de ácidos nucleicos, que complementan fragmentos específicos en el DNA, y que permiten el enganche e inicio de la copia de la hebra complementaria del DNA que se desea amplificar por PCR.

Kilobase (Kb)

Unidad empleada para medir la longitud de los fragmentos de DNA constituidos por una serie de bases. 1 Kb = 1.000 bases.

Marcador

Una localización física identificable sobre un cromosoma (p. e. sitios de corte de enzimas de restricción, genes) cuya herencia puede seguirse. Los marcadores pueden expresarse en regiones de DNA (genes) o en algunos segmentos de DNA sin una función conocida codificable, pero cuyo patrón de herencia puede determinarse.

Organismo

Entidad biológica capaz de reproducirse o de transferir material genético, incluyéndose dentro de este concepto a las entidades microbiológicas. Casi todo organismo está formado por células, que pueden agruparse en órganos, y éstos a su vez en sistemas, cada uno de los cuales realizan funciones específicas.

PCR

Reacción en cadena de la polimerasa: técnica de análisis del genoma mediante la amplificación de porciones específicas del DNA, aunque sean minúsculas. Es un método revolucionario de amplificación exponencial del DNA por la intervención de una enzima termoestable, la Taq polimerasa, inventado por el americano Kary Mullis en 1985 por lo que se le concedió en 1993 el premio Nobel. Es el proceso fundamental para la secuenciación del Proyecto Genoma Humano.

pH (Potencial de hidrógeno)

Se utiliza para designar la concentración de iones hidrógeno en una solución, en éste caso en el agua. Viene definido como el número resultante de realizar la operación $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$ siendo $[\text{H}^+]$ la concentración de iones hidrógeno.

Procariota

Organismo unicelular cuyas células poseen un núcleo primitivo. Son organismos procariotas las bacterias (dominio Bacteria) y los organismos del dominio Arquea.

“Quorum Sensing”

Es un nuevo concepto que explica la relación que existe entre los microorganismos y las maneras de cómo ellos se comunican. Las bacterias parecen capaces de reconocer la presencia de otros organismos de las mismas especies en el ambiente, en respuesta, ellos pueden regular la expresión de ciertos genes tales como aquellos involucrados en la luminiscencia. Además de la luminiscencia se producen antibióticos, exopolisacaridos, proteasas extracelulares y virulencias asociadas a proteínas en respuesta a las señales moleculares. Quorum Sensing puede dar una primicia de un buen entendimiento de las infecciones bacterianas.

ABREVIATURAS

A	Adenina
AP-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores al azar
AFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados
AgNO ₃	Nitrato de Plata
ANOVA	Análisis de varianza
ARISA	Análisis automatizado de los espacios intergénicos ribosomales
ARDRA	Análisis de restricción del DNA ribosomal amplificado
bp	Pares de bases
C	Citocina
CLPP	Perfiles fisiológicos a nivel de comunidad
cm	Centímetro
CTAB	Cetyl trimethyl ammonium bromide
ddH ₂ O	Agua doblemente destilada
DGGE	Electroforesis en geles de gradiente denaturante
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
EDTA	Ácido Etilen Diamino Tetra acético
FAME	Análisis de los ésteres metilos ácidos grasos
FISH	Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia
G	Guanina
GC	Cromatografía de gas

g	Gramo
h	Horas
Ha	Hectárea
Kb	Kilobase
L	Litro
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
M	Molar
mg	Miligramo
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MOA	Materia Orgánica del Agua
MOS	Materia Orgánica del Sedimento
Na OH	Hidróxido de sodio
Na CO ₃	Carbonato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
°C	Grados Celsius
OD	Oxígeno disuelto
pH	Potencial de hidrógeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction).

®	Marca registrada
RAPD	Amplificación al azar de fragmentos polimórficos de DNA
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
RISA	Análisis de los espacios intergénicos ribosomales
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
SST	Sólidos Suspendidos Totales
TAE	Tampón tris acetato EDTA
TSA	Triptona Soya Agar (Tryptic Soy Agar)
TCBS	Agar tiosulfato citrato sales biliares (Thiosulfate Citrate Bile Salts Agar)
TSB	Triptona Soya Caldo (Tryptic Soy Broth)
TGGE	Electroforesis en geles de gradiente de temperatura
T	Timina
T – RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal
μl	Microlitro
μg	Microgramo
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
UPGMA	Análisis de Agrupamientos por ligamiento promedio
w / v	Peso / volumen
16S rRNA	Subunidad 16S del RNA ribosómico

RESUMEN

Se estudió la diversidad de las comunidades microbianas en agua y sedimento de las piscinas # 15 y # 20 de la camaronera OPUMARSA (Sistema semi- intensivo abierto) y en la piscina G-1 de la Estación Experimental de CENAIM (Sistema intensivo con invernadero).

Cada piscina fue muestreada semanalmente durante 17 semanas. Las muestras de agua se tomaron a media columna de agua y el sedimento a 5 cm de profundidad. En el laboratorio se realizó la extracción, purificación y amplificación del DNA bacteriano (PCR – 16S RNA) de las muestras de agua y sedimento. El producto de la PCR se separó electroforéticamente por DGGE, geles de poliacrilamida (6 %), los geles fueron teñidos con tinción de plata y fotografiados con una cámara digital. Las imágenes en formato TIFF se procesaron mediante el programa “Adobe Photo Shop” y “Gene Profiler”, considerando las bandas visibles claras y definidas (representadas en un mínimo del 5 % de intensidad total en la línea analizada).

Se utilizó la técnica de Electroforesis en Geles de Gradiente Denaturante (DGGE) para comparar la comunidad microbiana de agua y sedimento tomadas en la misma piscina durante 17 muestreos correspondientes a un ciclo de cultivo. Cada una de las muestras dió una compleja impresión digital compuesta de un gran número de bandas.

A partir de los geles de DGGE se establecieron índices de diversidad según la presencia, ausencia e intensidad de bandas, se aplicaron: índice de Riqueza de Especies, índice de Shannon Weaver e índice de Homogeneidad de Especies (Evenness). Adicionalmente se registraron parámetros como temperatura, salinidad, pH, oxígeno disuelto en el agua, SST, MOA y MOS. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para detectar diferencias entre los dos sistemas de cultivo. Cuando se encontraron diferencias significativas entre tratamientos se aplicó el test de contraste de Scheffé a un nivel de significancia $\alpha = 0,05$.

Los resultados obtenidos en los índices de diversidad, indicaron que existe mayor Riqueza de Especies en el sistema semi-intensivo tanto en agua como en sedimento. El índice de Shannon Weaver presenta una variación para ambos sistemas reflejado porque una o varias especies dominaron en los muestreos durante el desarrollo del ciclo del cultivo de *Penaeus vannamei*, sin embargo se observa que el sistema semi-intensivo presenta un valor más alto al compararlo con el sistema intensivo, lo que se refleja en los resultados del índice de Homogeneidad de Especies (Evenness) donde se aprecia una mayor homogeneidad, posiblemente por ser un sistema semi-intensivo (menor número de organismos cultivados por metro cuadrado) aunque las condiciones de la piscina dependen de las variaciones ambientales al parecer las comunidades microbianas se encuentran mejor adaptadas.

El DGGE reveló una comunidad diferente para cada una de las piscinas y tipos de muestras. En conclusión el método del DGGE describe y provee una visión detallada y razonable de las comunidades bacterianas de los sistemas de cultivo.

Nuestros resultados indican que el análisis basado en índices de diversidad a partir de DGGE, puede revelar efectivamente la composición de las comunidades microbianas y reflejar el efecto de las condiciones ambientales sobre la diversidad pues estos pueden influir sobre determinados procesos realizados por las comunidades microbianas durante el ciclo del cultivo del camarón *Penaeus vannamei*.

INTRODUCCIÓN

Al final de la década de los sesenta se inició la industria camaronera en el Ecuador y con ello nació una de las industrias de mayor crecimiento y tecnificación en nuestro país. Según Marriot (2003), la producción de camarón puede realizarse en varios tipos de cultivo, que van desde extensivo a ultraintensivo, siendo los más utilizados los sistemas extensivos, semi-intensivos e intensivos (Cámara de Productores de Camarón, 1993).

Los sistemas de cultivos intensivos, semi-intensivos y extensivos presentan un ambiente dinámico compuesto de interacciones entre camarón, materia orgánica, fitoplancton, bacterias, parámetros biológicos y ambientales (López, 2004). Estos parámetros ambientales se encargan de regular la distribución de las poblaciones bacterianas en los sistemas acuáticos (Muylaert et al., 2002). Según López (2004), a medida que se intensifica un cultivo, el equilibrio entre los diferentes componentes del ecosistema desaparece presentándose condiciones inestables que pueden causar impacto sobre la salud y supervivencia del camarón. Los estanques de camarón son caldos microbianos donde microorganismos perjudiciales e inoocuos compiten unos con otros por los nutrientes disueltos y suspendidos que provienen del alimento no ingerido y de las heces del camarón.

Hasta hoy a nivel mundial han sido reportados un número considerable de enfermedades de naturaleza infecciosa y no infecciosa, encontrándose dentro del

primer grupo las de etiología viral y bacteriana (Álvarez et al., 2003). Estas infecciones causadas por *Vibrio* y Virus han ido devastando la producción de camarón alrededor del mundo desde la década del noventa.

Entre los agentes patógenos bacterianos se encuentran algunas especies como *Vibrio harveyi*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, estos han sido frecuentemente asociados a mortalidades siendo responsables de grandes pérdidas económicas tanto en larvicultura como engorde (Gullian, 2001). Estas especies de *Vibrio* son consideradas oportunistas que con cambios ambientales favorables pueden producir focos de infección (López, 2004). Así por ejemplo en la especie *Penaeus stylirostris* el *Vibrio peneicida* es una bacteria altamente patógena capaz de causar mortalidades masivas en pocos días, pero esta patogenicidad se manifiesta sólo durante los períodos de cambio de temperatura y salinidad (Sotomayor, 2000).

Con el fin de prevenir o controlar la aparición de enfermedades en los camarones, éstas deben ser reconocidas desde su inicio (Álvarez et al., 2003). Los métodos de detección de patógenos incluyen técnicas tradicionales de bacteriología, virología, micología e histología, y técnicas basadas en la biología molecular, tales como la hibridación *in situ* y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En la actualidad se conoce que la aplicación de técnicas tradicionales de bacteriología como el aislamiento, cultivo y la identificación microscópica no son

suficientes para evaluar la diversidad de las comunidades bacterianas (Ranjard et al., 2000). Se conoce que más del 90 % de los microorganismos en los ambientes naturales no pueden ser cultivados usando las técnicas tradicionales (Díaz,2003).

Los nuevos avances en las técnicas moleculares han complementado las técnicas microbiológicas, utilizando para ello secuencias genéticas como marcadores moleculares para describir las comunidades bacterianas. Estas técnicas moleculares se caracterizan por ser rápidas y capaces de proveer un perfil que representa la diversidad genética de una comunidad microbiana de un ambiente específico, venciendo los problemas asociados a los cultivos en medios selectivos y el aislamiento de bacterias (Ercolini, 2004). Entre los métodos moleculares basados en DNA se pueden mencionar: el RFLP (Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción), RAPD (Amplificación al azar de fragmentos polimórficos de DNA), AFLP (Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados) (Díaz, 2003). Kirk et al. (2004), además mencionan otros métodos como son: DGGE (Electroforesis en geles con gradiente denaturante), TGGE (Electroforesis en geles con gradiente de temperatura), RISA (Análisis de los espacios intergénicos ribosomales) y ARISA (Análisis automatizado de los espacios intergénicos ribosomales).

La electroforesis en geles con gradiente denaturante (DGGE) permite una rápida detección de cambios de hasta una sola base en fragmentos de DNA. La técnica se basa en la migración de moléculas de DNA a través de geles de poliacrilamida

que contienen concentraciones crecientes de agentes desnaturalizantes (usualmente urea y formamida) (Schwieger and Tebbe, 1998). Esta técnica se desarrolló para detectar mutaciones puntuales en las secuencias del DNA (Kirk et al., 2004). Desde la introducción de esta técnica en la ecología microbiana por Muyzer et al. (1993), ha sido adaptada en muchos laboratorios como un instrumento para valorar la diversidad microbiana en muestras ambientales (Schafer and Muyzer, 2001). El DGGE se basa en el análisis de la información genética de las bacterias sin cultivar (Rombaut et al., 2001), el DNA es extraído de las muestras y amplificado por PCR con iniciadores específicos para el 16S rDNA bacteriano (Cytryn et al., 2003). Posteriormente la electroforesis de los productos amplificados permite separar los fragmentos de DNA de un mismo tamaño en base a su punto de fusión el cual es dependiente de la secuencia de los fragmentos (Ercolini, 2004; Ranjard et al., 2000).

La electroforesis, genera unos perfiles característicos aptos para estimar la diversidad y similitud entre los organismos de distintos ambientes. Cuanto mayor es el número de bandas, mayor es la diversidad (Atlas y Bartha, 2002). La diversidad microbiana puede describirse mediante algunos índices, basados en análisis moleculares que muestran la heterogeneidad genética de la comunidad.

JUSTIFICACIÓN

La comparación de las comunidades bacterianas en el medio ambiente acuático ha sido investigada por varios años utilizando técnicas como el aislamiento, cultivo y la identificación microscópica, pero estas técnicas han sido reconocidas como inadecuadas, porque muchos microorganismos no pueden ser cultivados en los medios disponibles ni con los métodos usados en laboratorio. Según Suzuki et al. (1997), las células bacterianas obtenidas a partir de técnicas tradicionales de cultivo representan una baja proporción de las poblaciones microbianas presentes en el ambiente natural.

Ante la necesidad urgente de evaluar las comunidades microbianas complejas sin la utilización de pasos previos de cultivo, se evaluaron métodos moleculares, como la electroforesis en geles de gradiente denaturante (DGGE), abriendo con esto nuevas posibilidades en ecología microbiana, ya que esta técnica revela una extraordinaria diversidad de microorganismos, permitiendo identificar y comparar la diversidad microbiana de diferentes ambientes, y estudiar cambios temporales o espaciales en su composición.

La electroforesis en geles de gradiente denaturante (DGGE) es una técnica que permite separar los fragmentos de DNA que son de un mismo tamaño pero de diferentes secuencias, puede ser utilizado para estudiar la diversidad microbiana y abundancia relativa en hábitat naturales (Pintado et al., 2003). Permite además

estudios más directos y una rápida comparación visual de varias muestras en tiempo y espacio de la estructura genética de comunidades microbianas (Rønn et al., 2002), puede ser aplicado para procesar numerosas muestras y no requiere pasos específicos de PCR para cada organismo (Pintado et al., 2003). Finalmente a partir de los perfiles que se obtienen con la técnica del DGGE, se pueden estimar diversos índices de diversidad, los que permiten establecer diferencias entre las comunidades microbianas y a su vez relacionarlas con los cambios ecológicos y cambios ambientales.

Objetivos Específicos

Los resultados de este estudio pueden ser utilizados para: futuras comparaciones de la diversidad microbiana presente en sistemas de engorde de camarón, determinar problemas ecológicos que se presenten durante el desarrollo del ciclo del cultivo, determinar bacterias patógenas que en cierto momento pueden causar enfermedades o simplemente para diferenciar la composición filogenética microbiana.

HIPÓTESIS DEL TRABAJO

Si se caracteriza las comunidades bacterianas en los sistemas de cultivo por la Técnica de Electroforesis en Geles de Gradiente Denaturante (DGGE), se estimará la diversidad y similitud existente entre los sistemas y se dará a la vez una visión del comportamiento de las comunidades bacterianas durante su ciclo de cultivo.

1. COMUNIDADES BACTERIANAS: GENERALIDADES

1.1. Ecología microbiana

La Ecología Microbiana se desarrolla como un área de especialización dentro del campo de la microbiología a partir de la década del sesenta. Para esa época el hombre reconoce el rol esencial que desempeñan los microorganismos en procesos que regulan o afectan la homeostasis en un ecosistema como el reciclaje de nutrientes, la biodegradación de contaminantes y la biomagnificación de materiales tóxicos (Fuentes, 2002).

La ecología microbiana trata fenómenos y procesos naturales, interacciones entre microorganismos, con otras especies y con el medio. El conocimiento que proporciona ofrece vías para responder y hallar soluciones a muchos de los problemas más acuciantes a los que se enfrentan las sociedades humanas modernas y permite un mejor entendimiento de los principios fundamentales que rigen la estructura y función de ecosistemas acuáticos, marinos y terrestres (Fuentes, 2002).

Atlas y Bartha (2002), indicaron que la ecología microbiana tiene tres objetivos principales con respecto al entendimiento del papel de los microorganismos en su hábitat natural:

1. Definir la dinámica poblacional en las comunidades.
2. Definir las características físico – químicas de los microambientes y
3. Comprender los procesos metabólicos realizados por microorganismos en un hábitat determinado.

1.2. Microorganismos en sistemas acuáticos

Los microorganismos ocupan una posición clave en el flujo ordenado de material y energía a través del ecosistema global, en virtud de sus capacidades metabólicas para transformar las sustancias orgánicas e inorgánicas. Al mismo tiempo, los microorganismos han sido cruciales para resolver algunos de nuestros problemas ambientales y económicos: nos han ayudado a eliminar residuos líquidos y sólidos de una manera prudente y eficaz, a aliviar la escasez de abonos nitrogenados, a recuperar metales de yacimientos de bajo rendimiento, a controlar biológicamente las plagas y a producir alimentos, piensos y combustible a partir de subproductos y materiales de desecho.

Es muy probable que las interacciones entre poblaciones que conducen al establecimiento de una comunidad definida, se basen principalmente en las interacciones fisiológicas entre las distintas poblaciones. Así la estabilidad en un ecosistema a menudo se da cuando diversas poblaciones que interaccionan cooperan para explotar mejor los recursos disponibles.

El crecimiento se divide a su vez en crecimiento primario y secundario. Entre los principales organismos productores de materia orgánica en los hábitats acuáticos y terrestres, los microorganismos juegan un papel crucial.

Si las condiciones ambientales son estables, los organismos que no ocupan con éxito un nicho o que no cumplen un papel funcional tienden a ser eliminados de la comunidad (Atlas y Bartha, 2002).

1.2. Microorganismos en sistemas acuáticos

En todos los hábitats acuáticos nosotros podemos establecer tres comunidades de microorganismos: plancton, necton y bentos.

El plancton está formado por organismos que se encuentran a la deriva, incapaces de moverse frente a corrientes predominantes, presentan diversos tamaños, lo que es muy útil para clasificarlos dentro de la cadena trófica planctónica. Barnes y Mann (1991), establecieron el tamaño de microorganismos como herramienta de clasificación:

20 – 200 μm , contiene a la mayor parte de diatomeas y se denomina microplancton.

2,0 – 20 μm , contiene a todos los flagelados y se denomina nanoplancton.

0,2 – 2 μm , denominados picoplancton.

El picoplancton se divide a su vez en organismos procarióticos como eucarióticos. Entre los procariotes (organismos desprovistos de núcleo), encontramos tanto heterótrofos (bacterias y arqueas), como fototrófos (cianobacterias).

Las bacterias son organismos unicelulares formados por una única célula, carentes de un típico núcleo organizado. Poseen formas distintas que permiten su clasificación en: Cocos, Bacilos y Espirilos. Figura # 1.

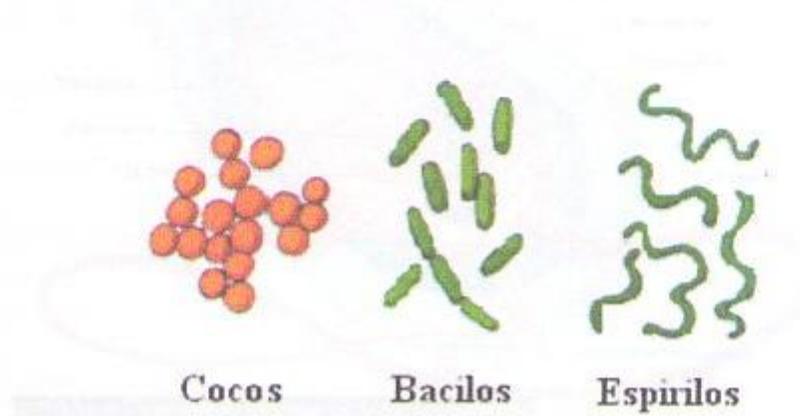
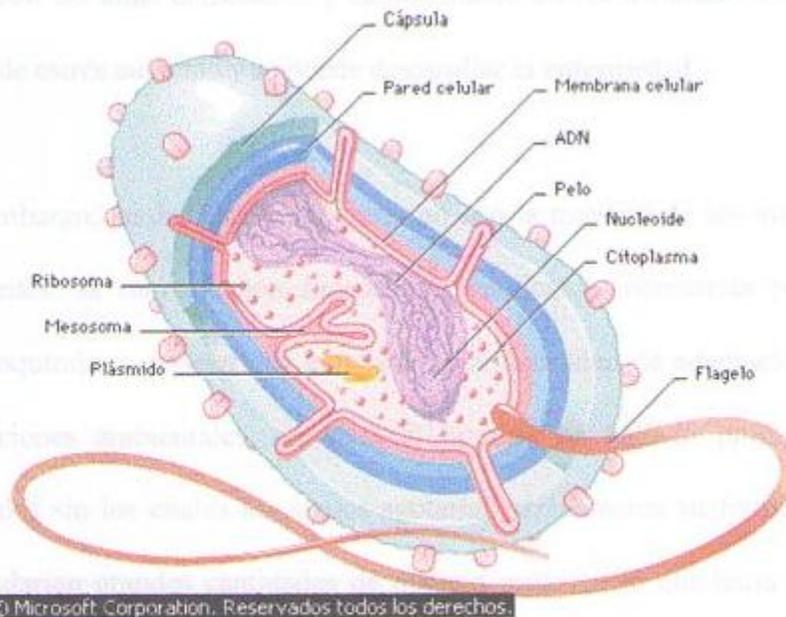


Fig. # 1. Forma de las bacterias.

Fuente: Environmental Microbiology, por Maier et al. (2000).

Pueden desplazarse utilizando cilios o flagelos y están provistos de una pared celular. (Figura # 2) Las bacterias son un grupo diverso de microorganismos que viven libre, en asociaciones con partículas o en el sedimento de piscinas camaroneras, algunas presentan un metabolismo autótrofo (obteniendo su energía de las reacciones químicas o bien aprovechando la energía solar de un modo similar a como lo hacen las plantas) y otras son heterótrofas, lo que significa que obtienen la materia necesaria a expensas de vegetales o animales, por lo que originan frecuentemente diversas enfermedades (Bacterias patógenas).



© Microsoft Corporation. Reservados todos los derechos.

Fig. # 2. Estructura celular de las bacterias.

Fuente: Biblioteca de Consulta Microsoft[®], por Microsoft Corporation (2005).

Las bacterias son consideradas patógenos oportunistas y facultativos, causantes de serias enfermedades en camarones cultivados tales como vibriosis sistémica y necrosis hepatopancreática (Teunissen et al., 1998).

Una enfermedad infecciosa no es sólo causada por la presencia de bacterias o virus, de hecho, la presencia de estos no necesariamente significa que el animal está enfermo o sufriendo de una enfermedad, muchas enfermedades de camarones y peces son una combinación de malas condiciones ambientales, que pueden dañar al animal o reducir su capacidad para combatir la enfermedad. En condiciones naturales los animales muchas veces resisten bien a los patógenos,

pero con las altas densidades y hacinamiento en las instalaciones de cultivo, el nivel de estrés aumenta y se puede desarrollar la enfermedad.

Sin embargo, las bacterias patógenas no son la mayoría de los microorganismos existentes, la mayoría son inocuas o benéficas y necesarias para los ciclos biogeoquímicos, poseen una extraordinaria capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales, en ellas el hombre ha hallado prodigiosos aliados naturales sin los cuales los suelos agotarían rápidamente su fertilidad, las aguas acumularían grandes cantidades de materia orgánica lo que haría inadecuada su utilización y el suelo encerraría inútilmente enormes reservas de elementos indispensables a la vida humana y animal.

Algunos microorganismos benéficos se utilizan como biofertilizantes desde hace más de cien años o como promotores de crecimiento de plantas; otras bacterias sirven como probióticos en humanos y animales, son usados en biorremediación o la producción de vitaminas y compuestos farmacéuticos. También son responsables de la fermentación de bebidas alcohólicas y de diversos alimentos.

Los microorganismos juegan un rol muy importante en los estanques de cultivo, particularmente con respecto a la productividad, ciclo de nutrientes, la nutrición de los animales cultivados, calidad del agua, control de enfermedades y control de impactos ambientales en los efluentes. La actividad de los microorganismos en la

cadena alimenticia y ciclo de nutrientes de los estanques optimiza la producción, pero esta actividad puede diferir según el tipo de cultivo y especies cultivadas.

Las bacterias adquieren de la materia orgánica, los nutrientes inorgánicos y orgánicos necesarios para su crecimiento y a través de la respiración aeróbica remueven oxígeno disuelto y liberan dióxido de carbono, amonio y otras sustancias minerales (Monserrate, 2003). Estas bacterias se encuentran por encima de protozoarios y algunos metazoarios y como tal forman la base de la cadena alimenticia acuática heterotrófica (Muylaert et al., 2002).

Según Moriarty (1997), La cadena alimenticia microbiana tiene un impacto directo en la productividad debido a tres razones:

- 1 Junto con las algas regulan el contenido del oxígeno: las algas producen oxígeno durante el día y las bacterias la consumen por la respiración.
- 2 Sirven como alimento directo a las distintas especies de cultivo.
- 3 A través de la descomposición heterotrófica, reciclan el nitrógeno y el fósforo estimulando la producción primaria.

Los géneros de bacterias predominantes en ambientes acuáticos marinos son el género *Vibrio*, especies como *el Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus*, y los géneros *Aeromonas* y *Pseudomonas*. Estas especies se encuentran en medio marino y en ecosistemas estuarinos, sea en agua y sedimento

o formando parte de la flora intestinal de los camarones (Gómez et al., 1998; Sung et al., 1999).

1.3. Interacciones patógeno – hospedador

Las bacterias marinas se encuentran entre los principales agentes etiológicos en crustáceos marinos capturados del medio natural o cultivados.

La familia Vibrionaceae, principalmente el género *Vibrio*, son bacterias Gram negativas y usualmente constituyen la mayor parte de la microbiota normal en los cultivos de camarones penaeidos, aunque también son importantes para los crustáceos marinos las bacterias Gram positivas (Costa et al., 1998).

Los *Vibrios* son los agentes bacterianos más importantes conocidos y han sido implicados como causantes de enfermedades y mortalidades en penaeidos cultivados en todos los estadios larvarios, post larvas, juveniles, sub adultos y adultos (Rojlorsakul et al., 1998). La vibriosis ocurre cuando el hospedador marino es afectado y sus mecanismos de defensa no están capacitados para prevenir la entrada de las bacterias ni para impedir la multiplicación bacteriana una vez que los organismos han invadido al hospedador.

La capacidad infecciosa de las bacterias patógenas radica en que poseen la información genética necesaria para colonizar los tejidos de un hospedador,

invadirlos y/o producir sustancias tóxicas que en definitiva causarán la enfermedad.

Algunos investigadores afirman que los *Vibrios* se convierten en patógenos oportunistas cuando las condiciones de cultivo favorecen su crecimiento, tal es el caso de bacterias inocuas que pueden volverse dañinas cuando las condiciones del medio favorecen su propagación excesiva (Siavichay, 1997).

Entre las especies bacterianas pertenecientes al género *Vibrio* e implicadas como agentes causantes de infecciones y enfermedades en camarones penaeidos encontramos: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio splendidus*, *Vibrio vulnificus*. (Costa et al., 1998).

Según Costa et al. (1998), las infecciones bacterianas en camarones puede presentarse de varias formas:

- Manchas localizadas en la cutícula.
- Infecciones localizadas en el intestino o hepatopáncreas o infecciones localizadas en las lesiones.
- Septicemia generalizada, que resulta de la penetración de las bacterias a través de la cutícula o el epitelio digestivo.

Según Parra (2001), las infecciones se caracterizan por erosiones pigmentadas en cutícula, localizándose en el telson y apéndices locomotores, anorexia, necrosis en cavidad bucal, letargia, además se observan los urópodos y pleópodos mutilados. Los signos y las lesiones que se presentan, incluyen letargia y debilidad, conducta hiperactiva antes de gran inactividad, desorientación en el nado, reclinación sobre el lado dorsal, ventral o lateral, flexión continua de los pleópodos y periópodos.

Figura # 3.



Fig. # 3 Camarón *Litopenaeus vannamei* con lesiones visibles en el exoesqueleto.

Fuente: Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology, por Thomas et al. (1998).

No se conocen los factores ambientales que causan la presencia y abundancia de determinado tipo de bacterias. Sin embargo bacterias Gram negativas tienen la capacidad de comunicarse entre células utilizando señales químicas que inducen la producción de factores con poder infeccioso para plantas o animales (quorum sensing) (Gram et al., 2002).

1.4. Genética Microbiana

Gregor Mendel (1823-1884) estableció los fundamentos de la genética moderna, realizando experimentos con plantas y estudiando las leyes básicas que controlan la herencia, llegando a la conclusión de que los rasgos o características hereditarias son transportados y transmitidos a los descendientes como unidades discretas, originando el concepto de gen (Rozalén et al., 2003). Así, el análisis y comparación de secuencias de aminoácidos de proteínas o la comparación de las secuencias nucleotídicas de genes permiten no solo identificar, sino clasificar y tratar de establecer las relaciones filogenéticas entre organismos o microorganismos.

Las secuencias del gen del RNA de la pequeña subunidad del ribosoma (SSU rRNA o 16S en bacterias) obtenidos por Woese y colaboradores son los más extensos que existen para un solo gen y abarcan todo tipo de organismos excepto virus, que carecen de estos genes por no poseer una maquinaria propia para la síntesis de proteínas.

Este gen ribosomal consta de aproximadamente 1500 bases o letras (A, T, C, G) que pueden variar en cada posición del gen y cada especie tiene una secuencia propia y característica de este gen y así con base en la secuencia del SSU y rRNA se puede establecer el árbol evolutivo de la vida, basado en homologías del RNA ribosómico 16S. El árbol evolutivo indica que tres líneas evolutivas (dominios)

divergieron de un estado común ancestral para formar los dominios Arquea (Arqueobacterias), Bacteria (Eubacterias) y Eucaria (Eucariotes) (Woese et al., 1990). Figura # 4.

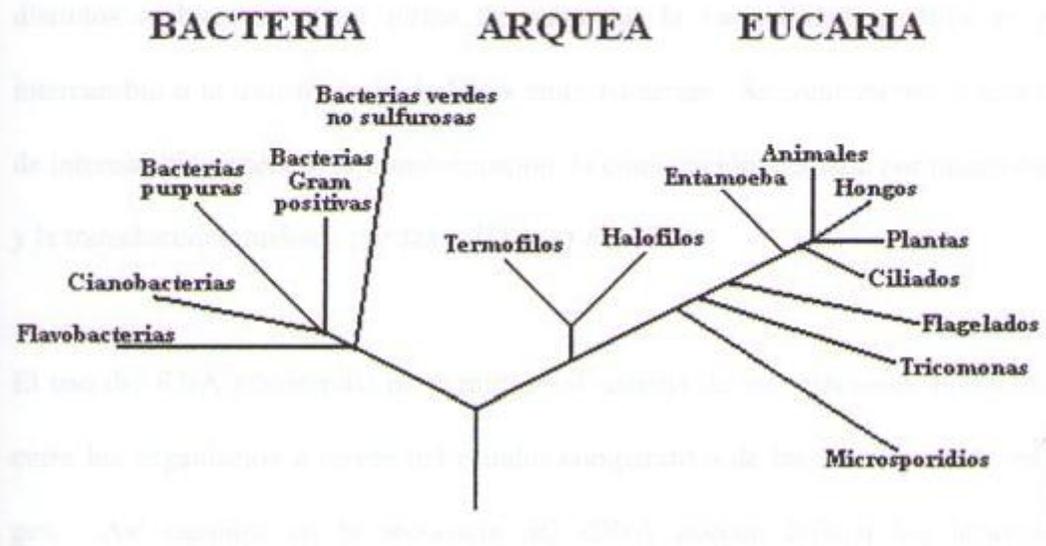


Fig. # 4 Distribución de los microorganismos en Dominios: Bacteria, Arquea y Eucaria.

Fuente: Proceedings of the national academy of science of the USA, descrito por Woese et al. (1990).

Cada especie viva posee en su estructura celular la información necesaria para transmitir a sus descendientes caracteres especiales, que se conocen como hereditarios, o sea, que se heredan de los progenitores (Díez et al., 2001).

En general las bacterias no poseen núcleo organizado pero este puede replicarse dando lugar a copias idénticas y transcribirse a RNA. La información codificada en forma de RNA puede a su vez ser traducida a una secuencia de aminoácidos que forman una proteína.

Las bacterias poseen una enorme capacidad de adaptación al ambiente, reflejo de su gran variabilidad genética. Esto es debido, a que el DNA puede cambiar o mutar. Algunas mutaciones pueden ser letales para la bacteria, y otras pueden proporcionarle nuevas características y posibilidades de supervivencia en los distintos ambientes. Otra forma de aumentar la variabilidad genética es el intercambio o la transferencia de DNA entre bacterias. Se conocen tres sistemas de intercambio genético: la transformación, la conjugación mediada por plásmidos y la transducción mediada por fagos (Díaz et al., 1999).

1.5.1. Diversidad genética de los organismos bacterianos

El uso del RNA ribosómico ha permitido el análisis de las relaciones evolutivas entre los organismos a través del estudio comparativo de las secuencias de este gen. Así cambios en la secuencia del rDNA pueden reflejar las historias evolutivas de los diferentes organismos. Los RNA ribosómicos han sido los cronómetros moleculares más utilizados (Woese 1987) ya que están presentes en todas las células vivas, e incluyen ciertas zonas muy conservadas en todos los organismos (Díez et al., 2001).

1.5.1. Técnicas de identificación basadas en Woese

En particular la subunidad 16S rRNA ribosómica de las bacterias, es una molécula suficientemente grande como para proporcionar un número significativo de nucleótidos que permiten la separación de secuencias. Woese et al. (1992), alegaron que los 16S rRNA son unos excelentes cronómetros moleculares debido a que:

1. Las características moleculares de los genes de los organismos bacterianos son similares entre los organismos bacterianos.

- Se encuentran universalmente en todos los organismos.
- Poseen grandes regiones muy conservadas, útiles para establecer relaciones filogenéticas lejanas.
- Presentan suficientes regiones variables para evaluar relaciones próximas.
- No son susceptibles de cambios de secuencia rápida por selección, dada su función central en la expresión genética.

Los perfiles del gen 16S rRNA proveen una información útil acerca de la diversidad relativa de las comunidades microbianas complejas.

1.5. Técnicas para estudiar la diversidad microbiana

La elección de una u otra técnica para cada estudio está condicionada por la disponibilidad de los medios y por el tiempo requerido en cada una de ellas, así entre las principales metodologías se pueden destacar:

1.5.1. Técnicas de identificación basadas en Bioquímica

Implican la siembra de bacterias, previamente aisladas, en los diferentes medios y la lectura de cada reacción específica para el criterio bioquímico evaluado (Néder, 1989; San Miguel, 1996). Se utiliza para estudiar la diversidad microbiana en base a sus características metabólicas, mediante lecturas diferenciables entre los aislados bacterianos.

Dentro de las técnicas más utilizadas se puede mencionar:

1.5.1.1. CLPP - Perfiles fisiológicos a nivel de comunidad (Community level physiological profiling, siglas en ingles)

Permite diferenciar comunidades microbianas, es un método relativamente fácil de usar, reproducible y produce una gran cantidad de datos que reflejan las características metabólicas de una comunidad (Kirk et al., 2004).

Entre sus limitaciones se puede mencionar: selectividad para microorganismos cultivables capaces de crecer bajo condiciones experimentales; sensitivo para grandes densidades y refleja el potencial de la diversidad metabólica más no el sitio de diversidad.

1.5.1.2. FAME - Análisis de los ésteres metilos ácidos grasos (Fatty acid methyl ester analysis, siglas en ingles)

Se basa en la extracción de ácidos grasos directamente de la muestra, metilizando y analizando posteriormente por cromatografía de gas (GC), luego compara los diferentes perfiles (FAME) usando análisis multivariados para proveer información de la composición de la comunidad microbiana.

El problema de este método es que puede ser afectado por factores externos tales como temperatura, nutrición y la posibilidad de confundir los perfiles FAME existentes entre los microorganismos (Kirk et al., 2004).

1.5.2. Técnicas Inmunológicas

Se basan en la utilización de anticuerpos policlonales o monoclonales que identifican y reaccionan en forma específica con un epítipo del antígeno contra el que fueron elaborados, formándose un complejo antígeno – anticuerpo que puede ser visualizado posteriormente.

Se destacan las siguientes técnicas:

1.5.2.1. Dot – Blot

Es una técnica que se utiliza para la detección específica de bacterias previamente aisladas usando anticuerpos. Es fácilmente aplicable al campo práctico ya que es un método sensible, específico y rápido; se obtienen resultados entre 4 – 5 horas después que se coloca la suspensión bacteriana sobre la membrana y la visualización es directa sin necesidad de equipo especial para la toma de los resultados (Siavichay, 1997).

1.5.2.2. Colony – Blot

Similar al dot-blot está basada en el uso de anticuerpos, es una técnica simple de alta especificidad y rapidez, que se realiza a partir de membranas que se colocan en cajas petri para impregnar la muestra, se adapta para la identificación de bacterias en los laboratorios de larvas y camarónicas; se obtienen resultados después de 6 a 8 horas después que se realiza el cultivo bacteriano. Esta técnica permite conocer el porcentaje de bacterias positivas identificadas en la muestra, pues la especificidad del anticuerpo permite detectar directamente la bacteria.

1.5.3. Métodos dependientes de cultivo o Método microbiológico clásico

Los métodos clásicos para la detección de microorganismos consisten en disponer las células microbianas viables sobre un medio sólido (cultivo en placa) o en un caldo líquido (procedimiento de enriquecimiento), (Atlas y Bartha, 2002). Estos medios de cultivo permiten que los microorganismos sean caracterizados en base a su fenotipo, propiedades celulares como su morfología, propiedades fisiológicas y la estructura de sus componentes celulares (Díaz, 2003).

Los medios de cultivo empleados son una mezcla equilibrada de nutrientes que en concentraciones adecuadas y con condiciones físicas óptimas permiten un buen crecimiento de los microorganismos. Contienen una base mineral; fuente de

carbono, nitrógeno y azufre; atmósfera adecuada y los factores de crecimiento necesarios.

Los medios de cultivo, permiten la multiplicación bacteriana *in vitro* facilitando el aislamiento de las bacterias a partir de sus hábitat naturales permitiendo su propagación en el laboratorio para su posterior identificación (Díaz, 2003).

Según Carrasco (2004), el método microbiológico clásico consta de cinco etapas:

- Dilución de la muestra
- Cultivo en medios de cultivo generales (que idealmente proporciona las condiciones de crecimiento para todos los microorganismos de la muestra)
- Cultivo en medios específicos para la selección de grupos de organismos.
- Conteo
- Identificación taxonómica

Los medios de cultivo pueden ser líquidos, cuando los componentes nutritivos están disueltos en solución acuosa, o sólidos, cuando esta solución de nutrientes se gelifica al añadirle un polisacárido gelificante no degradable por la actividad metabólica de las bacterias como el agar – agar. El agar – agar se disuelve por ebullición y al enfriarse por debajo de los 45 °C se solidifica como una gelatina dando una consistencia dura al medio de cultivo.

Los medios sólidos son utilizados para aislar bacterias, mientras que los medios líquidos son utilizados para cultivar cepas puras.

El aislamiento en cultivo puro es sin duda el mejor camino para caracterizar las especies que forman una comunidad bacteriana natural, sin embargo es conocido que muchas especies no crecen en cultivo. Además algunos organismos muy representativos en enriquecimientos y que pueden crecer muy bien en cultivo, son poco abundantes en el medio natural (Lim et al. 1999; Guillou et al. 1999; Ranjard et al. 2000), esto confirma que la microbiología tradicional no ofrece una visión representativa de la diversidad bacteriana, debido a que los medios de cultivo no pueden satisfacer los requerimientos de todos los microorganismos. Según Amman, (1995) más del 90 % de los microorganismos presentes en los ambientes naturales no pueden ser cultivados usando las técnicas tradicionales. Por lo tanto este método no puede informar adecuadamente acerca de que poblaciones son dominantes en la comunidad (Díez et al.; 2001).

Una causa de esta limitación es que los medios de crecimiento contengan inhibidores de crecimiento o que sean demasiado ricos, aún los medios mínimos tienen un exceso de carbono o de nitrógeno o de fósforo, e inhiban el crecimiento de microorganismos que en condiciones naturales, en general, viven precariamente.

La detección de un microorganismo basado en el fenotipo es una tarea difícil, ya que incluso organismos muy poco relacionados entre sí pueden presentar fenotipos similares para algunas características.

Los métodos usuales para el diagnóstico de infecciones de Vibrios en los cultivos de camarón están basados en la caracterización de una colonia aislada por medio de pruebas nutricionales y bioquímicas, por lo que estos procesos pueden tomar varios días y no permiten tomar decisiones de manejo en cultivos de camarón. (Rojlorsakul et al., 1998).

1.5.3.1. Medios sólidos

Entre los medios sólidos utilizados para aislar bacterias presentes en cultivos de camarón están los medios selectivos o enriquecidos, los cuales satisfacen las demandas fisiológicas más o menos específicas de un grupo de microorganismos (Calero, 1998; Intriago, 1998; Parra, 2001).

Entre los medios sólidos más empleados se destacan:

TCBS - Agar tiosulfato citrato sales biliares (Thiosulfate Citrate Bile Salts

Agar, siglas en ingles)

Es un medio utilizado para el cultivo y aislamiento selectivo de *Vibrio cholerae*, Vibrios enteropatógenos. Las colonias de *Vibrio* son grandes, de color amarillo o verde. Este medio inhibe selectivamente enterobacterias, aunque algunas pueden crecer formando pequeñas colonias.

TSA – Triptona Soya Agar. (Tryptic Soy Agar, siglas en ingles)

Es un medio universal que permite el crecimiento de distintas especies bacterianas y es recomendado para el aislamiento, purificación e identificación de bacterias patógenas a partir de aguas marinas y estuarinas.

Agar Marino

Este medio se recomienda para el cultivo de bacterias marinas heterótrofas. Tiene la característica de no ser muy firme al solidificarse, por lo cual se eleva la concentración de agar agar al 2 %.

LB agar – Medio de Cultivo Luria-Bertani

Es un medio que facilita el crecimiento de microorganismos de agua dulce, además sirve para aislar y congelar.

1.5.3.2. Medios Líquidos

Calda Nutritiva

Entre los medios líquidos generalmente utilizados para preparar inóculos de bacterias puros o para enriquecer bacterias antes de ser sembrados en los medios sólidos (Calero, 1998), se encuentran:

Agua de Peptona

Se emplea para el enriquecimiento y previo cultivo de especies de Vibrios patógenos, además de usarlo como medio de dilución. Se caracteriza por ser una fuente de nitrógeno, el cual es un requerimiento necesario para el desarrollo de bacterias (Sotomayor, 2000).

TSB – Triptona Soya Caldo (Tryptic Soy Broth, siglas en ingles)

Medio versátil y altamente nutritivo. Debido a la inclusión de peptona y peptona de soya, el medio es favorable para el crecimiento de muchos microorganismos patógenos.

LB Caldo Base

Medio de cultivo utilizado en biología molecular por su capacidad de permitir el crecimiento de microorganismos, contiene levadura de cerveza, bacto triptona, y cloruro de sodio.

Caldo Nutritivo

Medio líquido de múltiples aplicaciones para el cultivo de microorganismos no exigentes en sustancias nutritivas.

1.5.4. Métodos moleculares independientes de cultivo

La incorporación de la biología molecular al campo de la ecología microbiana, y el desarrollo de nuevas técnicas moleculares para su aplicación en los estudios ambientales, ha sido constante a lo largo de toda la década del noventa. Esos métodos han permitido a los ecólogos microbianos explorar la extensión de la biodiversidad en el mundo microbiano y avanzar en el conocimiento de los microorganismos de ambientes extremos (Atlas y Bartha, 2002).

Actualmente gracias al uso de métodos moleculares independientes de cultivo y de herramientas usadas en estudios filogenéticos se ha incrementado el estudio de la diversidad microbiana en comunidades complejas (Díaz, 2003).

Estas técnicas moleculares constituyen un instrumento sensible y específico para determinar un alto número de bacterias ofreciendo una alternativa para abordar el estudio de la diversidad y distribución ecológica de grupos de microorganismos (Arias et al., 1995; Díez et al., 2001), permite además el conocimiento de la composición, abundancia, estructura y la dinámica de las poblaciones individuales, organismos o genes dentro de la comunidad (Stults, 2001), venciendo con ello la escasez de conocimientos de las condiciones reales bajo la cual las bacterias crecen en hábitat naturales y la dificultad para desarrollar medios de cultivo que asemejen condiciones naturales (Ercolini, 2004).

La llegada de la biología molecular ha causado un cambio significativo en el tipo de herramientas utilizadas, permitiendo una caracterización y clasificación mucho más rápida y fiable de los microorganismos, reconociendo claramente la existencia de “microorganismos no cultivables” en las muestras ambientales de varios lugares tales como agua y sedimento. Facilitando evidencia de la existencia de muchos tipos de organismos en el ambiente en número y variedad (Rondon et al., 2000).

Los métodos moleculares para la clasificación e identificación de cepas están basados en la amplificación del DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleándose básicamente la amplificación de uno o pocos fragmentos de DNA específicos, tales como partes del operon de rRNA (RNA ribosomal).

Las técnicas de caracterización basadas en DNA, tienen la ventaja de que los genes específicos pueden ser amplificados por PCR desde la mezcla de una comunidad o cultivos puros y los productos de tal amplificación pueden ser caracterizados por diferentes técnicas.

Para esto se extrae el DNA de las bacterias y se lo emplea como molde para la síntesis de los genes ribosomales a partir de la polimerasa y oligonucleótidos dirigidos a las regiones conservadas de los genes ribosomales de todas las bacterias (Oligonucleótidos universales), suministrando de esta manera un perfil que representa la diversidad genética de una comunidad microbiana de un ambiente específico (Ercolini, 2004). Además de revelar la enorme diversidad microbiana (Kawai et al., 2002; Ellis et al., 2003) el uso de estas técnicas se ha convertido en un soporte para validar las técnicas tradicionales de cultivo (Casamayor, 2000).

Las técnicas moleculares permiten, en general, sondear la complejidad y variabilidad genética de los organismos, junto con el análisis y comparación de secuencias de aminoácidos de proteínas o la comparación de las secuencias nucleotídicas de genes permiten no solo identificar, sino clasificar y tratar de establecer las relaciones filogenéticas entre organismos o microorganismos. Por lo que las técnicas de diagnóstico basadas en DNA pueden ser usadas para diagnósticos rápidos de solo unas pocas horas. (Dalsgaard et al., 1996).

1.5.4.1. PCR – Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction, siglas en ingles)

La reacción en cadena de la polimerasa es una de las técnicas más ampliamente utilizadas en Biología molecular y fue inventada por Kary Mullis en 1985 (Siavichay, 1997). Es una técnica que amplifica o reproduce *in vitro* un número de copias de una región específica de DNA al ser delimitada por un par de cebadores o iniciadores que la flanquean.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica capaz de detectar cualquier secuencia de DNA de interés en: DNA clonado en plásmidos; DNA genómico total; bacterias; células eucariotas en cultivo, muestras de tejido fresco y en muestras en parafina (Vargas, 1999).

En microbiología, la PCR permite identificar al agente infeccioso independientemente de su respuesta serológica, lo que representa una gran ventaja en casos donde los anticuerpos aparecen luego de un largo período de infección y a veces en forma impredecible (Rodríguez y Barrera, 2004).

La PCR amplifica el gen elegido hasta un nivel en el que resulta viable su secuenciación o su caracterización por cualquier otra técnica (RFLP, DGGE, T – RFLP, etc). La posibilidad de combinar estas técnicas permite conocer la

abundancia, composición y distribución de diferentes poblaciones de organismos en su hábitat natural (Diéz et al., 2001)

Los inconvenientes de esta técnica son: las contaminaciones con DNA ambiental, alto coste inicial y que es necesario conocer la secuencia del DNA a amplificar (Vargas, 1999).

Los pasos que implica la PCR son los siguientes:

Desnaturalización del DNA

Consiste en la ruptura de los puentes de hidrógeno del DNA, para lo que se incuba la muestra a una temperatura de alrededor de 95 °C por un minuto, permitiendo así exponer las diferentes bases nitrogenadas del DNA blanco para la hibridación con los oligonucleótidos iniciadores (Figura # 5).

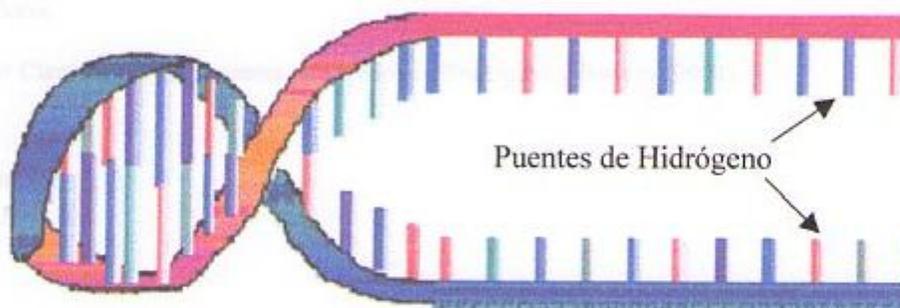


Fig. # 5 Desnaturalización del DNA. Los puentes de hidrógeno se rompen dejando al DNA en forma de cadena sencilla.

Fuente: Ciencia UANL, esquema publicado por Rodríguez y Barrera (2004).

Alineamiento

Es la hibridación de las cadenas desnaturalizadas del DNA blanco con los denominados cebadores o iniciadores (DNA sintético de cadena sencilla), a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias de ambas clases de DNA. Esta temperatura depende de la temperatura de fusión de los iniciadores, pero generalmente oscila entre 50 °C y 60 °C (Figura # 6).

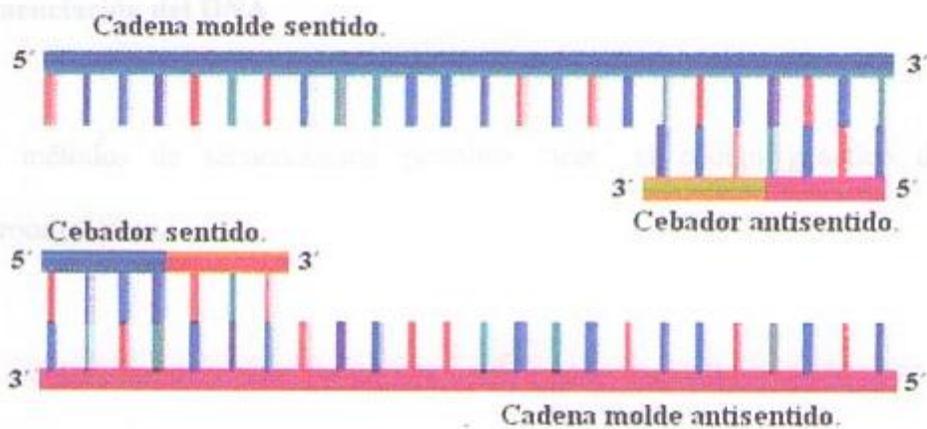


Fig. # 6 Alineamiento: Hibridación de las cadenas desnaturalizadas del DNA blanco con los iniciadores.

Fuente: Ciencia UANL, esquema publicado por Rodríguez y Barrera (2004).

Extensión

Se efectúa a 72 °C, temperatura a la que la polimerasa extiende la longitud de los iniciadores, añadiendo los diferentes nucleótidos libres en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena que actúa como molde. (Figura # 7)

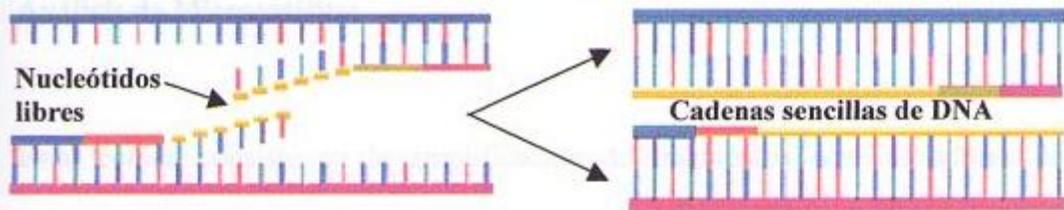


Fig. # 7 Extensión y conclusión de la PCR.

Fuente: Ciencia UANL, esquema publicado por Rodríguez y Barrera (2004).

1.5.4.1.1. Técnicas derivadas de la PCR

Secuenciación del DNA

Los métodos de secuenciación permiten “leer” el código genético de un microorganismo.

Las técnicas de secuenciación de DNA han estado disponibles desde 1977. Sin embargo, su aplicación a estudios poblacionales ha estado limitada por la dificultad en la producción de cantidades suficientes del DNA a secuenciar. La introducción de la PCR terminó esta dificultad y actualmente resulta viable la secuenciación de fragmentos de DNA de un número considerable de individuos, muchos más si se dispone de secuenciadores automáticos. Para este objetivo, la PCR simplemente proporciona cantidades suficientes de DNA molde de cada individuo.

Análisis de Microsatélites

Esta técnica consiste en la amplificación de fragmentos con iniciadores de oligonucleótidos específicos para secuencias simples repetitivas presentes en el DNA, denominadas microsatélites. La temperatura de hibridación del iniciador es mayor a 55 °C, por lo que hibridan en zonas específicas del genoma (Orberá, 2004).

Tanto la simpleza tecnológica como la cantidad y calidad de la información que genera han convertido al análisis de microsatélites en una de las técnicas más poderosas para la identificación de individuos, los análisis de parentesco y la genética de poblaciones.

RFLP - Polimorfismo de Longitud de fragmentos de restricción. (Random Fragment Length Polymorphism, siglas en ingles)

Consiste en la diferenciación de los organismos por el análisis de los patrones de ruptura que se generan en un sitio específico del genoma, cuando es cortado por enzimas de restricción (Orberá, 2004). De esta forma los diferentes fragmentos de longitud (Bandas polimórficas) obtenidos, son detectados por electroforesis en geles de agarosa o en geles de Poliacrilamida en el caso de un análisis de comunidad (Kirk et al., 2004).

Es usado para estudiar la diversidad microbiana basado en el DNA polimórfico. Detecta cambios estructurales en comunidades microbianas pero no es una medida de diversidad capaz de detectar grupos filogenéticos específicos (Kirk et al., 2004). Según Díaz (2003), se obtienen patrones de bandas con buena reproducibilidad pero muy complejas de analizar.

T – RFLP - Polimorfismo de Longitud de fragmentos de restricción terminales. (Terminal restriction fragment length polymorphism, siglas en ingles)

Se basa en utilizar iniciadores marcados con moléculas fluorescentes (fluor) durante la PCR originando un producto amplificado previamente cortado con enzimas de restricción, finalmente los fragmentos de restricción terminales son separados por electroforesis y visualizados por excitación del flúor. El análisis del T - RFLP, provee datos cuantitativos de cada fragmento de restricción detectado, incluyendo el tamaño y la intensidad de las pares de bases (Blackwood et al., 2003).

Este método automatizado permite analizar un largo número de muestras, es altamente reproducible y compara diferencias en comunidades microbianas, se utiliza para medir cambios espaciales, temporales y para estudiar la complejidad de las comunidades microbianas, detectando, monitoreando y evaluando las poblaciones (Kirk et al., 2004).

El T - RFLP, esta limitada por la extracción de DNA, la PCR y sobre todo por la selección de iniciadores universales y la selección de enzimas de restricción que influyen en la impresión digital de una comunidad.

ARDRA - Análisis de restricción de DNA ribosomal amplificado. (Amplified ribosomal DNA restriction analysis, siglas en ingles)

Implica la digestión de la secuencia 16S rDNA obtenida por PCR, usando enzimas de restricción y separando los fragmentos de restricción en geles de agarosa o en geles de poliacrilamida. Esta técnica ha sido usada para demostrar cambios en la estructura genética de comunidades bacterianas, cambios en condiciones ambientales o en exposiciones con componentes exógenos tóxicos (Ranjard et al., 2000).

RAPD o AP – PCR - Amplificación al azar de fragmentos polimórficos de DNA. (Randomly Amplified Polymorphic DNA, siglas en ingles)

Esta técnica se basa en la amplificación por PCR del DNA genómico en presencia de un único iniciador de pocos oligonucleótidos. Debido a la baja temperatura de hibridación (35 - 39 °C) el iniciador se une a sitios inespecíficos, distribuidos en regiones aleatorias en todo el genoma, permitiendo la amplificación de fragmentos polimórficos de DNA (Orberá, 2004), generando de esta manera productos de PCR de varios tamaños, específico del genoma analizado y del iniciador utilizado.

El producto amplificado se visualiza por electroforesis en geles de poliacrilamida ó agarosa.

Está técnica ha demostrado ser rápida y sensitiva capaz de revelar diferencias entre los genomas complejos de procariotas similares (Ranjard, 2000). Permite obtener las llamadas “huellas digitales” que no son más que las diferencias de número y tamaño en los fragmentos del DNA amplificado, las cuales son específicas de especies e incluso cepas (Orberá, 2004).

El problema de está técnica es su sensibilidad a las condiciones de reacción, por lo que es difícil en ocasiones obtener una reproducibilidad adecuada (Díaz, 2003).

RISA - Análisis de los Espacios Intergénicos ribosomales. (Ribosomal intergenic spacer analysis, siglas en ingles)

Este método se basa en la extracción del DNA y amplificación por PCR conducida con un iniciador oligonucleótido necesario para conservar regiones específicas como el 16S y el 23S.

El producto de la PCR (mezcla de fragmentos amplificados de los miembros de una comunidad) es visualizado por electroforesis en un gel de poliacrilamida, después de la tinción de plata, observando bandas modelos complejas que proveen un perfil específico de una comunidad. Cada banda de DNA corresponde a un

organismo del conjunto original (Fisher, 1999). La desventaja de este método es que requiere grandes cantidades de DNA (Kirk et al., 2004).

ARISA - Análisis automatizado de los Espacios Intergénicos ribosomales. (Automated ribosomal intergenic spacer analysis, siglas en ingles)

Se basa en la extracción del DNA y amplificación por PCR al igual que RISA, excepto que la PCR es conducida con un iniciador oligonucleótido fluorescente. El paso de electroforesis es subsecuentemente realizado con un sistema automatizado el cual provee detección láser del fragmento fluorescente de DNA (Fisher, 1999).

Es un método rápido y efectivo para evaluar la diversidad y composición de comunidades microbianas que pueden ser usadas en una escala espacial y temporal necesaria para estudios filogenéticos (Fisher, 1999). Pero a su vez requiere grandes cantidades de DNA (Kirk et al., 2004).

TGGE - Electroforesis en geles con gradiente de temperatura. (Temperature gradient gel electrophoresis, siglas en ingles)

Consiste en amplificar el DNA extraído directamente de las muestras de agua o sedimento por medio de la PCR, usando iniciadores universales que secuencien partes del fragmento 16S o 18S del rRNA ribosomal. La separación de las bandas

del producto amplificado se realiza en un gel de poliacrilamida con gradiente de temperatura. Mediante este método se pueden analizar simultáneamente un gran número de muestras, de una manera rápida, y reproducible.

La desventaja de este método es que implica varios pasos extra: DNA amplificado, lisis celular con una extracción eficiente, además que una banda puede representar más de una especie (co – migración) y sólo detecta especies dominantes.

1.5.4.2. DGGE - Electroforesis en geles de gradiente denaturante. (Denaturing gradient gel electrophoresis, siglas en ingles)

Este método ha sido introducido recientemente dentro de la ecología molecular microbiana para determinar la diversidad genética de comunidades microbianas naturales y para identificar la afiliación filogenética de los miembros de una comunidad (Kawai et al.,2002). El DGGE se basa en la electroforesis de los fragmentos 16S rDNA amplificados por PCR y visualizadas en geles de poliacrilamida con incremento lineal de gradiente químico denaturante (Fantroussi et al., 1999).

Actualmente la aplicación de PCR – DGGE en microbiología es muy amplia, versátil y ha sido exitosamente usada en muchos campos de la ecología microbiana, pues permite detectar microorganismos que no se recuperan en

medios de cultivo tradicionales (Ercolini, 2004). Esta técnica permite separar fragmentos de DNA de un mismo tamaño en base a su punto de fusión el cual es dependiente de la secuencia de los fragmentos amplificados con iniciadores específicos para el 16S RNA. Según Koizumi (2003) es un método apropiado para monitorear los cambios sucesivos en la estructura de una comunidad de sedimento a lo largo de la profundidad y para comparar el rDNA y el rRNA derivado de la amplificación de PCR.

El DGGE es uno de los métodos mas citado y usado para estudiar comunidades bacterianas complejas en varios ambientes, tales como suelo, sedimentos, columna de agua, ventilas hidrotermales, mesocosmos o plantas de tratamiento de aguas (Schafer y Muyzer, 2001; Temmerman et al., 2003). Implica la extracción directa del DNA bacteriano total, amplificación por PCR de una parte específica del gen 16S rDNA ribosomal y separación de los amplicones en un gel con gradiente denaturante. Tiene una ventaja que supera a los demás métodos, pues permite la identificación de organismos específicos representados en una impresión digital por extracción y secuenciación del DNA desde las bandas en el gel (Crump et al., 2003) (Figura # 8).

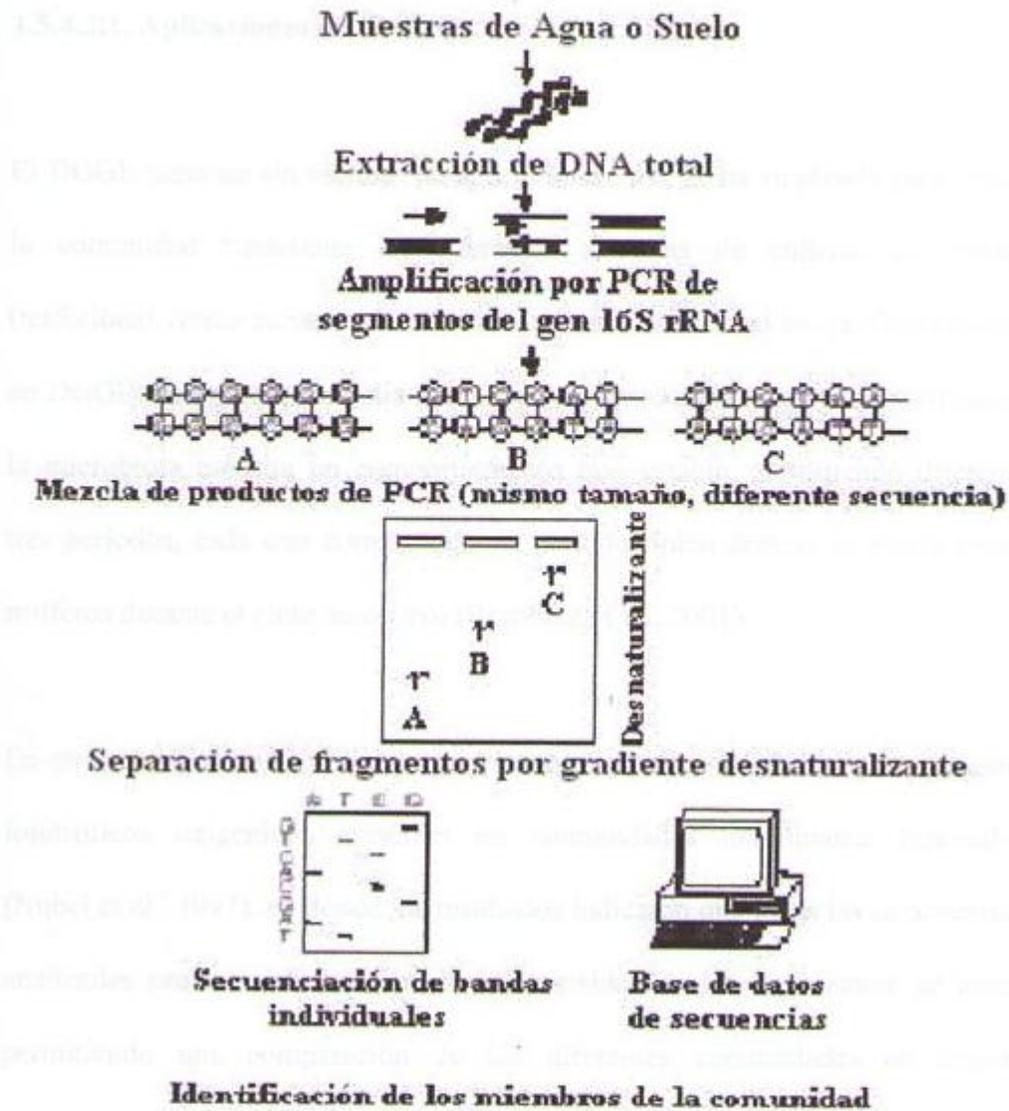


Fig. # 8 Pasos para la obtención de “huellas digitales” de comunidades microbianas por el método DGGE.

Fuente: Revista Latinoamericana de Microbiología, por Díaz y Wachter (2003).

Las impresiones digitales han sido usadas para estudiar las comunidades bacterianas complejas y para estimar la diversidad y representación relativa de unidades taxonómicas de bacterias individuales dentro del total de las comunidades bacterianas detectadas (Hewson y Fuhrman, 2004).

1.5.4.2.1. Aplicaciones del DGGE

El DGGE tiene un sin número de aplicaciones, así, se ha empleado para estudiar la comunidad bacteriana en diferentes sistemas de cultivos de rotíferos (tradicional versus recirculación). En el sistema tradicional los perfiles obtenidos en DGGE varían para cada día de cultivo, en tanto en el sistema de recirculación la microbiota muestra un comportamiento más estable, permitiendo diferenciar tres períodos, cada uno corresponde un período típico durante la producción de rotíferos durante el ciclo de cultivo (Rombaut et al., 2001).

En otros estudios se ha utilizado para examinar la diversidad de microorganismos fototróficos oxigénicos presentes en comunidades microbianas hipersalinas (Nubel et al., 1997), en dónde los resultados indicaron que todas las características analizadas proveen información de la diversidad de los organismos de interés, permitiendo una comparación de los diferentes comunidades en términos relativos, demostrando que los métodos moleculares son capaces de cuantificar la riqueza microbiana y la diversidad en hábitat naturales (Nubel et al., 1999).

En España se ha estudiado y analizado la comunidad microbiana de dos Lagos, Ciso y Vilar, donde el análisis filogenético indicó nuevas bacterias y líneas Arqueas presentes en la diversidad microbiana, las secuencias obtenidas en la impresión digital de DGGE correspondían a los microorganismos que estaban actualmente presente a altas concentraciones en el sistema natural (Casamayor et

al., 2000); Riemann and Winding (2001) utilizaron la técnica para estudiar la dinámica de una comunidad bacteriana durante un periodo de 19 días comparando la diversidad y sucesión entre organismos libres mayores a $10\ \mu$ y partículas asociadas a bacterias menores a $10\ \mu$, encontrando que un alto número de bandas entre los organismos libres poseían un significado filogenético, el análisis reveló que las bandas secuenciadas de las bacterias en el gel están relacionados filogenéticamente en grupos comúnmente establecidos de agua dulce como por ejemplo Proteobacteria.

Mientras, que Muylaert et al. (2002), estudió la composición de la comunidad bacteriana en la superficie de los lagos eutróficos al comparar la intensidad relativa de las bandas (presencia o ausencia de datos) y demostró que la estructura de la comunidad bacteriana depende de las estaciones, origen del substrato dominante y de la estructura de la cadena alimenticia.

Smit et al. (2001), aplicó la técnica para analizar la diversidad bacteriana en el suelo de un campo de trigo e investigar la magnitud de los cambios estacionales sobre la comunidad bacteriana, los resultados indicaron que la comunidad presente en el mes de Julio se diferenciaba notablemente con los otros meses, las secuencias del 16S rDNA de las divisiones bacterianas indicaron que el ratio entre el número de proteobacterias y ácido bacterias puede ser un indicativo de los niveles tróficos en el suelo. Bano and Hollibaugh (2002), la utilizaron para analizar la composición filogenética del grupo de bacterioplancton en muestras

colectadas del Océano Ártico en tres estaciones (1995, 1996, 1997), encontrando que la mayoría de las bandas son comunes para todas las muestras en las tres estaciones. También ha sido aplicada para el estudio de la diversidad de Picoeucariotes en ambientes marinos utilizando iniciadores específicos para eucariotes “gen 18S rRNA” (Díez et al., 2001).

Kawai et al. (2002), utilizó la técnica para examinar e identificar la comunidad bacteriana en agua purificada para los procesos de fabricación farmacéutica, encontrando que la diversidad bacteriana es significativamente baja en comparación con otros ambientes, esta técnica puede ser una importante herramienta de control que permite evitar problemas y tomar acciones correctivas.

Recientemente el DGGE se ha introducido como herramienta en la microbiología alimenticia para estudiar la fermentación microbiana en alimentos (Ercolini, 2004) y para detectar bacterias patógenas en peces, en este estudio se demostró que el DGGE puede detectar rápidamente múltiples bacterias en una sola muestra, sean estas de cultivo axénico o mezclas de comunidades (Ji et al., 2004).

Temmerman et al. (2003), utilizó la técnica para detectar e identificar bacterias en los productos probióticos para consumo humano, encontrando que la técnica era fácil y reproducible para analizar, detectar e identificar potencialmente este tipo de productos.

1.5.5. Índices de Diversidad

A partir de los geles de gradiente (DGGE), se puede obtener diferente tipo de información como por ejemplo: número de bandas, posición (ausencia o presencia de bandas particulares) e intensidad relativa de las bandas (Schafer y Muyzer, 2001), a esta información pueden aplicarse análisis posteriores para determinar variación entre los perfiles obtenidos para diferentes muestras.

El análisis de los perfiles de DNA describe diferencias en composición y en organización de comunidades midiendo el número (riqueza) y abundancia relativa (estructura u homogeneidad) de especies o filotipos. La riqueza y homogeneidad de comunidades biológicas reflejan la presión selectiva de las comunidades (Dunbar et al., 2000).

En base a los perfiles que se obtienen con esta técnica se pueden generar “*índices de diversidad*” que permiten establecer diferencias entre las comunidades microbianas, representando mejor las poblaciones estudiadas (McCaig et al., 2001). Estos índices de diversidad también son usados para relacionar los cambios ecológicos en las comunidades y cambios ambientales (Muylaert et al., 2002), además de ser sensitivos para estimar la frecuencia de diferentes especies (Martín, 2002). Los índices de diversidad como el de Shannon-Weaver, Homogeneidad (evenness) y Riqueza de especies son calculados en base a la intensidad y al número de bandas presentes en los perfiles, el análisis para obtener

estos índices es rápido y permite realizar comparaciones cualitativas y cuantitativas de un gran número de muestras (McCaig et al., 2001).

La “riqueza de especies” puede expresarse mediante relaciones simples entre el número total de especies y el número total de organismos. Es una medida del número de especies en la comunidad, pero no de cuantos individuos existen de una especie concreta.

Homogeneidad (evenness) es una medida de la proporción de individuos dentro de cada especie e indica si existen poblaciones dominantes.

Nubel et al. (1999), citan que la diversidad ecológica debe considerar la presencia de las diferentes clases de microorganismos (riqueza) y la distribución relativa de elementos individuales entre estas clases (evenness). Por lo tanto para medir la diversidad emplean un *índice* que incorpora ambos aspectos (Riqueza de Especies y Shannon-Weaver), este índice conocido como Homogeneidad de Especies es el índice de diversidad comúnmente usado por ecologistas.

Koizumi et al. (2003), compararon la estructura de una comunidad bacteriana en sedimento basado en el análisis de los 16S rDNA y 16S rRNA. Los resultados demostraron que la estructura de las comunidades puede ser caracterizada simultáneamente en base a 16S rDNA y 16S rRNA de modo que se puede evaluar toda la población microbiana existente y diferenciarla de la población microbiana

realmente activa en el sedimento. Concluyeron que los *índices de diversidad* obtenidos basados en 16S rDNA no cambian drásticamente a diferentes profundidades del sustrato estudiado, mientras que los índices de diversidad basados en 16S rRNA decrecen en las capas más profundas del sedimento.

Edwards et al. (2001), estudiaron la estructura de las comunidades bacterianas heterotróficas planctónicas, aplicando los índices de Simpson, Shannon-Weaver y Riqueza de Especies detectando diferencias significativas en los estratos profundos y observando menor diversidad bacteriana en el fondo de la columna de agua durante uno de los meses dentro de su estudio.

2.1. Diseño Experimental y Transacciones

Se establecieron dos transacciones, una en el mes de mayo y otra en el mes de agosto (Transacción 1) y plancton (de aguas superficiales) en estratos (Transacción 2). El experimento 1 tuvo lugar durante el día 6 de mayo en un área de 1.5 m de ancho por 1.5 m de largo y se realizó el 20 de mayo. El experimento 2 tuvo lugar durante el día 6 de agosto en un área de 1.5 m de ancho por 1.5 m de largo y se realizó el 20 de agosto.

2. PROCEDIMIENTO EMPLEADO PARA LA CARACTERIZACIÓN DE COMUNIDADES BACTERIANAS

2.1. Área de estudio

Los muestreos se realizaron semanalmente durante un ciclo de cultivo en sistemas semi-intensivos abiertos y un sistema intensivo con invernadero. En las piscinas # 15 (5 Ha) y # 20 (3,0 Ha) de la camaronera OPUMARSA y en una piscina G-1 (0,25 Ha) de la estación experimental de CENAIM, instalaciones ubicadas en la localidad de Palmar, Península de Santa Elena, Provincia del Guayas.

2.2. Diseño Experimental y Tratamientos

El estudio se realizó durante un ciclo de cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei* durante el cual se realizaron muestreos semanales (17).

Se evaluaron dos tratamientos, piscinas con cultivo semi-intensivo sin invernadero (Tratamiento 1) y piscinas con cultivo intensivo con invernadero (Tratamiento 2).

El tratamiento 1 tenía dos piscinas (Piscina # 15 de 5.0 Ha sembrada a una densidad de 13.6 larvas / m² y la piscina # 20 de 3.0 Ha sembrada a una densidad

de 12.67 larvas / m²), mientras que el Tratamiento 2 tenía una piscina (Piscina G-1 de 0.25 Ha sembrada a una densidad de 80 larvas / m²).

Se colectaron semanalmente muestras de agua y de sedimento en cada uno de los puntos seleccionados en cada Unidad Experimental. También se registraron parámetros abióticos como: temperatura (°C), salinidad (g / L⁻¹), oxígeno disuelto en el agua (mg / L⁻¹), pH, sólidos suspendidos totales (mg / L⁻¹), materia orgánica del agua (mg / L⁻¹), y materia orgánica del sedimento (%).

El diseño fue completamente aleatorio.

Las unidades experimentales fueron sometidas a reposiciones de agua para compensar pérdidas por filtración o evaporación.

A partir de los perfiles generados por DGGE se calcularon índices de diversidad a partir de la presencia, ausencia e intensidad relativa de bandas, estos índices fueron: índice de Riqueza de Especies, índice de Shannon – Weaver y el índice de Homogeneidad de Especies (evenness).

Los índices de diversidad y los datos obtenidos de parámetros abióticos para cada uno de los sistemas de engorde durante el ciclo del cultivo, se sometieron a un análisis de varianza de una vía (ANOVA), con un intervalo de confianza del 95 % (≤ 0.05) para detectar las diferencias entre los tratamientos ensayados.

Cuando se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, se aplicó el test de contraste de Scheffé a un nivel de significancia $\alpha = 0,05$.

Software

Para cumplir con las asunciones de homogeneidad de varianza (Prueba de Levene) los datos se transformaron cuando fue necesario.

El manejo y procesamiento de los datos fue realizado con el paquete estadístico Data Desk ® (versión 6.1).

2.3. Manejo del Experimento

2.3.1. Colecta de muestras

Se establecieron un número de puntos representativos para cada sistema muestreado (piscinas de cultivo), para ello, se dividió imaginariamente la piscina en 8 secciones iguales y se tomaron una muestra en cada sección. Se realizó un muestreo semanal durante las 17 semanas de cultivo. En cada punto de muestreo el procedimiento fue:

Agua

- La muestra se tomó a media columna de agua, utilizando botellas de plástico estériles de 500 ml, posteriormente

- Se almacenó en una hielera, hasta su transporte al laboratorio.

Sedimento extracción del agua superficial se utilizó como se describió en el capítulo anterior. Se utilizaron tubos de vidrio y perlas de sedimentación (Magna 1.75x3.00x0.60).

- La muestra de sedimento superficial se colectó a 5 cm de profundidad,
- utilizando tubos de PVC (core) estériles.
- Las muestras obtenidas se colocaron en fundas y se almacenaron en una hielera.

- Se homogenizó por 2 minutos para ayudar a la lisis celular.

2.3.2. Extracción, Purificación y amplificación (PCR -16S RNA) del DNA bacteriano.

Se utilizó el método de extracción de DNA total de bacterias (Sambrook & Fritschy, 2001) (concentración final 20 mg/ml).

- El DNA se obtuvo a partir de las muestras de agua y sedimento.
- La técnica empleada para el aislamiento de DNA total fue en base a CTAB – Phenol – Cloroformo e Isopropanol para la precipitación (Smalla et al., 1993).

Los protocolos son descritos en detalle a continuación:

Se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos, se resuspendió el sobrenadante en 100 µl de agua estéril.

- Se agregó 400 µl de etanol.

- Se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos, se resuspendió el sobrenadante en 100 µl de agua estéril.

Extracción de DNA de Sedimento

- Para la extracción del ácido nucleico se utilizó tubos estériles con perlas de vidrio y perlas de cerámica (lisis mecánica) Magna Lyser Green Beads (Roche ®), brevemente:
- Se agregó 0,5 gramos de sedimento, 500 μ l de tampón CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide), 10 μ l de lizozima (concentración final 50 mg. ml⁻¹).
- Se homogenizó por 2 minutos para ayudar a la lisis celular
- Las muestras fueron incubadas en “baño maría” a 37 °C por 45 minutos.
- Posteriormente se agregó 10 μ l de Proteinasa K (Invitrogen ®) (concentración final 20 mg. ml⁻¹)
- Se homogenizó nuevamente y se llevó a “baño maría” a 55 °C por 1 hora (en cada fase se homogenizó para ayudar a la lisis celular).
- Se enfrió las muestras a temperatura ambiente.
- Se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos y se separó 1 ml de sobrenadante en tubos de 1,5 ml estériles.
- Se adicionó 500 μ l de phenol – cloroformo, se mezcló muy bien y se centrifugó a 12000 rpm por 8 minutos, se recuperó el sobrenadante en tubos nuevos.
- Se agregó 400 μ l de cloroformo.
- Se centrifugó a 12000 rpm por 4 minutos, se recuperó el sobrenadante en tubos nuevos

- Se agregó 600 μ l de Isopropanol puro almacenándolo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12 horas para precipitar el DNA.
- Se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos.
- Se eliminó el sobrenadante y se hizo un lavado del pellet con 100 μ l de etanol al 70 % (Merck $\text{\textcircled{R}}$).
- Se centrifugó y se eliminó el sobrenadante, Posteriormente se secó el pellet a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos, se resuspendió el DNA en 50 μ l de agua destilada estéril doblemente filtrada.

Extracción de DNA de Agua

- Para la extracción del ácido nucleico del agua las muestras fueron centrifugadas a 3300 rpm.
- El pellet fue resuspendido con 2 ml de agua destilada estéril doblemente filtrada y separados en tubos de 1,5 ml a razón de 500 μ l de muestra en cada tubo y almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Estas muestras fueron centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos.
- Se removió el sobrenadante, y se adicionó 500 μ l de tampón CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide), 4 μ l de Proteinasa K (Invitrogen $\text{\textcircled{R}}$) (concentración final 20 mg. ml^{-1}).
- Se agitó y se llevó a “baño maría” a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas.
- Posteriormente se siguió el mismo protocolo empleado para la extracción de sedimento, a partir de la adición de phenol – cloroformo.

Purificación del DNA bacteriano

- El DNA de las muestras se purificó por el método descrito por Smit et al., 1997.
- Se realizó utilizando un Sistema de Purificación basado en filtros (Wizard PCR Preps DNA Purification System – Promega ®), siguiendo las instrucciones del proveedor.
- Se le adicionó 500 μ L de resina a los tubos estériles de 1,5 ml con 50 μ L de muestra (DNA).
- Se agitó por 2 minutos.
- Se tomó la muestra con una jeringa de 1 ml y se filtró.
- Luego se filtró 2 ml de Isopropanol al 80 % (para lavar el DNA).
- Se centrifugó el filtro a 12000 rpm por 2 minutos.
- Se dejó secar el filtro por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Los filtros se colocaron en tubos estériles de 1,5 ml y se adicionó 50 μ L de agua destilada estéril doblemente filtrada a 68 °C.
- Se dejó incubar las muestras por dos minutos para que el agua se empape en el filtro.
- Finalmente se centrifugó a 12000 rpm por 2 minutos para desprender el DNA y recuperarlo en los tubos nuevos.

Cuantificación de DNA

Después de la extracción fue necesario determinar la concentración de ácido nucleico que se logró obtener. La concentración de DNA se determinó mediante espectrofotometría, utilizando la propiedad de las bases púricas y pirimidínicas de absorber los rayos ultravioletas a 260 nm. Utilizando para ello un equipo Bio Photometer Eppendorf®, aplicando una dilución 1 / 20 con agua destilada estéril doblemente filtrada, obteniendo “ratios” a 280 – 230 nm.

Tabla 1. Características de la muestra.

- La concentración de DNA se estandarizó en 60 ng / μ L.
- Cuando las concentraciones fueron mayores se realizó diluciones.
- El DNA fue almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta ser utilizadas para la PCR.
- Cuando la concentración de DNA de una muestra era baja, el DNA se concentró por precipitación. Para ello, se añadió NaCl a la muestra (concentración final de 0.2 M) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío, dejándola un mínimo de 12 h a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después se centrifugó 10 min. a 10.000 rpm, y se lavó con etanol frío al 70 % y se secó en una estufa a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, finalmente se disolvió con 15 μ L de agua destilada estéril doblemente filtrada.

Amplificación (PCR - 16S RNA) del DNA bacteriano

- Se empleó el método descrito por Schafer et al., (2001).

- Las muestras de agua y sedimento, fueron amplificadas por PCR – DGGE usando los iniciadores PRBA338F-GC (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGG GCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') y el iniciador 518R-1 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'), complementarios de la región conservada 16S RNA, con 30 ciclos térmicos.
- El volumen final de mezcla por muestra para una amplificación mediante PCR fue de 25 μ l. (Tabla # 1).

Tabla # 1. Concentraciones de la mezcla de PCR.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN POR MUESTRA
Agua	-	-	17,95 μ l
PCR – Tampón	10 X	1 X	2,5 μ l
Mg Cl ₂	25 mM	2.1 mM	2,1 μ l
DNTPs	10 mM	0.2 mM	0,5 μ l
Iniciador – F	20 μ M	0.375 μ M	0,375 μ l
Iniciador – R	20 μ M	0.375 μ M	0,375 μ l
TAQ	-	-	0,2 μ l
DNA	-	-	1 μ l
Total			25 μl

- La amplificación por PCR se realizó en el equipo PTC – 200 MJ Research ®, las condiciones de amplificación utilizadas se describen a continuación en la tabla # 2.
- La integridad del DNA total se confirmó por electroforesis en geles de agarosa.

Tabla # 2. Condiciones de amplificación para 16S rDNA bacteriano de las muestras de agua y sedimento.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (m)
Desnaturalización inicial	94	5:00
Desnaturalización (3)	92	1:00
Hibridación (3)	55	1:00
Polimerización (3)	72	2:00
Polimerización final (1)	72	10:00
Conservación (2)	20	30:00

- (1) Sólo último ciclo
- (2) Al completar 30 ciclos
- (3) Se repite 29 veces

2.3.3 Electroforesis

2.3.3.1. Electroforesis en geles de Agarosa

- Se preparó un gel de agarosa al 2 % (w / v), usando una solución buffer de electroforesis (Solución TAE 1X) y bromuro de etidio (concentración final 10 mg. ml⁻¹).
- Se utilizó un horno de microondas para fundir la agarosa en el buffer de electroforesis.
- Cuando el gel polimerizó, se retiró el sello de la bandeja, el peine y se colocó la bandeja con el gel en la cubeta de electroforesis.
- Se añadió suficiente buffer (TAE 1X, pH 8) para cubrir el gel.

- Se tomó 8 μ l del producto amplificado más 5 μ l de tampón de depósito: azul de bromofenol 0.25 % (w / v), glicerol 40 % (v / v).
- Se colocó cada muestra en un pozo con una pipeta, se incluyó un marcador de 1 kb de peso molecular como referencia.
- Para que el producto amplificado migrara a través del gel, se conectó la bandeja de electroforesis a una fuente de poder (CBS Scientific Company EPS 250) a 115 voltios, durante 45 minutos, como el DNA está cargado negativamente migra hacia el lado positivo.
- Finalmente el gel fue fotografiado con una cámara (Kodak Digital DC 120 Zoom, Gibco BRL UV transiluminador TFX-35M), la fotografía digital fue registrada y visualizada utilizando el programa "Kodak Digital Science IQ Image Analysis Software" (Versión 3.0, Mac.).

2.3.3.2. Electroforesis en geles de Poliacrilamida

- Se utilizó un equipo para DGGE (C.B.S Scientific. Co (DGGE – 2001). Siguiendo el protocolo descrito por Muyzer et al. (1993), con algunas modificaciones.
- Se empleó un gel de poliacrilamida (6 %) con un gradiente químico lineal de 40 – 60 % denaturante (el denaturante al 100 % contiene 7 M urea y 40 % de formamida) con un ratio de acrilamida y bis acrilamida de 37.5: 1, sumergido en una solución buffer TAE 1X (40 mM Tris, 40 mM de ácido acético, 1 mM EDTA: pH 7.4).

El gel de Poliacrilamida con gradiente denaturante se preparó de la siguiente manera:

- En un tubo se mezcló 11,5 ml de denaturante al 60 %, 80 μ l de persulfato de amonio (10 %) y 5,0 μ l de temed.
- En otro tubo se mezcló 11,5 ml de denaturante al 40 %, 80 μ l de persulfato de amonio (10 %) y 5,0 μ l de temed.
- Estas soluciones se vertieron en un equipo para gradientes y dicha mezcla se colocó entre dos vidrios con un espaciador de 1 mm y se dejó polimerizar durante 2 horas.
- El producto de la PCR (8 μ l) de DNA genómico de las muestras de agua y sedimento se colocó en los geles con gradiente denaturante.
- La electroforesis se corrió a 60 °C de temperatura durante 10 minutos a 20 voltios seguido por 6 horas a 150 voltios.

2.3.4. Tinción

- Se empleó la Tinción de plata (AgNO_3). Siguiendo el protocolo descrito por Dinesh et al. (1995), con algunas modificaciones.
- Una vez que terminó el tiempo de corrida, los geles se desprendieron, y se los colocó suavemente en las cubetas con solución de tinción.

- De cada solución se utilizó 1,5 litros, siendo las soluciones de fijación y enjuague nuevas para cada tinción, las otras soluciones se las reutilizó 5 veces aproximadamente (ver tabla # 3).

Tabla # 3. Pasos para la tinción con Nitrato de Plata.

PASO	REACTIVO	TIEMPO
1. Fijación	10 % etanol 150 ml 0,5 % ácido acético.....7,5 ml Enrasar con H ₂ O desionizada hasta 1.5 litros.	15 minutos
2. Impregnación	0,011 M AgNO ₃2,8 g Enrasar con H ₂ O desionizada hasta 1.5 litros.	20 minutos
3. Enjuague	H ₂ O desionizada1,5 litros	1 minutos
4. Revelado	0,75 M NaOH.....45 gr 0,085 M Formaldehído.....10,5 ml Enrasar con H ₂ O desionizada hasta 1.5 litros.	+/- 10 minutos
5. Parada	0,07 M Na ₂ CO ₃11 gr Enrasar con H ₂ O desionizada hasta 1.5 litros.	3 – 5 minutos

Fotografía

- Una vez terminada la tinción, el gel fue fotografiado con una cámara digital OLYMPUS C- 5000 (5 Megapixeles: zoom óptico 3x de 38 mm – 14 mm), sobre una caja de luz blanca.
- Las fotografías fueron archivadas para su posterior análisis.

2.3.5. Análisis de Imagen

- Todas las imágenes de los geles se guardaron como archivos en formato TIFF y se procesaron mediante el programa “Adobe Photo Shop” (versión 7.0, Mac.) y “Gene Profiler” (versión 4.05).
- Con este programa se determinó la presencia o ausencia de bandas, así como la intensidad de las mismas, el programa fue calibrado para considerar las bandas visibles, claras y definidas representadas en un mínimo de 5 % de intensidad total en la línea analizada.

2.3.6. Índices de diversidad

Los índices de diversidad calculados fueron:

2.3.6.1. Índice de Riqueza de Especies (S):

Se define como el número de diferentes organismos presentes en una muestra (número de bandas presentes en DGGE). No toma en cuenta la proporción y distribución de cada especie en la comunidad.

Se calculó con la siguiente ecuación:

$$S = \# \text{ de bandas detectadas para cada línea}$$

2.3.6.2. Índice de Shannon–Weaver

Esta medida se calcula en base a las bandas de los perfiles obtenidos del DGGE, toma en consideración el número y la intensidad relativa de las bandas en una línea individual (Koizumi et al., 2003).

Se calculó con la siguiente ecuación:

$$H' = - \sum P_i \cdot \log P_i$$

Donde:

P_i es la intensidad relativa de las bandas en un perfil en porcentaje

2.3.6.3. Índice de Homogeneidad de Especies (evenness)

Se define como una medida que expresa que tan similar es la abundancia de diferentes especies. Se calcula a partir del índice de riqueza de especies (S) y el índice de Shannon-Weaver (H).

Se calculó con la siguiente ecuación:

$$E = H / \log (S)$$

2.3.7. Parámetros abióticos:

Se tomaron y registraron los siguientes parámetros:

Temperatura y Oxígeno Disuelto

Se realizó una medición junto a la toma de la muestra. Se utilizó un equipo YSI – 85 (YSI Incorporated Yellow Springs, Ohio 45387 USA) con sensor de temperatura incorporado.

pH

Se realizó una medición junto a la toma de la muestra. Se empleó un equipo de mano pH testr2 “double junction” (OAKTON® Instruments).

Salinidad

Se realizó una medición junto a la toma de la muestra. Se utilizó un refractómetro de mano marca ATAGO, Modelo 5/Mill.

Dónde:

B = Peso del líquido en el pycnómetro antes de la muestra (g)

A = Peso del líquido con muestra (g)

2.3.8. Materia Orgánica Total (Agua-Sedimento)

Agua

- El análisis en agua se lo realizó en el laboratorio de Análisis Ambiental Seco y Húmedo y Análisis Ambiental Químico del CENAIM, siguiendo el protocolo estándar descrito por Boyd y Tucker, (1992).
- Se utilizó filtros (Whatman GF / C 42.5 mm Ø), los mismos que fueron hidratados por 24 horas en agua destilada y posteriormente secados en una estufa a 103 °C por 24 horas, se obtuvo el peso correspondiente.
- Se tomó 100 ml de muestra y se pasó por el filtro, se llevó a 103 °C por 24 horas se pesó y luego se llevó a la mufla a 550 °C por 30 minutos, la muestra fue colocada en el interior de un desecador para enfriarla, posteriormente se pesó.

La concentración de materia orgánica del agua se obtuvo con la siguiente fórmula:

OM = Concentración de materia orgánica (%)

$$Materia\ orgánica\ particulada\ (mg.\ L^{-1}) = \frac{(B - A) 1,000\ ml.\ L^{-1}}{V}$$

W₁ = Peso húmedo del filtro por peso de la muestra (g.)

W₂ = Peso del filtro y muestra después de la mufla (g.)

Donde:

B = Peso del filtro con la muestra antes de la mufla (mg.).

A = Peso del filtro con muestra después de la mufla (mg.).

V = Volumen de la muestra.

Sedimento

- El análisis en sedimento se lo realizó siguiendo el protocolo estándar descrito por Boyd, (1995).
- Se empleó un crisol limpio y se adicionó 2 g. de sedimento seco (previamente pulverizado), se llevó la muestra a 60 °C por 24 horas, se removió la muestra y se dejó enfriar en el interior de un desecador, se obtuvo el peso y se ubicó la muestra en la mufla a 350 °C por 8 horas. Finalmente la concentración de materia orgánica se calculó con la siguiente fórmula:

$$OM = 100 - \frac{W_f - W_t}{W_t} \times 100$$

Donde:

Donde:

OM = Concentración de materia orgánica (%)

Wt = Peso tarado del crisol (g.)

Wts = Peso tarado del crisol por peso de la muestra (g.)

Wf = Peso del crisol y sólidos después de la mufla (g.)

2.3.9. Sólidos Suspendidos Totales:

- Se lo realizó siguiendo el protocolo estándar descrito por Grenbert, (1992).
- Se preparó los filtros (Whatman GF / C 42.5 mm Ø), hidratándolos en agua destilada por 24 horas, secándolos por 24 horas y obteniendo el peso.
- Se tomó 100 ml de la muestra de agua y se pasó por el filtro, se llevó a la estufa a 103 °C por 24 horas, se enfrió el residuo del filtro en el interior de un desecador y se obtuvo el peso correspondiente.
- Se calculó el resultado con la siguiente fórmula:

$$\text{SST (mg. L}^{-1}\text{)} = \frac{(F - T) 1000}{V}$$

Donde:

F = Peso final del residuo filtrado (mg)

T = Peso tarado del filtro (mg)

V = Volumen de la muestra en mililitros (ml)

2.4. Datos Evaluados

Índices de Diversidad:

- Índice de Riqueza de Especies
- Índice de Shannon – Weaver

3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LA DIVERSIDAD DE COMUNIDADES BACTERIANAS

3.1. ANÁLISIS MOLECULAR-RESULTADOS DEL DGGE

3.1.1. Extracción de DNA, Amplificación por PCR y Electroforesis en Geles de Agarosa

Se realizó la extracción y posterior amplificación por PCR de los fragmentos del gen 16S rDNA de las muestras de agua y sedimento de las piscinas # 15 y # 20 del sistema semi-intensivo y piscina G-1 del sistema intensivo siguiendo los protocolos descritos previamente. Se procesaron 17 muestras de agua y 17 muestras de sedimento para cada una de las piscinas analizadas durante el ciclo del cultivo.

El tamaño de los productos amplificados por PCR fue confirmado por electroforesis en geles de agarosa. En la Figura # 9 se presenta un gel de agarosa que muestra bandas de DNA correspondientes a los fragmentos amplificados para cada tipo de muestra. El tamaño de las bandas fue de aproximadamente 200 bp.

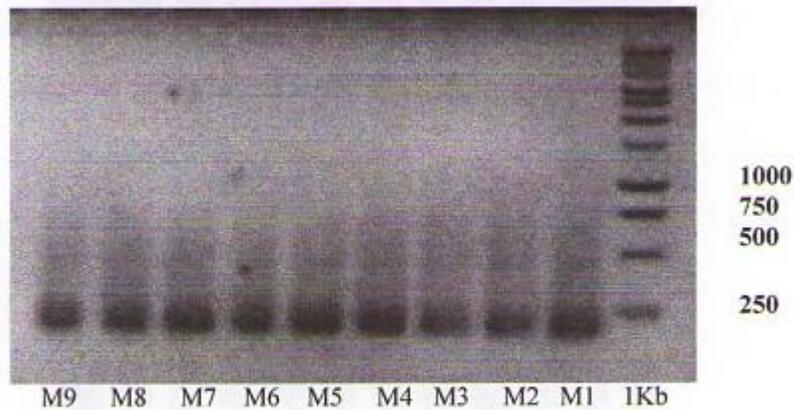


Fig. # 9 Electroforesis en gel de agarosa (2 %) del fragmento (16S rDNA) amplificado por PCR. 1 Kb marcador de peso molecular, M1 - M9 muestreos de agua del invernadero G-1.

3.1.2. Electroforesis en Geles con Gradiente Denaturante (DGGE)

Una vez confirmada la amplificación en geles de Agarosa se tomó el producto amplificado (16S rDNA) de las muestras de agua y sedimento y fue sometido a una electroforesis en Geles con Gradiente Denaturante (DGGE). La técnica generó un perfil para cada uno de los 17 muestreos y por cada tipo de muestra (agua y sedimento), obteniendo al final 102 perfiles (34 por cada piscina). Cada perfil genético estuvo constituido por un diverso número de bandas de diferentes intensidades, las cuales representan la diversidad de especies bacterianas y la presencia relativa de cada especie en cada una de las piscinas. (Figura # 10).

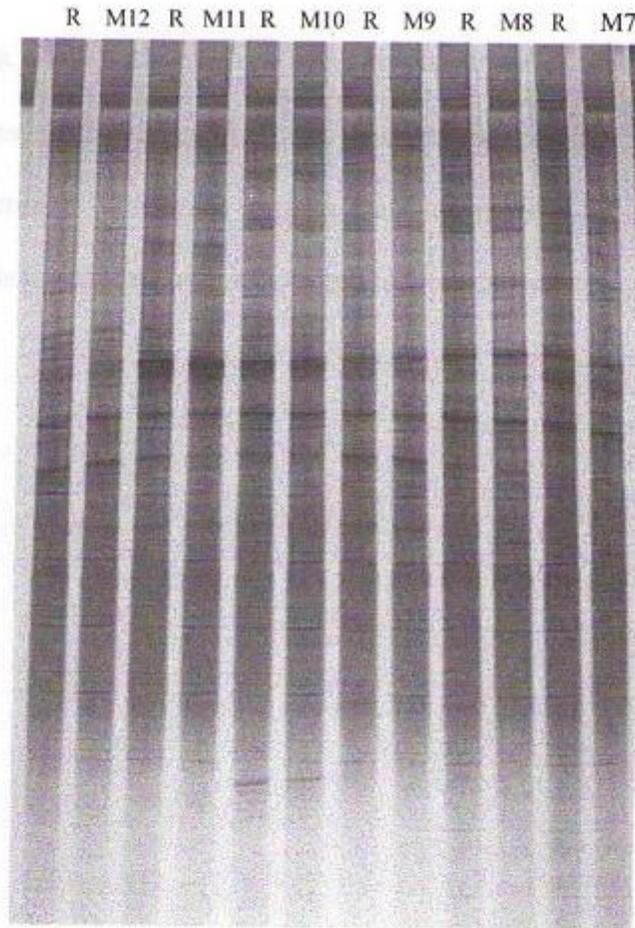


Fig.#10. Gel de poliacrilamida con gradiente denaturante teñido con nitrato de plata. M12 - M7: muestras de agua de la piscina # 15, sistema semi-intensivo muestreo 7 al 12 (R = réplicas de las muestras).

El DGGE es una metodología empleada para analizar comunidades bacterianas, pues permite estudiar las pequeñas diferencias en las secuencias del gen 16S rDNA bacteriano, esta técnica puede ser usada para estudiar la diversidad microbiana y abundancia relativa en hábitat naturales, (Pintado et al., 2003; Kropf et al., 2004; Bohannan and Hughes, 2003; Sigler et al., 2004). Knapp et al. (2004) comentan que el análisis de pequeñas subunidades del gen rRNA (ssu rRNA) es un poderoso instrumento para evaluar actividades biológicas en muestras clínicas y ambientales.

Atlas y Bartha (2002), afirman que esta técnica de caracterización molecular de las poblaciones de bacterias junto con los índices de diversidad es útil para comparar diferentes ambientes y para detectar cambios significativos en la composición de las especies de una comunidad microbiana.

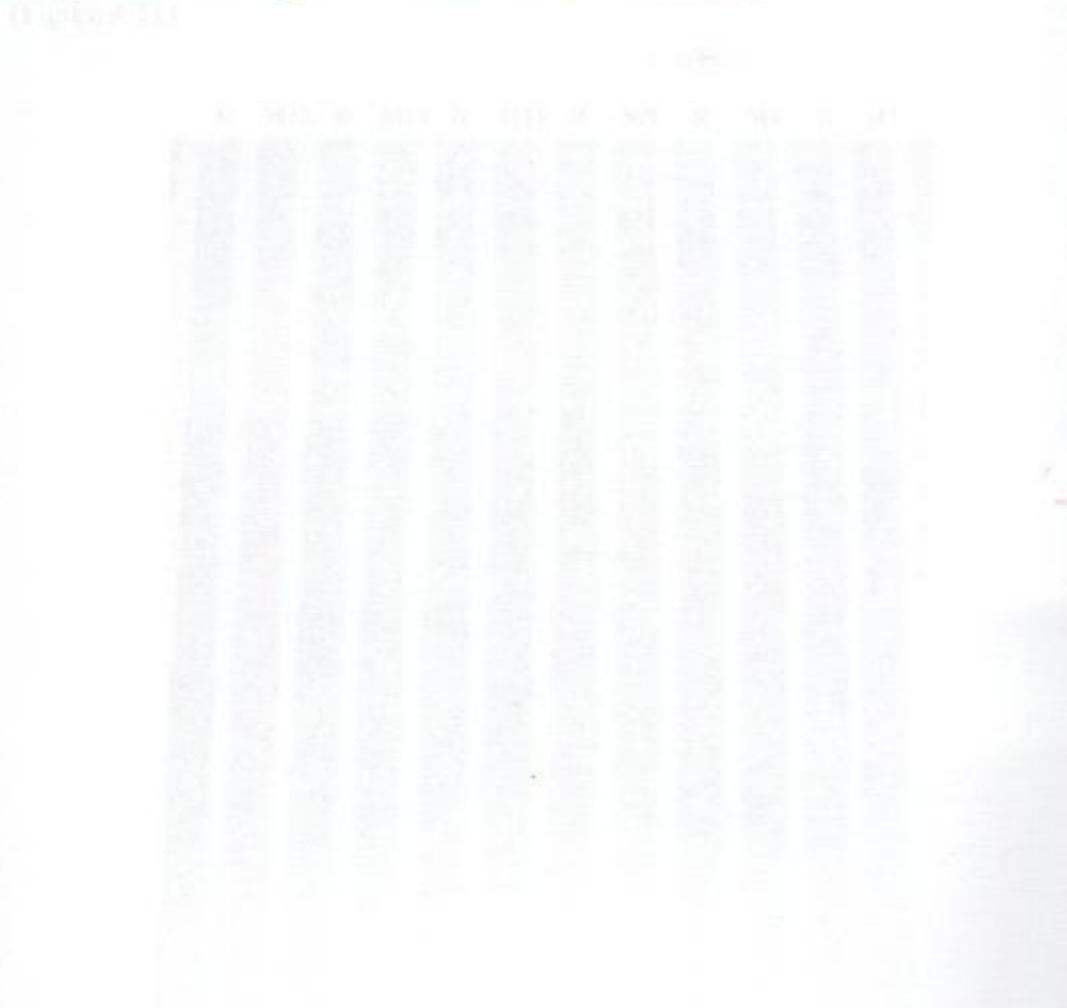


Fig. 9-11 El análisis de cuatro clones bacterianos (A-D) obtenidos de la identificación de bacterias que ocurren en condiciones de laboratorio. El análisis de clones de bacterias que ocurren en condiciones de laboratorio se muestra en el panel superior. El análisis de clones de bacterias que ocurren en condiciones de laboratorio se muestra en el panel inferior.

Los bandos representados en los perfiles de densidad de la Fig. 9-11 fueron utilizados para estimar la diversidad bacteriana en los ambientes de laboratorio. La diversidad de especies bacterianas dentro del sistema (Fig. 9-11) se estimó utilizando el índice de diversidad de Simpson (Simpson's index) (Simpson, 1949). Los análisis

3.1.2.1. *Análisis de Imagen.*

El análisis de imagen de los perfiles de DGGE se realizó con bandas que tenían como mínimo un 5 % de intensidad respecto a la intensidad total de la línea (Figura # 11).

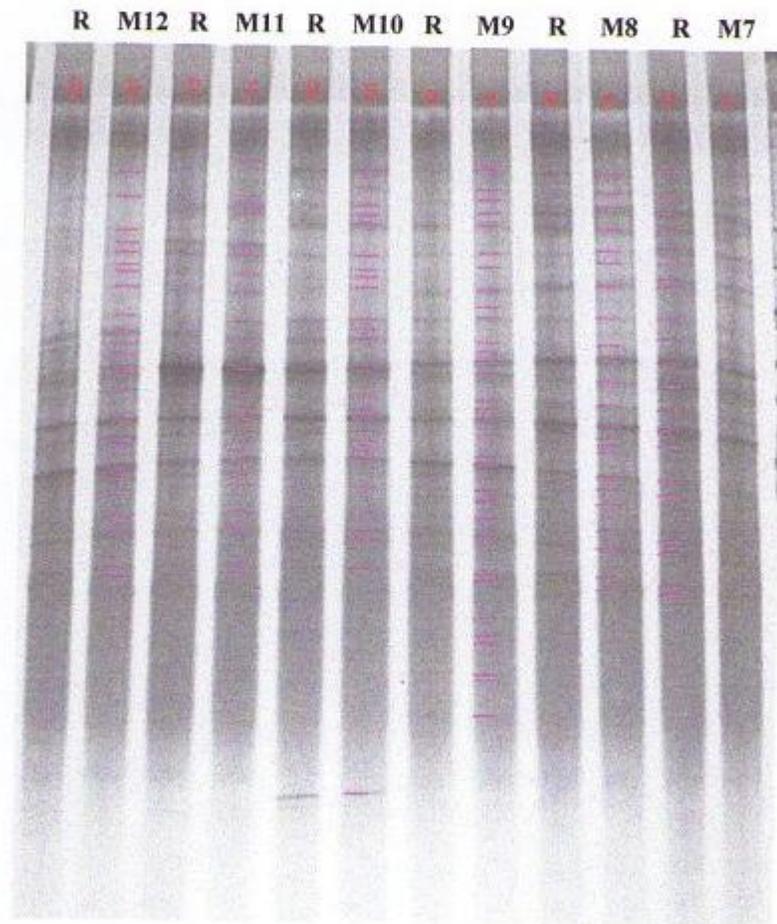


Fig. # 11 El Análisis de imagen (Gene Profiler 4.05) permite la identificación de bandas que reúnen las condiciones de intensidad establecidas (5 % del total de la línea). M7 - M12 muestras de agua piscina # 15, muestreos del 7 al 12 (R = réplicas de las muestras).

Las bandas obtenidas en los perfiles derivados de DGGE fueron utilizados para estimar la diversidad bacteriana y su intensidad relativa representó la dominancia de especies particulares dentro del sistema (Calvo-Bado et al., 2003). Los análisis

de diversidad fueron usados para determinar niveles de dominancia, riqueza de especies y diversidad genética (Stach et al., 2003). Curtis et al., (2002) y Dunbar et al., (2002), explican que la estimación de la diversidad bacteriana se requiere para entender la biogeografía bacteriana, conjunto de comunidades y procesos ecológicos presentes en los sistemas estudiados.

15, 4 20 y 6-1, orientados, y parte de las perfiles de los días de 2014-16. Los datos son los valores máximos y mínimos.

Tabla 6-4. Registro de los Índices de Diversidad bacteriana en los sistemas de agua dulce de 15, 4 20 y 6-1 durante el periodo de muestreo.

Muestra	Índice de Pielou			Índice de Simpson			Índice de Shannon		
	Máximo	Mínimo	Media	Máximo	Mínimo	Media	Máximo	Mínimo	Media
1	0.15	0.12	0.13	0.05	0.04	0.045	0.08	0.07	0.075
2	0.18	0.14	0.16	0.06	0.05	0.055	0.10	0.09	0.095
3	0.20	0.16	0.18	0.07	0.06	0.065	0.12	0.11	0.115
4	0.22	0.18	0.20	0.08	0.07	0.075	0.14	0.13	0.135
5	0.25	0.20	0.22	0.09	0.08	0.085	0.16	0.15	0.155
6	0.28	0.22	0.25	0.10	0.09	0.095	0.18	0.17	0.175
7	0.30	0.24	0.27	0.11	0.10	0.105	0.20	0.19	0.195
8	0.32	0.26	0.29	0.12	0.11	0.115	0.22	0.21	0.215
9	0.35	0.28	0.31	0.13	0.12	0.125	0.24	0.23	0.235
10	0.38	0.30	0.34	0.14	0.13	0.135	0.26	0.25	0.255
11	0.40	0.32	0.36	0.15	0.14	0.145	0.28	0.27	0.275
12	0.42	0.34	0.38	0.16	0.15	0.155	0.30	0.29	0.295
13	0.45	0.36	0.40	0.17	0.16	0.165	0.32	0.31	0.315
14	0.48	0.38	0.43	0.18	0.17	0.175	0.34	0.33	0.335
15	0.50	0.40	0.45	0.19	0.18	0.185	0.36	0.35	0.355
16	0.52	0.42	0.47	0.20	0.19	0.195	0.38	0.37	0.375
17	0.55	0.44	0.49	0.21	0.20	0.205	0.40	0.39	0.395
18	0.58	0.46	0.51	0.22	0.21	0.215	0.42	0.41	0.415
19	0.60	0.48	0.53	0.23	0.22	0.225	0.44	0.43	0.435
20	0.62	0.50	0.55	0.24	0.23	0.235	0.46	0.45	0.455
21	0.65	0.52	0.57	0.25	0.24	0.245	0.48	0.47	0.475
22	0.68	0.54	0.59	0.26	0.25	0.255	0.50	0.49	0.495
23	0.70	0.56	0.61	0.27	0.26	0.265	0.52	0.51	0.515
24	0.72	0.58	0.63	0.28	0.27	0.275	0.54	0.53	0.535
25	0.75	0.60	0.65	0.29	0.28	0.285	0.56	0.55	0.555
26	0.78	0.62	0.67	0.30	0.29	0.295	0.58	0.57	0.575
27	0.80	0.64	0.69	0.31	0.30	0.305	0.60	0.59	0.595
28	0.82	0.66	0.71	0.32	0.31	0.315	0.62	0.61	0.615
29	0.85	0.68	0.73	0.33	0.32	0.325	0.64	0.63	0.635
30	0.88	0.70	0.75	0.34	0.33	0.335	0.66	0.65	0.655
31	0.90	0.72	0.77	0.35	0.34	0.345	0.68	0.67	0.675
32	0.92	0.74	0.79	0.36	0.35	0.355	0.70	0.69	0.695
33	0.95	0.76	0.81	0.37	0.36	0.365	0.72	0.71	0.715
34	0.98	0.78	0.83	0.38	0.37	0.375	0.74	0.73	0.735
35	1.00	0.80	0.85	0.39	0.38	0.385	0.76	0.75	0.755
36	1.02	0.82	0.87	0.40	0.39	0.395	0.78	0.77	0.775
37	1.05	0.84	0.89	0.41	0.40	0.405	0.80	0.79	0.795
38	1.08	0.86	0.91	0.42	0.41	0.415	0.82	0.81	0.815
39	1.10	0.88	0.93	0.43	0.42	0.425	0.84	0.83	0.835
40	1.12	0.90	0.95	0.44	0.43	0.435	0.86	0.85	0.855
41	1.15	0.92	0.97	0.45	0.44	0.445	0.88	0.87	0.875
42	1.18	0.94	0.99	0.46	0.45	0.455	0.90	0.89	0.895
43	1.20	0.96	1.01	0.47	0.46	0.465	0.92	0.91	0.915
44	1.22	0.98	1.03	0.48	0.47	0.475	0.94	0.93	0.935
45	1.25	1.00	1.05	0.49	0.48	0.485	0.96	0.95	0.955
46	1.28	1.02	1.07	0.50	0.49	0.495	0.98	0.97	0.975
47	1.30	1.04	1.09	0.51	0.50	0.505	1.00	0.99	0.995
48	1.32	1.06	1.11	0.52	0.51	0.515	1.02	1.01	1.015
49	1.35	1.08	1.13	0.53	0.52	0.525	1.04	1.03	1.035
50	1.38	1.10	1.15	0.54	0.53	0.535	1.06	1.05	1.055
51	1.40	1.12	1.17	0.55	0.54	0.545	1.08	1.07	1.075
52	1.42	1.14	1.19	0.56	0.55	0.555	1.10	1.09	1.095
53	1.45	1.16	1.21	0.57	0.56	0.565	1.12	1.11	1.115
54	1.48	1.18	1.23	0.58	0.57	0.575	1.14	1.13	1.135
55	1.50	1.20	1.25	0.59	0.58	0.585	1.16	1.15	1.155
56	1.52	1.22	1.27	0.60	0.59	0.595	1.18	1.17	1.175
57	1.55	1.24	1.29	0.61	0.60	0.605	1.20	1.19	1.195
58	1.58	1.26	1.31	0.62	0.61	0.615	1.22	1.21	1.215
59	1.60	1.28	1.33	0.63	0.62	0.625	1.24	1.23	1.235
60	1.62	1.30	1.35	0.64	0.63	0.635	1.26	1.25	1.255
61	1.65	1.32	1.37	0.65	0.64	0.645	1.28	1.27	1.275
62	1.68	1.34	1.39	0.66	0.65	0.655	1.30	1.29	1.295
63	1.70	1.36	1.41	0.67	0.66	0.665	1.32	1.31	1.315
64	1.72	1.38	1.43	0.68	0.67	0.675	1.34	1.33	1.335
65	1.75	1.40	1.45	0.69	0.68	0.685	1.36	1.35	1.355
66	1.78	1.42	1.47	0.70	0.69	0.695	1.38	1.37	1.375
67	1.80	1.44	1.49	0.71	0.70	0.705	1.40	1.39	1.395
68	1.82	1.46	1.51	0.72	0.71	0.715	1.42	1.41	1.415
69	1.85	1.48	1.53	0.73	0.72	0.725	1.44	1.43	1.435
70	1.88	1.50	1.55	0.74	0.73	0.735	1.46	1.45	1.455
71	1.90	1.52	1.57	0.75	0.74	0.745	1.48	1.47	1.475
72	1.92	1.54	1.59	0.76	0.75	0.755	1.50	1.49	1.495
73	1.95	1.56	1.61	0.77	0.76	0.765	1.52	1.51	1.515
74	1.98	1.58	1.63	0.78	0.77	0.775	1.54	1.53	1.535
75	2.00	1.60	1.65	0.79	0.78	0.785	1.56	1.55	1.555
76	2.02	1.62	1.67	0.80	0.79	0.795	1.58	1.57	1.575
77	2.05	1.64	1.69	0.81	0.80	0.805	1.60	1.59	1.595
78	2.08	1.66	1.71	0.82	0.81	0.815	1.62	1.61	1.615
79	2.10	1.68	1.73	0.83	0.82	0.825	1.64	1.63	1.635
80	2.12	1.70	1.75	0.84	0.83	0.835	1.66	1.65	1.655
81	2.15	1.72	1.77	0.85	0.84	0.845	1.68	1.67	1.675
82	2.18	1.74	1.79	0.86	0.85	0.855	1.70	1.69	1.695
83	2.20	1.76	1.81	0.87	0.86	0.865	1.72	1.71	1.715
84	2.22	1.78	1.83	0.88	0.87	0.875	1.74	1.73	1.735
85	2.25	1.80	1.85	0.89	0.88	0.885	1.76	1.75	1.755
86	2.28	1.82	1.87	0.90	0.89	0.895	1.78	1.77	1.775
87	2.30	1.84	1.89	0.91	0.90	0.905	1.80	1.79	1.795
88	2.32	1.86	1.91	0.92	0.91	0.915	1.82	1.81	1.815
89	2.35	1.88	1.93	0.93	0.92	0.925	1.84	1.83	1.835
90	2.38	1.90	1.95	0.94	0.93	0.935	1.86	1.85	1.855
91	2.40	1.92	1.97	0.95	0.94	0.945	1.88	1.87	1.875
92	2.42	1.94	1.99	0.96	0.95	0.955	1.90	1.89	1.895
93	2.45	1.96	2.01	0.97	0.96	0.965	1.92	1.91	1.915
94	2.48	1.98	2.03	0.98	0.97	0.975	1.94	1.93	1.935
95	2.50	2.00	2.05	0.99	0.98	0.985	1.96	1.95	1.955
96	2.52	2.02	2.07	1.00	0.99	0.995	1.98	1.97	1.975
97	2.55	2.04	2.09	1.01	1.00	1.005	2.00	1.99	1.995
98	2.58	2.06	2.11	1.02	1.01	1.015	2.02	2.01	2.015
99	2.60	2.08	2.13	1.03	1.02	1.025	2.04	2.03	2.035
100	2.62	2.10	2.15	1.04	1.03	1.035	2.06	2.05	2.055

3.1.3. ÍNDICES DE DIVERSIDAD

En la Tabla # 4 y Tabla # 5, se observan los valores de los Índices de Diversidad (Índice de Riqueza de Especies, Índice de Shannon Weaver y el Índice de Homogeneidad de Especies) de las muestras de agua y sedimento de las piscinas # 15, # 20 y G-1, calculados a partir de los perfiles generados por DGGE. Así como sus valores máximos y mínimos.

Tabla # 4. Registro de los Índices de Diversidad calculados para las muestras de agua, piscinas # 15, # 20 y G-1 durante el periodo de muestreo.

ÍNDICES DE DIVERSIDAD EN AGUA									
Muestreo	Riqueza de Especies			Shannon-Weaver			Homogeneidad de Especies		
	Piscina G-1	Piscina 15	Piscina 20	Piscina G-1	Piscina 15	Piscina 20	Piscina G-1	Piscina 15	Piscina 20
1	13	15	13	1.537	1.88	2.216	0.599	0.694	0.864
2	16	17	12	2.121	2.139	2.073	0.765	0.755	0.834
3	21	17	17	2.336	2.067	2.365	0.767	0.73	0.835
4	17	14	19	2.068	2.079	2.405	0.73	0.788	0.817
5	15	18	16	2.059	2.21	2.38	0.76	0.765	0.858
6	13	15	21	1.817	1.963	2.692	0.709	0.725	0.884
7	18	21	23	2.057	2.717	2.785	0.712	0.892	0.888
8	26	23	22	2.356	2.784	2.701	0.723	0.888	0.874
9	25	33	18	2.456	3.022	2.541	0.763	0.864	0.879
10	18	26	14	2.042	2.635	2.166	0.706	0.809	0.821
11	17	23	18	2.098	2.446	2.342	0.741	0.78	0.81
12	10	25	25	1.83	2.87	2.786	0.795	0.892	0.866
13	13	18	26	2.203	2.193	2.747	0.859	0.759	0.843
14	10	11	24	1.922	1.849	2.634	0.835	0.771	0.829
15	11	19	24	2.101	2.271	2.477	0.876	0.771	0.78
16	24	13	15	2.507	2.056	2.192	0.789	0.802	0.81
17	16	15	23	2.274	2.174	2.582	0.82	0.803	0.823
Promedio	16.65	19.00	19.41	2.10	2.32	2.48	0.76	0.79	0.84
Máx.	26	33	26	2.507	3.022	2.786	0.876	0.892	0.888
Mín.	10	11	12	1.537	1.849	2.073	0.599	0.725	0.78

Tabla # 5. Registro de los Índices de Diversidad calculados para las muestras de sedimento, piscinas # 15, # 20 y G-1 durante el período de muestreo.

ÍNDICES DE DIVERSIDAD EN SEDIMENTO									
Muestreo	Riqueza de Especies			Shannon-Weaver			Homogeneidad de Especies		
	Piscina G-1	Piscina 15	Piscina 20	Piscina G-1	Piscina 15	Piscina 20	Piscina G-1	Piscina 15	Piscina 20
1	14	13	13	2.065	2.429	2.077	0.782	0.947	0.81
2	16	16	20	2.071	2.361	2.408	0.747	0.851	0.804
3	14	21	16	2.207	2.197	2.211	0.836	0.722	0.797
4	13	11	-	2.253	2.081	-	0.878	0.868	-
5	14	27	19	2.06	2.753	2.309	0.781	0.835	0.784
6	15	20	19	2.378	2.563	2.578	0.878	0.855	0.876
7	8	22	17	1.674	2.822	2.465	0.805	0.913	0.87
8	18	27	14	2.371	2.96	2.121	0.82	0.898	0.804
9	14	11	18	2.153	1.81	2.609	0.816	0.755	0.903
10	11	12	17	2.003	1.928	2.175	0.835	0.776	0.768
11	12	11	19	2.157	1.839	2.292	0.868	0.767	0.778
12	14	11	14	2.31	1.986	2.279	0.875	0.828	0.864
13	12	9	15	1.744	1.697	2.125	0.702	0.772	0.785
14	11	14	12	1.841	2.33	2.003	0.768	0.883	0.806
15	15	15	15	2.287	2.273	2.214	0.844	0.839	0.818
16	12	12	16	1.867	1.817	2.435	0.752	0.731	0.878
17	10	9	11	1.731	1.841	1.736	0.752	0.838	0.724
Promedio	13.12	15.35	15.94	2.07	2.22	2.25	0.81	0.83	0.82
Máx.	18	27	20	2.378	2.822	2.609	0.878	0.947	0.903
Mín.	8	9	11	1.674	1.697	1.736	0.702	0.722	0.724

En la Tabla # 6, se presentan los valores promedios de los Índices de Diversidad (Índice de Riqueza de Especies, Índice de Shannon Weaver y el Índice de Homogeneidad de Especies) de las muestras de agua y sedimento de los sistemas de cultivo, calculados a partir de los perfiles generados por la técnica de DGGE, así como las diferencias significativas reveladas a partir del Análisis de Varianza.

Tabla # 6. Índices de diversidad calculados a partir de datos generados por DGGE.

Análisis	Índices de diversidad	Valores Promedio				ANOVA	
		Sistema Intensivo		Sistema Semi-intensivo		Intensivo vs. semi-intensivo	
		Agua	Sedimento	Agua	Sedimento	Agua	Sedimento
DGGE	Riqueza de Especies (S)	16.65	13.12	19.21	15.99	P > 0.05	P < 0.05
	Shannon Weaver (H')	2.105	2.069	2.395	2.261	P < 0.05	P < 0.05
	Evenness (E)	0.7617	0.8082	0.8177	0.8255	P < 0.05	P > 0.05

3.1.3.1. ÍNDICE DE RIQUEZA DE ESPECIES, ÍNDICE DE SHANNON WEAVER, ÍNDICE DE HOMOGENEIDAD DE ESPECIES EN AGUA Y SEDIMENTO

Índice de Riqueza de Especies.

Es un Índice que permite estimar la distribución y el número de especies endémicas y cosmopolitas. Recientes trabajos enfatizan la importancia de proporcionar estimados de riqueza de especies en comunidades y estudiar los procesos que afectan la composición de comunidades y su función en los ecosistemas (Martín, 2002).

Para las muestras de agua, el índice de Riqueza de especies presentó en general valores más altos en las piscinas semi-intensivas, piscina # 15 (11 a 33 especies), piscina # 20 (12 a 26 especies); en tanto el sistema intensivo, piscina G-1 presentó

valores entre 10 y 26 especies (Figura # 12, Tabla # 4). El análisis de varianza, con el índice de Riqueza de Especies entre el sistema semi-intensivo e intensivo durante el ciclo de cultivo no indicó la existencia de diferencias significativas ($p > 0.05$) (Tabla # 6).

De igual manera en las muestras de sedimento el Índice de riqueza de especies presentó en general valores más altos en las piscinas semi-intensivas, piscina # 15 (9 a 27 especies), piscina # 20 (11 a 20 especies); en tanto el sistema intensivo presentó valores entre 8 a 18 especies (Figura # 13, Tabla # 5). El análisis de varianza con el índice de Riqueza de especies entre el sistema semi-intensivo e intensivo durante el ciclo de cultivo indicó la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$), (Tabla # 6).

Índice de Shannon Weaver.

Es un índice de diversidad general, que aumenta su valor con el número de especies (Riqueza), también se incrementa cuando la proporción de organismos esta distribuida más uniformemente entre las especies. Es ampliamente usado por ecologistas (Nubel et al., 1999), pues es altamente sensitivo para estimar la frecuencia de diferentes especies (Martín, 2002).

En nuestro estudio, el índice de “Shannon Weaver” presenta los valores promedios más altos en la piscina # 20, reflejando en parte los valores registrados

del Índice de riqueza de especies. En tanto en las piscinas # 15 y G-1 el índice de Shannon Weaver presentó en ciertos muestreos valores más altos a pesar de que esos muestreos no registraban los Índices de riqueza de especies más altos, este comportamiento es explicable porque el índice de Shannon Weaver depende también de la abundancia de las especies en la comunidad bacteriana (proporción de cada una de las especies) y no solo de la riqueza que presente. (Figura # 12, Figura # 13).

El análisis de varianza con los valores del Índice de Shannon Weaver tanto para muestras de agua y sedimento entre el sistema semi-intensivo e intensivo durante el ciclo de cultivo indicó la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) (Tabla # 6).

Índice de Homogeneidad de Especies.

El índice de “Homogeneidad de Especies” ha sido propuesto como una medida de diversidad que incorpora el Índice de Riqueza de Especies y el Índice de Shannon Weaver. El valor de este Índice puede variar entre 0 y 1, y nos da una medida de el ratio de la diversidad observada, es decir que tan homogéneas son las proporciones de los diversos individuos presentes (Rønn et al., 2002). La homogeneidad es baja si la intensidad de un número pequeño de bandas en los geles es dominante y alta si la intensidad de todas las bandas es casi igual.

Los valores promedio obtenidos para el Índice de Homogeneidad de Especies en nuestro estudio, revelaron valores más cercanos a 1 en las muestras de sedimento para ambos sistemas en comparación con las muestras de agua (Tabla # 6). Al parecer las comunidades microbianas están distribuidas más uniformemente en los sedimentos de las piscinas de cultivo, esto podría deberse a que, en el sedimento, por ser un medio menos cambiante que el agua de cultivo los microorganismos pueden llegar a adaptarse más fácilmente y cumplir un rol funcional dentro del sistema. (Figura # 12 y # Figura # 13).

El análisis de varianza entre los sistemas de cultivo detectó diferencias significativas entre las muestras de agua ($p < 0.05$), no así entre las muestras de sedimento donde no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) (Tabla # 6).

Fig. #12 Índice de Homogeneidad de Especies de las comunidades microbianas en los sedimentos de las piscinas de cultivo de algas de agua dulce.

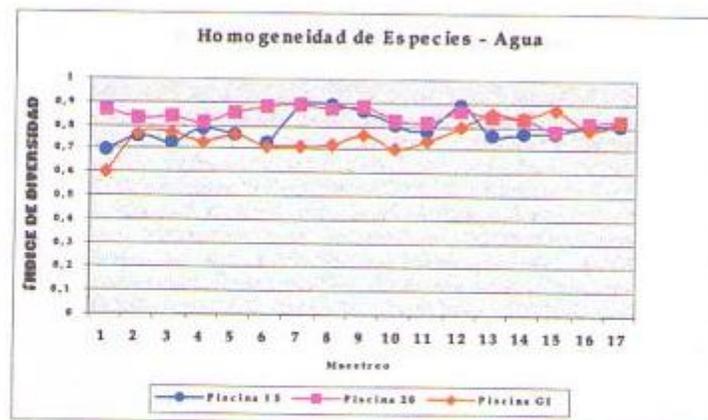
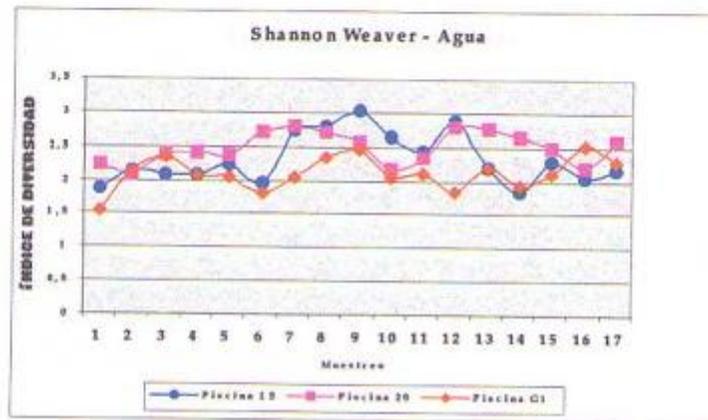
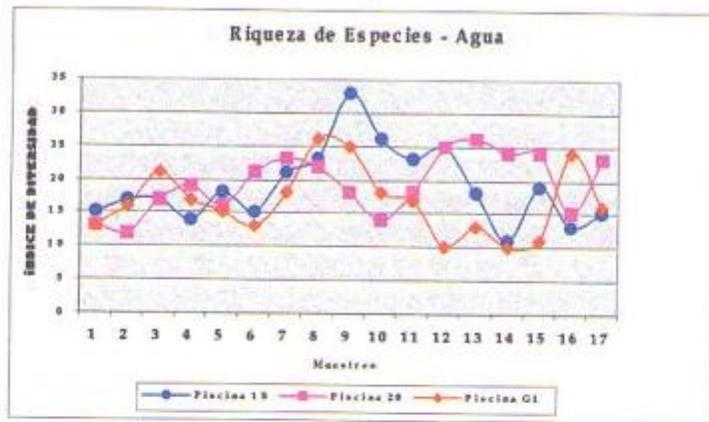


Fig. # 12 Índices de diversidad en agua: Riqueza de Especies, Shannon Weaver y Homogeneidad de Especies durante los ciclos de cultivo de las piscinas # 15, # 20 y G-I.

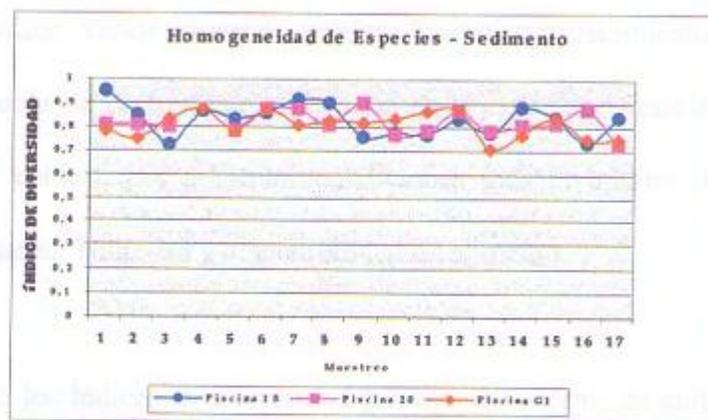
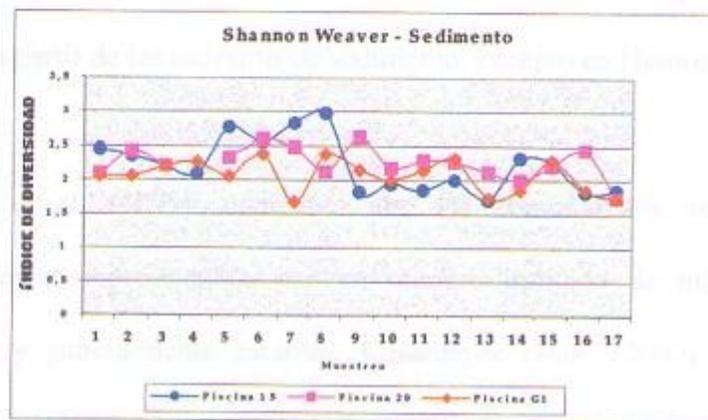
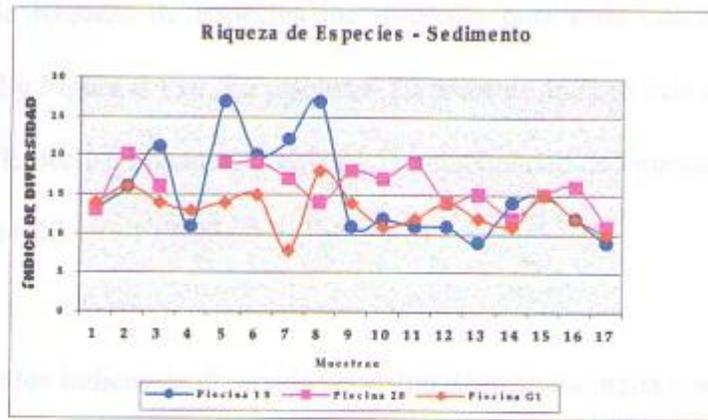


Fig. # 13 Índices de diversidad en sedimento: Riqueza de Especies, Shannon Weaver y Homogeneidad de Especies durante los ciclos de cultivo de las piscinas # 15, # 20 y G-1.

El Índice de Riqueza de Especies fue diferente para cada una de las piscinas (Figura # 12 y Figura # 13). La piscina # 20 presentó Índices más altos tanto para Riqueza de Especies, Shannon Weaver y Homogeneidad de Especies con respecto a la piscinas # 15 y G-1 (Tabla # 4, Tabla # 5).

Al comparar los Índices de diversidad por tipo de muestra (agua y sedimento) para ambos sistemas de cultivo se observa que los Índices obtenidos a partir del agua presentan en general Índices de Diversidad más altos en comparación con los calculados a partir de las muestras de sedimento, excepto en Homogeneidad.

Gelsomino et al. (1999), comentan que las comunidades microbianas del sedimento están representadas por un número limitado de microorganismos dominantes y generalmente estables, Casamayor et al. (2000) citan que los ecosistemas pueden ser ricos en especies, pero la Homogeneidad es muchas veces baja. Krebs (2003), comenta que el número de bacterias en el sedimento es variable porque varios factores pueden limitar su crecimiento, las mayores concentraciones de bacterias se encuentran en la capa superficial del fondo de las piscinas de cultivo, por presentar condiciones más favorables de temperatura, oxígeno disuelto, humedad y disponibilidad de alimento.

Comparando los Índices de Diversidad por tipo de sistema de cultivo (Intensivo, Semi-Intensivo) se aprecia que el sistema semi-intensivo presenta Índices de Diversidad en general mayores (Tabla # 6).

Los valores promedio de Índices de Diversidad en agua en el sistema intensivo y sistema semi-intensivo (Tabla # 6) son superiores a los límites detectados por Nubel et al. (1999), quienes citan índices de 10.29 para riqueza de especies y 1.575 para Shannon Weaver en muestras de aguas hipersalinas, lo que se explica por tratarse de un hábitat extremo caracterizado por una fuerte presión ambiental que obliga a una selección de los organismos que lo habitan, relativamente pocos microorganismos pueden crecer en aguas muy salinas, así por ejemplo la biota de los lagos salados suele restringirse a unas pocas especies (Atlas y Bartha, 2002).

en los sistemas de engorde de salmones se pueden observar en gran parte de los

Mientras, Murray et al. (1996), en un estudio realizado en estuarios de California citan índices entre 20 y 26 para Riqueza de Especies los cuales son superiores a los límites detectados en muestreos de los sistemas de engorde, generalmente los estuarios son considerados uno de los hábitat más ricos en nutrientes y disponibilidad de sustratos para el crecimiento bacteriano lo que explicaría esta diferencia.

de los microorganismos, especialmente algunos bacterias, protozoarios y algas.

Los valores promedio de Índices de Diversidad en Sedimento en el sistema intensivo y sistema semi-intensivo (Tabla # 6), son inferiores a los límites detectados por Rønn et al. (2002) en su estudio sobre el efecto del pastoreo de protozoarios sobre comunidades microbianas en un microcosmos de sedimento, quienes citan valores de 45.3 para el Índice de Riqueza de Especies, 1.49 para el Índice de Shannon Weaver y 0.90 para el Índice de Homogeneidad de Especies. Sin embargo, nuestros Índices son superiores a los detectados por Koizumi et al.

(2003) quienes citan valores de 1.20 a 1.34 para el Índice de Shannon Weaver en su estudio sobre comunidades microbianas (16S rDNA) en sedimento relacionado a la profundidad. Al comparar estos estudios se puede observar que el Índice de Riqueza de Especies esta influenciado fuertemente por el ambiente y las condiciones del medio. En el estudio de Koizumi et al. (2003) las comunidades microbianas varían según la profundidad, en los estudios de Rønn et al. (2002) dependen de los nutrientes, contenido de materia orgánica y sustrato el cual favorece una mayor diversidad microbiana, en tanto que la Riqueza de Especies en los sistemas de engorde de camarón al parecer depende en gran parte de las condiciones del medio ambiente o está influenciada por el sistema de cultivo tipo invernadero en el caso del sistema intensivo las comunidades microbianas del sedimento tienen una gran diversidad fenotípica y genotípica (Sessitsch et al., 2001), en todo caso el desarrollo de comunidades se encuentran adaptados a la disponibilidad de nutrientes (Dilly et al., 2004). Generalmente, el contenido de materia orgánica en un ecosistema suele ser el factor limitante para el crecimiento de los microorganismos heterótrofos, algunos necesitan niveles relativamente elevados de materia orgánica, mientras que otros sólo crecen a concentraciones relativamente bajas.

La variación del Índice de Shannon Weaver en nuestro estudio es el reflejo de que una o pocas especies dominaron en los muestreos durante el ciclo del cultivo, sin embargo cabe mencionar que estos valores están relacionados directamente con la riqueza de especies e intensidad relativa de las bandas, es decir cuando la Riqueza

de Especies fue alto y la intensidad de las bandas estuvo uniforme los valores de Shannon Weaver fueron altos y estos a su vez se vieron reflejados en la Homogeneidad de Especies (Evenness). Estos resultados coinciden con las afirmaciones de Casamayor et al. (2000); Schauer, et al. (2003), quienes comentan que los cambios en la intensidad relativa de las bandas individuales de los perfiles generados por DGGE reflejan el incremento y disminución de la población bacteriana. Sin embargo cabe mencionar que la Homogeneidad depende de las condiciones presentes durante el ciclo del cultivo, condiciones tales como los parámetros físicos y químicos: temperatura, salinidad, pH, oxígeno disuelto, SST, MOA y MOS, en efecto Muylaert et al. (2002), comentan que la composición y concentración de materia orgánica regula la composición de las comunidades bacterianas. Murray et al. (1996), lo confirman en un estudio donde encuentran que diferencias en la cantidad de materia orgánica muestra comunidades de Bacterioplancton diferentes.

Las variaciones observadas en todos los Índices a través del tiempo de estudio reflejan que las comunidades bacterianas no se encuentran estables, sino que se hayan en un constante cambio influenciado en gran parte por las variaciones ambientales a las que está sujeto el medio donde se desarrollan.

Las diferentes especies bacterianas constituyentes de la comunidad pueden adaptarse constantemente a estos cambios y nuevas condiciones medioambientales, es por esto, que la composición de la comunidad bacteriana

cambia gradualmente y muchas especies bacterianas que aparecen en una muestra por varios días pueden luego desaparecer (Schauer et al., 2003; Riemann & Middelboe, 2002).

Las diferencias en el contenido de materia orgánica en los sistemas de cultivo puede también tener un efecto sobre la composición de comunidades microbianas y esto a su vez puede verse reflejado en los perfiles generados. En estudios de hábitat acuáticos, solos unos pocos trabajos citan los efectos de factores específicos sobre la estructura de las comunidades bacterianas, y estos trabajos están generalmente relacionados a los efectos provocados por perturbaciones antropogénicas y / o cambios ambientales naturales (temperatura, salinidad, etc. (Morris et al., 2002). Schauer et al., (2003), afirman que estos factores pueden contribuir al establecimiento y mantenimiento de una estructura estable en la comunidad.

La diversidad bacteriana es una expresión de la estructura de la comunidad en general, la cual resulta de la interacción entre elementos de un sistema. Algunos cambios ambientales pueden favorecer el crecimiento rápido de ciertos microorganismos y el desarrollo de comunidades microbianas complejas, aunque para toda especie representa una ventaja evolutiva ir aumentando normalmente su población cuando las circunstancias son favorables, el desarrollo de altos niveles de diversidad probablemente está relacionado a un incremento importante de interacciones bióticas dentro de la comunidad.

3.2. Parámetros Abióticos

3.2.1. Temperatura (°C).

En la Tabla # 7 y Figura # 14 se pueden observar los valores de la temperatura del agua de las piscinas # 15, # 20 y G-1 registrada durante el ciclo de cultivo.

Tabla # 7. Registro de temperatura de las piscina # 15, # 20 y G-1 durante el período de muestreo.

Temperatura °C			
Muestreo	Piscina 15	Piscina 20	Piscina G-1
1	24.6	24.8	31
2	24.2	23.5	30.9
3	23	23.3	31.5
4	24.2	24.4	30.4
5	26.5	25.4	29.4
6	25.2	24.7	30.5
7	25.5	25.4	31.2
8	24.6	24.8	30.4
9	25.1	24.2	31.9
10	24.9	24.8	29.3
11	24.8	25	33.2
12	23.9	24	31.9
13	24.3	24.8	32.7
14	23.8	23.7	32.6
15	26.9	25.6	32.8
16	26.4	26.3	34
17	28.4	27.1	32.8
Promedio	25.1	24.8	31.6
Mín.	23	23.3	29.3
Máx.	28.4	27.1	34

La piscina G-1 se diferencia claramente de las piscinas # 15 y # 20 porque la temperatura del agua registrada es relativamente alta con un promedio de 31.6 °C, lo que se explica por el sistema con cubierta tipo invernadero (estructura metálica

y plásticos), mientras que las piscinas # 15 y # 20 están al aire libre sin ninguna cubierta y por tanto sus temperaturas promedio son inferiores (Tabla # 7).

y la influencia del tiempo

Al comparar los valores de temperatura del agua en cada una de las piscinas (# 15, # 20 y G-1) entre inicio y final del ciclo del cultivo (Figura # 14), se observa un ligero incremento a través del tiempo. Este incremento de temperatura en el tiempo se explicaría con las variaciones de temperatura normales atribuibles al cambio de estación (verano - invierno). Agurto (2003) afirma que las variaciones en la temperatura ocurren principalmente a consecuencia del cambio de estación climática de Verano a Invierno, donde la incidencia del sol es mayor sobre la superficie del agua de las piscinas de cultivo. Boyd (2001) menciona que el calor penetra por la superficie del agua y calienta la capa superficial más rápido que la del fondo. Regueira (2001) en un estudio realizado en el Golfo de Guayaquil reportó temperaturas en la superficie del agua durante la época seca de 22 a 25 °C, mientras que en la época húmeda un incremento alrededor de 28 °C, lo que coincide con los datos registrados para las piscinas # 15 y # 20 aunque no para la piscina G-1 que presentó valores de temperatura superiores durante el ciclo de cultivo debido al tipo de sistema con invernadero empleado.

una temperatura promedio de 28 a 30 °C (Tabla # 5, Tabla # 7)

Los valores de temperatura de la piscina G-1 estuvieron dentro del rango reportado para invernaderos por Sonnenholzner (2002) temperaturas entre 28 – 35 °C aceptable para el cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei*. Los valores de temperatura de las piscinas # 15 y # 20 se encuentran dentro del rango reportado

por Boyd (2001) temperaturas de 25 – 32 °C aceptables para el cultivo de camarón, estas temperaturas mas bajas se atribuyen al tipo de sistema sin cubierta y la influencia ambiental.

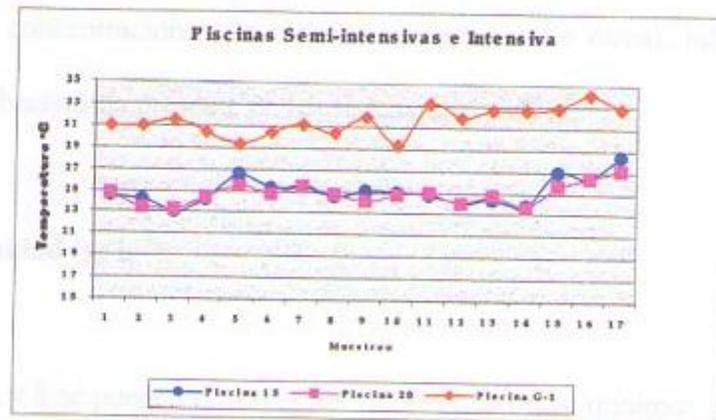


Fig. # 14.- Temperatura registrada para las piscinas # 15, # 20 y G-1 durante el ciclo de cultivo

Aunque la temperatura fue aceptable para el cultivo del camarón, no se debe olvidar que es uno de los factores ambientales más importantes ya que puede afectar la estructura de las comunidades bacterianas. En este estudio las piscinas # 15 y # 20 del sistema semi-intensivo presentaron una mayor diversidad bacteriana a temperaturas promedio de 25.1 y 24.8 °C respectivamente, en tanto la piscina G-1 del sistema intensivo presentó una menor diversidad bacteriana a una temperatura promedio de 31.6 °C (Tabla # 6, Tabla # 7). Al parecer el sistema semi-intensivo presentó una mayor diversidad bacteriana por ser un ambiente menos controlado y por tanto más susceptible de variaciones en donde las comunidades microbianas llegan a adaptarse más fácilmente. En tanto el sistema intensivo por tener un ambiente más controlado y caracterizado por altas

temperaturas, ejerce una selección de los microorganismos que lo habitan, los cuales se adaptan a las nuevas condiciones medio ambientales resultando una menor diversidad bacteriana. Al parecer la temperatura en combinación con otros factores abióticos ambientales (salinidad, pH, disponibilidad de oxígeno disuelto, nutrientes, concentraciones de carbón, nitrógeno entre otros), influyen sobre la diversidad bacteriana presente en los sistemas de cultivo.

3.2.2. Salinidad (g. L^{-1}).

En la Tabla # 8 se pueden observar los valores máximos, mínimos y promedios de la salinidad del agua registrada durante el ciclo del cultivo de las piscinas # 15, # 20 y G-1.

La salinidad del agua de las piscinas # 15 y # 20 registradas durante el ciclo de cultivo (Figura # 15) se ubica entre $35 - 45 \text{ g. L}^{-1}$ correspondiendo a parte del segundo mes de cultivo de las piscinas # 15 y # 20 ($37 - 40$) y ($32 - 38$) respectivamente. Posteriormente desde el tercer mes hasta el final del ciclo de cultivo ambas piscinas registran entre 38 y 45 g. L^{-1} debido a la constante ebullición por las altas temperaturas y alta humedad ambiental, lo que ocasiona que la salinidad del agua aumente a medida que avanza el ciclo de cultivo. En la piscina G-1 se registró una salinidad constante durante el ciclo de cultivo en 38 g. L^{-1} debido a la ebullición constante en el sistema de cultivo, que a su vez ocasiona

Tabla # 8. Registro de salinidad para las piscinas # 15, # 20 y G-1 durante el período de muestreo.

Salinidad g. L ⁻¹			
Muestreo	Piscina 15	Piscina 20	Piscina G-1
1	35	37	36
2	35	37	37
3	40	40	37
4	40	40	37
5	40	39	37
6	40	41	37
7	38	41	36
8	40	39	37
9	40	40	39
10	43	43	38
11	39	40	34
12	41	43	36
13	40	45	38
14	41	41	36
15	43	45	37
16	44	44	36
17	43	44	36
Promedio	40	41	37
Mín.	35	37	34
Máx.	44	45	39

La salinidad del agua de las piscinas # 15 y # 20 registrada durante el ciclo del cultivo (Figura # 15) se ubicó entre 35 – 45 g. L⁻¹, aumentando a partir del segundo muestreo en las piscinas # 15 y # 20 (35 – 40) y (37 – 40) respectivamente. Posteriormente desde estos muestreos hasta el final del ciclo del cultivo aumento manteniéndose entre 38 y 45 g. L⁻¹ debido a la evaporación causada por las altas temperaturas y días soleados. Jiménez et al. (2000), comenta que la salinidad está sometida a cambios estacionales, lo cual coincide con los datos obtenidos durante el ciclo de cultivo en donde se observa que la salinidad se incrementa en el mismo tiempo que la temperatura.

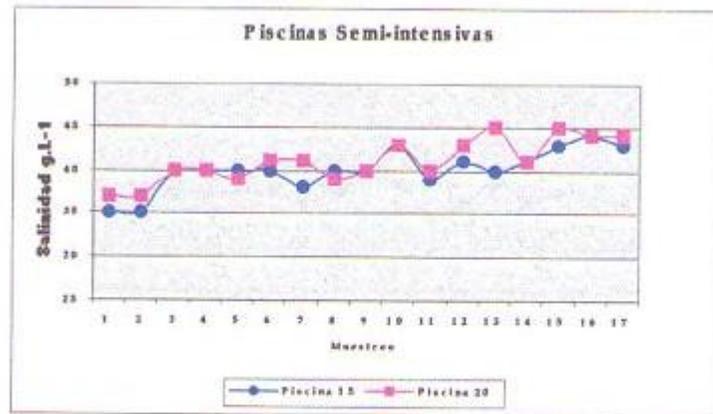


Fig. # 15.- Salinidad registrada durante el ciclo de cultivo para las piscinas # 15 y # 20

La piscina G-1 (Figura # 16), presentó valores de salinidad más estables siendo iguales al inicio y al término del ciclo de cultivo con una concentración de 36 g. L⁻¹. Sin embargo se observa una concentración máxima en el muestreo # 9 la misma que podría estar relacionada con la evaporación (temperatura 31.9 °C), disminuyendo la concentración de salinidad en el siguiente muestreo por el recambio de agua al que se sometió la piscina. Esto corrobora la afirmación de Orellana (2000), quien comenta que la evaporación y filtración aumenta progresivamente la salinidad de las piscinas camaroneras durante el desarrollo del cultivo; y Boyd (1989), quien cita que el recambio de agua disminuye la salinidad del agua durante la estación seca.

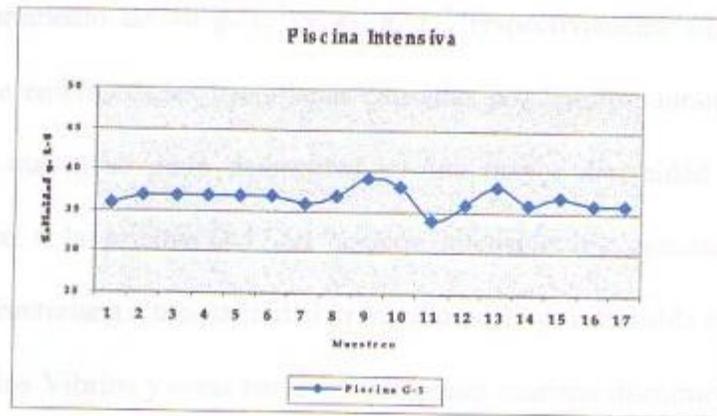


Fig. # 16.- Salinidad registrada durante el ciclo de cultivo para la piscina G-1.

Los valores de salinidad de las piscinas # 15, # 20 y G-1 estuvieron dentro del rango reportado por Olivo (2002) 35 a 47 g. L⁻¹ en su experimento relacionado con sistemas de cultivo. Olivo (2002), comenta que las especies de camarones *Penaeus vannamei* y *Penaeus monodon*, pueden cultivarse sin ningún problema en estanques cercanos a la Costa, donde la salinidad puede superar en ocasiones los 40 g. L⁻¹.

Aunque la salinidad no causó ningún efecto adverso en el cultivo del camarón, no se debe olvidar que es uno de los factores ambientales más importantes pues determina la distribución y el tipo de microorganismos presentes en los sistemas de cultivo. Solano (2003), afirma que los iones de sodio son un requerimiento absoluto para el crecimiento de la mayoría de Vibrios. Boletín Nicovita (2002) menciona que estanques de cultivo con una salinidad mayor de 40 g. L⁻¹, tiene más probabilidades de ser afectado por Vibrios y dinoflagelados. Aunque en este estudio las piscinas # 15 y # 20 del sistema semi-intensivo presentaron una

salinidad promedio de 40 g. L⁻¹ y 41 g. L⁻¹ respectivamente no se determinó síntomas de enfermedades bacterianas causadas por Vibrios durante el ciclo del cultivo, lo que sí se pudo determinar es una mayor diversidad bacteriana en comparación a la piscina G-1 del sistema intensivo que presentó una menor diversidad bacteriana a una salinidad promedio de 37 g. L⁻¹ (Tabla # 6, Tabla # 8). Al parecer los Vibrios y otras bacterias patógenas marinas disminuyen de manera significativa al descender la salinidad, por lo tanto la salinidad tiene un efecto fundamental en el control de la diversidad bacteriana.

Al analizar lo obtenido en este estudio se puede concluir que el número de especies y por tanto el Índice de riqueza de especies puede ser afectado por factores ambientales como la temperatura y la salinidad, al parecer a mayor temperatura y menor salinidad existe menor Riqueza de Especies porque solo se desarrollan organismos selectivos especializados para esas condiciones de vida, no así a una menor temperatura y mayor salinidad pues aquí se desarrolla una mayor variedad de especies. En este estudio la técnica del DGGE mostró ser sensible y capaz de detectar el efecto que puede llegar a ejercer las condiciones ambientales o el tipo de sistema de cultivo sobre la diversidad bacteriana en los sistemas de cultivo analizados.

3.2.3. Oxígeno Disuelto (mg. L^{-1}).

En la Tabla # 9, se muestran los registros de oxígeno disuelto (mg. L^{-1}) durante el ciclo de cultivo para las piscinas # 15, # 20 y G-1. Así como sus valores máximos, mínimos y promedios.

Tabla # 9. Registro de oxígeno disuelto del agua para las piscinas # 15, # 20 y G-1 durante el período de muestreo (tomada a las 10:00 – 10:30 y 8:30 AM. Respectivamente).

Oxígeno Disuelto mg. L^{-1}			
Muestreo	Piscina 15	Piscina 20	Piscina G-1
1	4.8	4.8	4.7
2	5.1	5.24	4.97
3	5.7	5.8	3.5
4	4.45	4.18	5.33
5	6.6	4.3	5.55
6	4.9	4.4	5.72
7	5.35	3.4	3.52
8	4.6	3.4	3.66
9	7.9	7	1.96
10	5.7	4.15	3.81
11	3.94	2.6	3.95
12	3.85	2.6	4.36
13	5.48	4.28	3
14	3.12	3.27	2.8
15	6.57	4.44	2.22
16	4.55	3.2	2.5
17	4.2	4.9	2.34
Promedio	5.11	4.23	3.76
Mín.	3.12	2.6	1.96
Máx.	7.9	7	5.72

Al comparar las piscinas # 15 y # 20 (Figura # 17) se puede observar un comportamiento similar en los valores máximos y mínimos de oxígeno disuelto, atribuible a que ambos sistemas son semi-intensivos y se encuentran sometidos a los mismos cambios climáticos, es decir están influenciados por la presencia o

ausencia del sol, el que permite la realización de la fotosíntesis y por ende el incremento o descenso de los niveles de oxígeno disuelto en el agua. Esto se demuestra en el muestreo # 9 (día soleado) dónde los niveles de oxígeno registrados fueron relativamente altos alcanzando 7.9 mg. L^{-1} para la piscina # 15 y 7 mg. L^{-1} para la piscina # 20. Esto es confirmado por Monserrat (2003), quien cita que la presencia del fitoplancton en piscinas acuícolas permite durante el día la acumulación de oxígeno disponible para los organismos acuáticos, la disminución de dióxido de carbono y el incremento de pH. Lin et al (1997), afirma que el bloom fitoplanctónico provee adecuados niveles de oxígeno disuelto. Hargreaves y Brunson (1996), comentan que el fitoplancton produce oxígeno al realizar la fotosíntesis, pero consume una parte en su respiración, por lo tanto la densidad de bloom de algas tiene un efecto importante en la magnitud de las fluctuaciones diarias de oxígeno disuelto y CO_2 en los estanques de cultivo.

Como otras fuentes de oxígeno además de la fotosíntesis están la difusión provocada por el viento (oxígeno atmosférico) y la renovación de agua (mediante el oxígeno disuelto del agua adicionada).

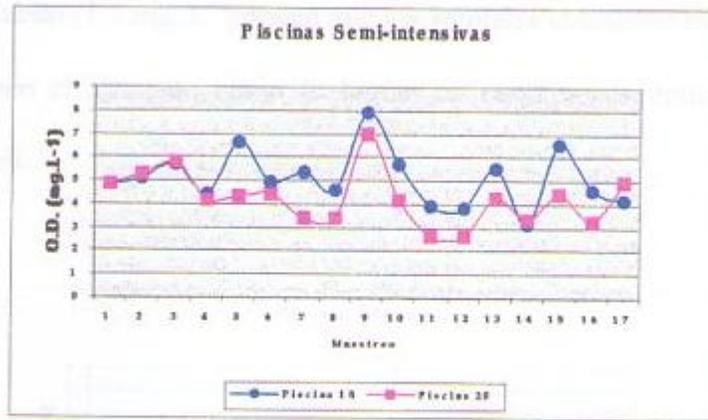


Fig. # 17.- Oxígeno disuelto del agua registrada durante el ciclo de cultivo para las piscinas # 15 y # 20.

En la Figura # 18, se observa que la piscina G-1 presentó el nivel más bajo de oxígeno disuelto en el muestreo # 9, con una concentración de 1.96 mg. L⁻¹, encontrándose en el siguiente muestreo a 3.81 mg. L⁻¹ por el recambio de agua al que se sometió la piscina. Según Boyd (1989), la disminución de los niveles de oxígeno disuelto es debida en parte al consumo ocasionado por las bacterias durante la descomposición de la materia orgánica por las bacterias. La concentración de oxígeno disuelto también depende de la temperatura, observándose que a mayor temperatura menor nivel de oxígeno disuelto y viceversa a menor temperatura mayor nivel de oxígeno. De acuerdo a Boyd (1998), las concentraciones de oxígeno disuelto declinan a medida que aumenta la temperatura y la salinidad del agua. Esta afirmación coincide con lo observado en la piscina G-1 en el muestreo # 9 se registró una concentración de oxígeno disuelto de 1.96 mg. L⁻¹, con una temperatura de 31.9 °C y salinidad de 39 g. L⁻¹. Los organismos acuáticos pueden consumir más oxígeno disuelto a 30 °C que a 20 °C (Boyd, 1998; Olivo, 2002). Las concentraciones constantemente bajas de

oxígeno disuelto (1.5 mg. L^{-1}) hacen que los animales consuman menos oxígeno y no convierten el alimento como lo harían en condiciones óptimas 5 mg. L^{-1} (Boyd, 1989).



Fig. # 18.- Oxígeno disuelto registrado durante el ciclo de cultivo de la piscina G-1.

La piscina G-1 se diferencia de las piscinas # 15 y # 20, porque los niveles de oxígeno disuelto del día son influenciados por la aireación mecánica que se le suministra durante la noche, la misma que compensa la pérdida por el consumo de oxígeno por parte del fitoplancton y los animales cultivados. La implementación de aireadores mantiene óptimas concentraciones de oxígeno disuelto en todo el volumen de agua y superficie del fondo mejorando así la capacidad de los estanques (Boyd y Tucker, 1998; Saldias, 2001)

Los valores promedio de oxígeno disuelto del agua de las piscinas # 15y # 20, se encuentran dentro del rango reportado por Boyd y Tucker (1998) $4 - 12 \text{ mg. L}^{-1}$; y Olivo (2002) $4 \text{ a } 8 \text{ mg. L}^{-1}$ en su experimento relacionado a sistemas de cultivo.

Sin embargo estuvieron por encima del valor promedio de la piscina G-1, lo que puede reflejar el hecho de que son sistemas diferentes, las piscinas # 15 y # 20 pertenecen al sistema semi-intensivo abierto (menor número de organismos cultivados por m^2), donde el oxígeno se adquiere mediante la fotosíntesis y la difusión atmosférica, mientras que en el sistema intensivo (mayor número de organismos cultivados por m^2) y el oxígeno depende en mayor parte de la aireación mecánica suministrada cada noche y por el hacinamiento existe un mayor consumo de oxígeno en comparación al semi-intensivo.

Durante el ciclo de cultivo se presentaron diferencias significativas entre las piscinas # 20 y # 15 ($p < 0,05$), no así entre piscina G-1 y piscina # 15; piscina G-1 y piscina # 20, donde no se presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

3.2.4. pH (Potencial de Hidrógeno).

En la Tabla # 10, se muestran los valores de pH registrados durante el ciclo de cultivo de las piscina # 15, # 20 y G-1. Así como sus valores máximos, mínimos y promedios.

Tabla # 10. Registro de pH para las piscinas # 15, # 20 y G-1 durante el periodo de muestreo.

pH			
Muestreo	Piscina 15	Piscina 20	Piscina G-1
1	8.1	8.1	7.8
2	7.9	7.4	8
3	8	7.8	9.2
4	7.7	7.7	8.2
5	8	7.4	8.2
6	7.4	7.4	8.19
7	8.8	8.9	7.9
8	8.2	8	7.9
9	8.4	8.45	8
10	8.44	8.4	8
11	8.53	8.36	7.8
12	8.36	8.54	7.8
13	8.4	8.35	8
14	8.6	8.6	8
15	8.7	8.3	8
16	8.6	8.6	8
17	8.3	8.6	7.7
Promedio	8.26	8.17	8.04
Mín.	7.4	7.4	7.7
Máx.	8.8	8.9	9.2

Las piscinas # 15 y # 20 (Figura # 19) presentan un comportamiento similar en los valores de pH, atribuible a que ambas piscinas pertenecen al mismo sistema semi-intensivo, se observa un incremento progresivo en el tiempo a partir del muestreo # 7 hasta el final del cultivo.

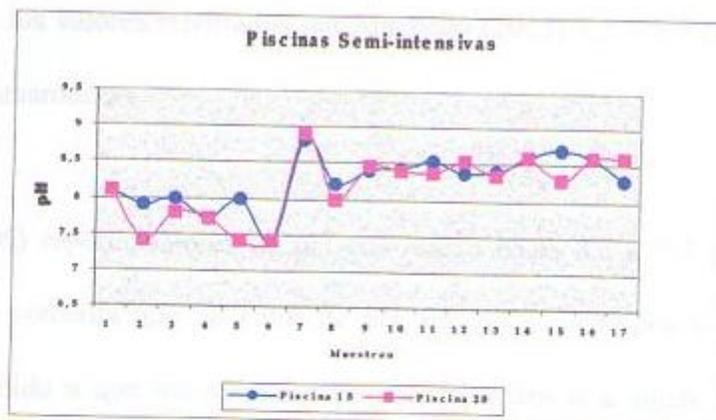


Fig. # 19.- Datos registrados de pH para las piscinas # 15 y # 20 durante el ciclo de cultivo.

En la Figura # 20, se observa los valores de pH durante el ciclo del cultivo de la piscina G-1, el mismo que tiende a disminuir progresivamente en el tiempo a partir del muestreo # 4 hasta el final del ciclo.



Fig. # 20.- Datos registrados de pH para la piscina G-1 durante el ciclo de cultivo.

Los valores de pH de las piscinas # 15, # 20 y G-1 estuvieron casi dentro del rango reportado por Lin y Nash (1996) 7.5 – 9.0 aceptables para el cultivo de camarón en estanques intensivos, sin embargo estuvieron algunas veces por

encima de los valores reportados por Machado (2003) 7.5 – 8.5 en su estudio de piscinas camaroneras.

Boyd (1996) reporta valores de pH que llegan hasta 8.5 a 9.5 para cultivo de camarón y comenta que un valor de pH alto en la tarde por lo general no es dañino, debido a que los animales acuáticos pueden ir a aguas más profundas donde el pH es menor. Sin embargo Pillay (1997) reporta que valores inferiores o superiores a este rango son letales produciendo retardo en procesos reproductivos y de crecimiento. Los factores que influyen en el valor final del pH son muy complejos, interviene el ciclo del dióxido de carbono, los iones presentes, la dureza, la temperatura entre otros (Catalán, 1987). Así, Boyd (1998), alega que el pH esta influenciado por el CO₂, si la concentración de CO₂ incrementa, el pH disminuye, y viceversa, si la concentración de CO₂ disminuye, el pH aumenta.

La piscina G-1 se diferencia claramente de las piscinas # 15 y # 20 porque los valores máximos y mínimos de pH del agua son diferentes (Tabla # 10), sin embargo el análisis de varianza de pH entre las piscinas # 15, # 20 y G-1 no reveló diferencias significativas ($p > 0.05$) atribuible posiblemente al comportamiento durante el desarrollo de todo el ciclo de cultivo.

3.2.5. Sólidos Suspendidos Totales – SST (mg. L^{-1})

Las concentraciones promedio de sólidos suspendidos totales para cada una de las piscinas (# 15, # 20 y G-1) se presentan en la Tabla # 11 y en las Figuras # 21 y # 22. Los valores promedio registraron valores más altos en la piscina G-1 en comparación con las piscinas # 15 y # 20 atribuido posiblemente a que el tipo de sistema de cultivo recibe mejores aportes de alimento, Materia Orgánica, etc.

Tabla # 11. Registro de Sólidos Suspendidos Totales (SST) durante el período de muestreo

Sólidos Suspendidos Totales mg. L^{-1}			
Muestreo	Piscina 15	Piscina 20	Piscina G-1
1	219.5	307.5	418.4
2	228	226	277.4
3	234.3	240.1	294.4
4	254.5	248.8	344.7
5	260.5	302.8	337.1
6	257	330.3	357.5
7	375.4	315.3	433.5
8	271.4	422.3	304
9	255.3	277.9	403
10	254.2	303.4	305
11	358.2	322.2	341.9
12	255	314	331.2
13	245	268	305
14	293	272	356.9
15	267.7	314.1	291.1
16	274.2	326.9	303.3
17	238	321	332.6
Promedio	267.1	300.7	337.5
Mín.	219.5	226	277.4
Máx.	375.4	422.3	433.5

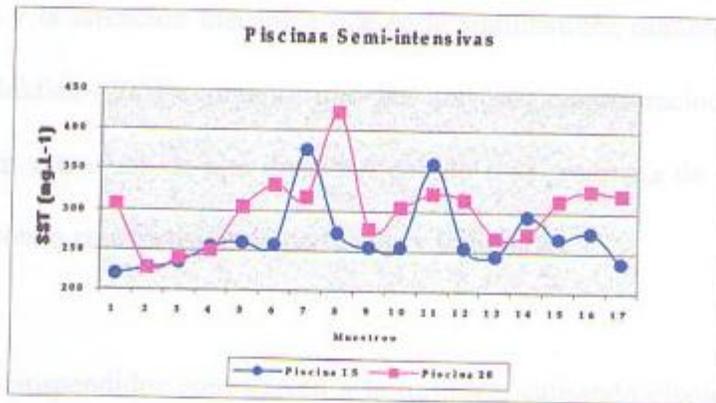


Fig. # 21. Sólidos Suspendidos Totales (SST) para las piscinas # 15 y # 20 registrada durante el ciclo de cultivo.

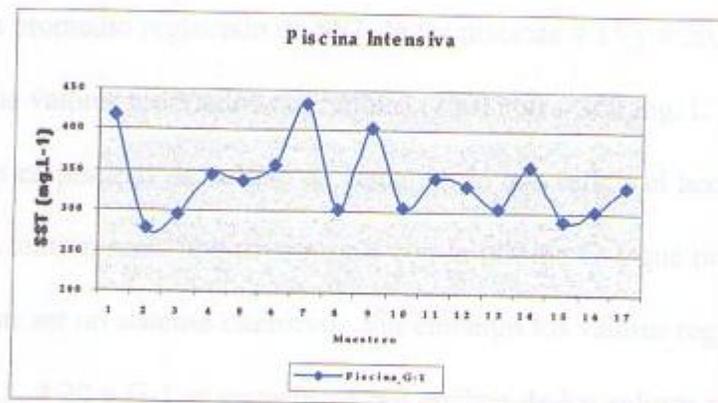


Fig. # 22. Sólidos Suspendidos Totales (SST) para la piscina G-1 registrada durante el ciclo de cultivo.

La piscina G-1 (Figura # 22) se diferencia de las piscinas # 15 y # 20 (Figura # 21) porque las concentraciones de SST registradas durante el ciclo del cultivo es generalmente más alta con un promedio de 337.5 mg. L^{-1} lo que esta explicado por el tipo de sistema, en donde la acumulación de sólidos suspendidos es causada por las reposiciones (10 – 12 % del volumen total de agua) a la que fue sometida la piscina los días anteriores al muestreo, la acumulación de alimento no

consumido y la aireación mecánica que se le suministraba durante la noche a la piscina. Saldias (2001) comenta que las mayores concentraciones de SST se producen en estanques de alta densidad debido a la presencia de aireadores que colaboran con la resuspensión de partículas y sedimento.

Los sólidos suspendidos contribuyen a la turbidez, causando efectos adversos en las comunidades bentónicas y limitando la penetración de luz, lo cual reduce la producción de oxígeno por fitoplancton (fotosíntesis) (Saldias, 2001).

Los valores promedio registrado de SST de las piscinas # 15 y # 20, se encuentran dentro de los valores reportados por Saldias (2001) $60 - 300 \text{ mg. L}^{-1}$ en su estudio de efluentes en piscinas de cultivo de camarón, lo que refleja el hecho de que son sistemas de cultivo semi-intensivo no así con la piscina G-1 que presenta valores más altos por ser un sistema intensivo. Sin embargo los valores registrados de las piscinas # 15, # 20 y G-1 se encuentran por encima de los valores registrados por Lin y Nash (1996) $30 - 190 \text{ mg. L}^{-1}$ aceptables para el cultivo de camarón en estanques intensivos; Boyd y Gautier (2000), reportan un promedio de 214 mg. L^{-1} en piscinas intensivas, caracterizados por el uso de aireadores.

El resultado del análisis de varianza para los sistemas estudiados no reveló diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las piscinas # 15 y # 20; # 20 y G-1, no así entre piscina # 15 y G-1 donde se encontró diferencias significativas.

3.2.6. Materia Orgánica Total

3.2.6.1. Materia Orgánica del Agua - MOA (mg. L^{-1})

En la Tabla # 12, se muestran los registros de materia orgánica del agua durante el ciclo de cultivo para las piscina # 15, # 20 y G-1, así como también sus valores máximos, mínimos y promedios.

Tabla # 12. Registro de materia orgánica del agua durante el período de muestreo.

Materia Orgánica del Agua (MOA) mg. L^{-1}			
Muestreo	Piscina 15	Piscina 20	Piscina G-1
1	50	67.5	-
2	55.8	53.2	63.4
3	63.7	62.2	75.7
4	68.9	65.4	93.5
5	76.7	103.8	81.3
6	61.9	80.1	77
7	83	82	85
8	73.3	98.3	75
9	67.4	77.8	108
10	56.8	63.2	106
11	62	69	116.8
12	59	62	104
13	47	55	115
14	70	76	129.8
15	54.4	83.2	102.7
16	56	98	104.7
17	65	101	100.5
Promedio	63.0	76.3	96.2
Mín.	47	63.4	63.4
Máx.	83	103.8	129.8

Las concentraciones promedio de materia orgánica del agua fueron mayores en la piscina G-1 sistema intensivo en comparación con las piscinas # 15 y # 20,

además se observó un incremento en el tiempo desde el muestreo # 2 hasta el último muestreo (Figura # 24).

En términos generales esta concentración de MOA alta para la piscina G-1 puede ser atribuida por la aireación mecánica que se le suministraba cada noche el cual resuspendía la materia orgánica en la columna de agua y por el tipo de sistema intensivo e invernadero. Lo que es confirmado por Saldías (2001) quien comenta que la densidad de siembra produce un aumento en el ingreso de materia orgánica a través del alimento y una mayor producción de desechos en la columna de agua.

El comportamiento de las concentraciones de MOA del agua de las piscinas # 15, # 20 y G-1 (Figura # 23) presenta ciertas variaciones durante el desarrollo del ciclo del cultivo probablemente por la poca asimilación de alimento balanceado, heces de animales y por la mayor o menor descomposición de materia orgánica efectuada por las actividades microbianas (Massaut, 1999; Boyd, 1995; Solano, 2003). La parcial o total descomposición de materia orgánica disuelta por la trama alimenticia microbiana incrementa la concentración de nutrientes inorgánicos disponibles para el fitoplancton (Havskum et al., 2003). Mientras que el incremento de las concentraciones de materia orgánica en la columna de agua causa efectos deletéreos como disminución de oxígeno, deterioramiento de la calidad de agua, creando un medio inhabitable para el normal crecimiento del camarón (Olivo, 2002). La descomposición de la materia orgánica está relacionada con muchos factores, como temperatura, oxígeno disuelto en el agua,

tipo de materia orgánica (productos con un bajo contenido de fibra y alto de nitrógeno se descomponen mucho más rápido que los residuos fibrosos de bajo contenido de nitrógeno) (Boyd, 1996).

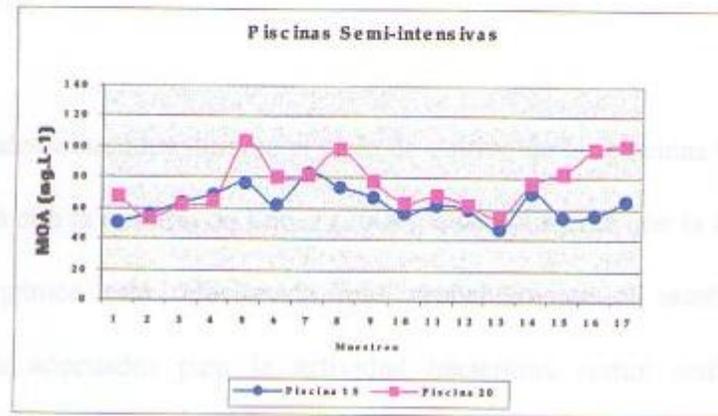


Fig. # 23.- Materia orgánica del agua (MOA) para las piscinas # 15 y # 20 registrada durante el ciclo de cultivo.



Fig. # 24.- Materia orgánica del agua (MOA) para la piscina G-1 registrada durante el ciclo de cultivo.

Los valores promedios registrados de MOA de las piscinas # 15, # 20 y G-1 se encuentran dentro de los datos reportados por Parsons et al. (1984) 25 – 150 mg. L⁻¹ en estudios de agua de mar. Aunque Boyd (1990), comenta que las concentraciones de materia orgánica en el agua raras veces deben de exceder de 100 a 150 mg. L⁻¹.

Los resultados obtenidos durante el ciclo de cultivo de las piscinas # 15, # 20 y G-1 coinciden con la opinión de López (2004), quien comenta que la disminución de materia orgánica está relacionada más probablemente al establecimiento de condiciones adecuadas para la actividad bacteriana como: sedimentación de materia orgánica lábil con bajos ratios C : N, altas temperaturas (27.3 °C), pH del sedimento alcalino (8.0) y condiciones aeróbicas.

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza para los sistemas estudiados muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la piscina G-1 y piscina # 15; piscina G-1 y piscina # 20, no así entre piscina # 20 y piscina # 15 dónde no se encuentran diferencias significativas ($p > 0,05$), lo que puede reflejar el hecho de que son sistemas diferentes con diferentes niveles de materia orgánica y diferentes fuentes de aporte de materia orgánica, así como diferentes niveles de actividad bacteriana.

3.2.6.2. Materia Orgánica del Sedimento – MOS (%)

Los porcentajes de MOS para cada una de las piscinas (# 15, # 20 y G-1) se presentan en la Tabla # 13 y en las Figuras # 25, 26, y 27. Los porcentajes promedio de MOS oscilaron entre 1.5 % y 8.12 % con valores más altos en la piscina # 15 en comparación con las piscinas # 20 y G-1.

Tabla # 13. Registro de materia orgánica del sedimento durante el período de muestreo.

Materia Orgánica del Sedimento (MOS) %			
Muestreo	Piscina 15	Piscina 20	Piscina G-1
1	5.35	4.26	4.1
2	7.89	3.68	4.1
3	6.99	6.45	5.0
4	8.06	3.30	4.2
5	5.76	4.32	2.0
6	8.12	5.35	2.0
7	7.14	4.74	1.5
8	3.16	5.64	5.0
9	4.17	6.95	2.1
10	4.71	5.38	5.6
11	7.73	6.38	4.6
12	3.72	5.79	5.1
13	7.89	2.65	4.1
14	5.91	2.88	4.6
15	6.99	3.11	4.6
16	3.91	6.84	3.0
17	5.24	5.67	6.1
Promedio	4.90	4.90	4.0
Mín.	3.16	2.65	1.5
Máx.	8.12	6.95	6.1

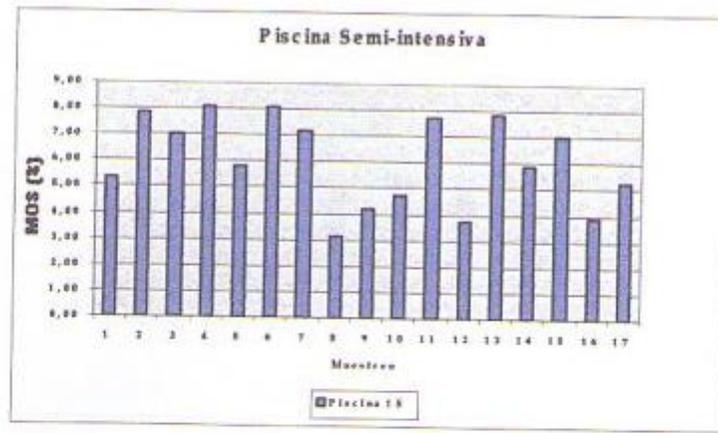


Fig. # 25.- Porcentaje de Materia orgánica del sedimento registrada durante el ciclo de cultivo para la piscina # 15.

Fig. # 27.- Porcentaje de Materia orgánica del sedimento registrada durante el ciclo de cultivo para la piscina # 20.

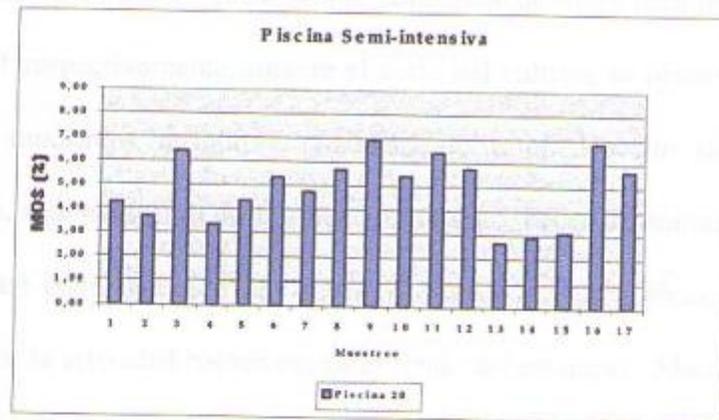


Fig. # 26.- Porcentaje de Materia orgánica del sedimento registrada durante el ciclo de cultivo para la piscina # 20.

Fig. # 27.- Porcentaje de Materia orgánica del sedimento registrada durante el ciclo de cultivo para la piscina # 20.

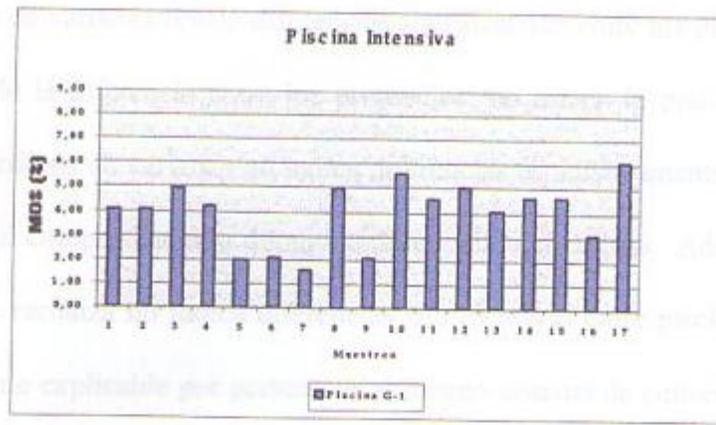


Fig. # 27.- Porcentaje de Materia orgánica del sedimento registrada durante el ciclo de cultivo para la piscina G-1.

Las Figuras # 25, 26 y 27, presentan el porcentaje de MOS para las piscinas # 15, # 20 y G-1 respectivamente durante el ciclo del cultivo, se observan variaciones entre los muestreos atribuible posiblemente a el deposito de alimento no consumido, sedimentación de fitoplancton muerto, heces de animales y mudas de camarón, así como también una mayor o menor descomposición de la materia orgánica por la actividad bacteriana en el fondo del estanque. Martín et al. (1998), comentan que la materia orgánica que se deposita en el sedimento de los sistemas de cultivo tiene dos roles: un rol positivo cuando se mantiene en concentraciones adecuadas donde puede ser consumido directamente por los animales que se encuentran en el sistema, servir como fuente de nutrientes para la vía alimenticia detrital heterotrófica y como fuente de nutrientes minerales que estimulan la producción primaria para la vía alimenticia autotrófica (Boyd y Tucker, 1998). El rol negativo se da cuando la materia orgánica se encuentra en elevadas concentraciones causando serios problemas ambientales.

El análisis de varianza reveló diferencias significativas entre las piscina # 15 y G-1 reflejo de la diferencia entre los promedios, no así en la piscina # 20 y G-1 donde el análisis de varianza no indica diferencias estadísticamente significativas, atribuible al comportamiento durante todo el ciclo del cultivo. Adicionalmente el análisis de varianza no indica diferencias significativas entre piscina # 15 y # 20 posiblemente explicable por pertenecer al mismo sistema de cultivo con similares fuentes de materia orgánica.

CONCLUSIONES

- La técnica del DGGE permitió un estudio rápido y simultáneo de las comunidades bacterianas presentes en agua y sedimento de las piscinas de cultivo # 15, # 20 y G-1 y demostró ser una herramienta que permite estudiar la diversidad bacteriana en diferentes ambientes, en nuestro caso sistemas intensivo y semi-intensivos de engorde de camarón.
- Los índices de diversidad calculados usando el número e intensidad de las bandas generadas por los perfiles del DGGE, permitieron conocer la diversidad genética de las comunidades bacterianas en agua y sedimento observándose una diversidad más alta en el sistema semi-intensivo en comparación al sistema intensivo.
- La diversidad de las comunidades microbianas al parecer esta influenciada por las diferentes condiciones ambientales a las que esta sometido cada uno de los sistemas de cultivo, observándose Índices de diversidad más bajos en el sistema intensivo.
- Los Índices de diversidad fueron mayores en los sistemas semi-intensivos, esto podría deberse al hecho de ser sistemas menos controlados y por lo tanto más susceptibles de variaciones.

-La temperatura del agua registrada en los sistemas de engorde fue relativamente más alta en el sistema intensivo (G-1), atribuible al tipo de sistema con cubierta tipo invernadero. En las tres piscinas se observó un incremento de temperatura a través del tiempo explicado por el cambio de estación climática.

-Los niveles de oxígeno disuelto registrados durante el ciclo del cultivo fueron más altos en el sistema semi-intensivo en comparación con el sistema intensivo, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

-Los valores de pH del sistema intensivo se diferencia del sistema semi-intensivo, sin embargo, el análisis de varianza no reveló diferencias significativas ($p > 0,05$).

-Los niveles de sólidos suspendidos totales fueron más altos en el sistema intensivo (G-1). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

-El nivel de materia orgánica en agua fue superior en el sistema intensivo. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

-El porcentaje de materia orgánica en el sedimento fue superior en el sistema semi-intensivo. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio durante dos ciclos de cultivo: uno en la estación de invierno y el otro en la estación de verano con sistemas semi-intensivos y sistemas intensivos para observar la diferencia estacional de la diversidad microbiana y como esta puede ser afectada por los factores ambientales propios de cada época para obtener una mejor idea del comportamiento microbiano.
- Realizar estudios durante ciclos de cultivo en diferentes localidades, para observar la diferencia microbiana en cuanto a ubicación geográfica y entender como esta puede ser afectada por las condiciones propias de cada localidad.
- Se recomienda una mayor frecuencia de medición para el registro de los parámetros físicos, lo que permita observar la variación diaria y a su vez tratar de correlacionarla con los índices de diversidad obtenidos de las comunidades microbianas.
- Realizar análisis de agrupamiento (clusters) a partir de la información generada por los perfiles del DGGE, para conocer la evolución de las comunidades microbianas a través del tiempo de cada piscina.
- En futuros estudios secuenciar las bandas dominantes obtenidas en los geles del DGGE para identificar organismos específicos en los sistemas de cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agurto, M. F. 2003. Análisis Estadístico Exploratorio de las variables físicas que inciden en el crecimiento del camarón. Caso: *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Ingeniera en Estadística Informática, ESPOL, Ingeniería en Estadística Informática, Guayaquil, Ecuador.
2. Álvarez, R. J., C. Agurto, J. Obregón, L. Peraza. 2003. Detection of Baculovirus penaei and cases of vibriosis in *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus stylirostris* on a farm in the west coast of Venezuela. Revista Científica, FCV-Luz. 13: 255 – 262.
3. Amman, R. I. 1995. Fluorescently labelled, rRNA – targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. Mol. Ecol. 4: 543 – 554.
4. Arias, C. R., E. Garay, and R. Aznar. 1995. Nested PCR Method for rapid and sensitive detection of *Vibrio vulnificus* in fish, sediments, and water. Applied and Environmental Microbiology. 61: 3476 – 3478.
5. Atlas, M. R., R. Bartha. 2002. Evolución microbiana y biodiversidad. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. Addison Wesley. Pearson Educación, S. A., Madrid. Cuarta Edición. 37.

6. Bano, N., J. T. Hollibaugh. 2002. Phylogenetic Composition of Bacterioplankton assemblages from the Artic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 505 – 518.
7. Barnes, R. S. K, and K. H. Mann. 1991. *Organisms and Ecosystems. Fundamentals of Aquatic Ecology*. Blackwell Science b. Segunda Edición. 14 - 26.
8. Blackwood, C. B., T. Marsh, S. H. Kim, and E. A. Paul. 2003. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 926 – 932.
9. Bohannan, B., and J. Hughes. 2003. New approaches to analyzing microbial biodiversity data. *Current Opinion in Microbiology*. 6: 282 – 287.
10. Boletín Nicovita. Camarón del Mar. 2002. Producción Intensiva de Camarón en Áreas con Mancha Blanca. Parte I. Vol. 7. Edición 01. 1 - 11. http://www.nicovita.com.pe/pdf/esp/boletines/bole_0204_01.pdf
11. Boyd, C. E. 1989. *Water Quality Management and Aeration in Shrimp Farming*. Departamental Series N° 2. Fisheries and Allied Aquacultures, Auburn University, Alabama, EEUU.

12. Boyd, C. E. 1990. Water Quality in Ponds For Aquaculture. Department of Fisheries and Allied Aquacultures, Auburn University, Alabama. 25 – 100.
13. Boyd, C. E. 1995. Dry Ash Method. Bottom soils, Sediment, and Pond Aquaculture. Chapman y hall, New York, EE. UU. 327.
14. Boyd, C.E., 1996. Manejo de suelo y calidad de agua en la acuicultura de piscinas. Deparment of Fisheries and Allied Aquacultures. Auburn University, Alabama. 1 – 61.
15. Boyd, C. E. 1998. Enviromental issues in shrimp farming. Altons. B. W. Green, and H. C. Clifford, editors. IV Simposio Centroamericano de Acuicultura, Asociación Nacional de Acuicultores de Honduras, Tegucigalpa. 9 – 23.
16. Boyd, C. E. 2001. Water Quality. An Introduction. Kluwer Academic Publishers, Ámsterdam, Holanda.
17. Boyd, C. E. y D. Gautier. 2000. Efluent composition and water quality standards. Global Aquaculture Advocate 3(5): 61 – 66.
18. Boyd, C. E. y C. S. Tucker. 1998. Pond Aquaculture Water Quality Management. Kluwer Academic Publishers. Amsterdam, Holanda.

19. Boyd, C. E., C. S. Tucker. 1992. Particulate Organic Matter. Water Quality and Pond Soil Analyses For Aquaculture. Alabama Agricultural Experiment Station Auburn University. Alabama. 148 – 149.
20. Calero, V. G. 1998. Enriquecimiento de Agar Marino y TCBS con caldos de músculo y hepatopáncreas de camarón *Penaeus vannamei*. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Guayaquil, Ecuador.
21. Calvo – Bado, L. A., T. R. Pettitt, N. Parsons, G. M. Petch, J. A. Morgan, and J. M. Whipps. 2003. Spatial and Temporal Analysis of the Microbial Community in Slow Sand Filters Used for Treating Horticultural Irrigation Water. Applied and Environmental Microbiology. 69: 2116 – 2125.
22. Cámara de Productores de Camarón. 1993. Libro Blanco del Camarón. 1 - 69.
23. Catalán, J. G., J. Catalan. 1987. Ríos Caracterización y calidad de aguas. E. D. Dihidrox, Madrid.
24. Carrasco, L. L. 2004. Métodos de estudio de los cambios estructurales en ecosistemas microbianos edáficos y su aplicación ambiental. Ciencia al Día Internacional. 5: 1 – 24.

25. Casamayor, E. O., H. Schaefer, L. Bañeras, C. Pedrós – Alió, and G. Muyzer. 2000. Identification of and Spatio – Temporal Differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: Comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 499 – 508.
26. Costa, R., I. Mermoud, S. Koblavi, B. Morlet, P. Haffner, F. Berthe, M. Legroumellec, P. Grimont. 1998. Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. *Aquaculture*. 164: 297 – 309.
27. Crump, B. C., G. W. Kling, M. Bahr, and J. E. Hobbie. 2003. Bacterioplankton Community shifts in an Arctic Lake correlate with seasonal changes in organic matter source. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 2253 – 2268.
28. Curtis, T. P., W. T. Sloan, and J. W. Scannell. 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 10494 – 10499.
29. Cytryn, E., I. Gelfand, Y. Barak, J. Van Rijn and D. Minz. 2003. Diversity of microbial communities correlated to physio chemical parameters in a digestion basin of a zero – discharge mariculture system. *Environmental Microbiology*. 5: 55 – 63.

30. Dalsgaard, A., I. Dalsgaard I, L. Moi, J.L. Larsen. 1996. Comparison of a commercial biochemical kit and Oligonucleotide probe for identification of environmental isolates of *Vibrio vulnificus*. Lett App. Microbiol. 22: 184 – 188.
31. Díaz, G., C. Wachter. 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. Revista Latinoamericana de Microbiología. 45: 30 – 40.
32. Díaz, R., C. Gamazo, I López – Goñi. 1999. Genética Bacteriana. Manual práctico de microbiología. Segunda Edición. Masson. 103.
33. Díez, B., C. Pedrós - Alió., T. Marsh and R. Massana. 2001. Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) To Study the Diversity of Marine Picoeukaryotic Assemblages and Comparison of DGGE with other Molecular Techniques. Applied and Environmental Microbiology. 67: 2942 – 2951.
34. Dilly, O., J. Bloem, A. Vos, and J. C. Munch. 2004. Bacterial Diversity in Agricultural Soils during Litter Decomposition. Applied and Environmental Microbiology. 70: 468 – 474.

35. Dinesh, K., W. Chan, T. Lim y V. Phang. 1995. RAPD markers in fishes: an evaluation of resolution and reproducibility. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 3(2):112-118.
36. Dunbar, J., L. O. Ticknor, and CH. R. Kuske. 2000. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2943 – 2950.
37. Edwards, M., A. Lilley, T. Timms-Wilson, I. Thompson, I. Cooper. 2001. Characterisation of the culturable heterotrophic bacterial community in a small eutrophic lake (Priest Pot). *FEMS Microbiology Ecology*. 35: 295 – 304.
38. Ellis, R. J., P. Morgan, A. J. Weightman, and J. C. Fry. 2003. Cultivation – Dependent and – Independent Approaches for determining bacterial diversity in heavy – metal – contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 3223 – 3230.
39. Ercolini, D. 2004. PCR – DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*. 56: 297 – 314.

40. Fantroussi, S., L. Verschuere, W. Verstraete and E. M. Top. 1999. Effect of Phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA Gene fingerprints and community – Level Physiological profiles. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 982 – 988.
41. Fisher, M. M., E. W. Triplett. 1999. Automated Approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 4630 – 4636.
42. Fuentes, F., A. Massol – Deyá. 2002. *Ecología de Microorganismos. Manual de Laboratorios*. 1 – 17.
43. Gelsomino, A., A. C. Keijzer – Wolters, G. Cacco, G, and J. D. Van Elsas. 1999. Assessment of bacterial community diversity in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*. 38: 1 – 15.
44. Gómez - Gil. B., L. Tron – Mayén, A. Roque, J. F. Turnbull, V. Inglis. A.L. Guerra – Flores. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy Juvenile *Penaeus vanamei*. *Aquaculture*. 163: 1 – 9.

45. Gram, L., H. P. Grossart, A. Schkingloff, y T. Kiorboe. 2002. Possible quorum sensing in marine snow bacteria: production of acylated homoserine lactones by *Roseobacter* strains isolated from marine snow. *Applied and Environmental Microbiology*. Aug. 2002: 4111 – 4116.
46. Grenberg, A. E., L. S. Clesceri, A. D. Eaton. 1992. Total Suspended Solids Dried. For The Examination of Water And Wastewater. *Standard Methods*. Edición 18. 46 - 65.
47. Guillou, L., S. Y. Moon-van der Staay, H. Claustre, F. Partensky, and D. Vaultot. 1999. Diversity and abundance of Bolidophyceae (Heterokonta) in two oceanic regions. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 4528 – 4536.
48. Gullian, K. M. 2001. Estudio del efecto inmuno estimulante de bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Penaeus vannamei*. Tesis de Magister en Ciencias, Escuela Superior Politécnica del Litoral , Guayaquil, Ecuador.
49. Hargreaves, J., y M. Brunson. 1996. Carbon dioxide in fish ponds. *Southern Regional. Aquaculture Center N° 468*.
50. Havskum, H., T.F. Thingstad, R. Scharek, F. Peters, E. Berdalet, M.M. Sala, M. Alcaraz, J.C. Bangsholt, U.L. Zweifel, A Hagström, M. Perez, y J.R.

- Dolan. 2003. Silicate and labile DOC interfere in structuring the microbial food web via algal—bacterial competition for mineral nutrients: Results of a mesocosm experiment. *Limnology and Oceanography*. 48(1):129-140.
51. Hewson, I., J. A. Fuhrman. 2004. Richness and diversity of bacterioplankton Species along an Estuarine Gradient in Moreton Bay, Australia. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 3425 – 3433.
52. Intriago, D. W. E. 1998. Problemas de Aislamiento y Caracterización de bacterias asociadas al síndrome de zoea II y demostración experimental de su patogenicidad. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Guayaquil, Ecuador.
53. Ji, N., B. Peng, G. Wang, S. Wang, X. Peng. 2004. Universal primer PCR with DGGE for rapid detection of bacterial pathogens. *Journal of Microbiological Methods*. 57: 409 – 413.
54. Jiménez, R., R. Barniol, L. de Barniol, y M. Machuca, 2000. Periodic occurrence of epithelial viral necrosis outbreak in *Penaeus vannamei* in Ecuador. *Diseases of Aquatic Organisms*. 42: 91 - 99.
55. Kawai, M., E. Matsutera, H. Kanda, N. Yamaguchi, K. Tani, and M. Nasu. 2002. 16S Ribosomal DNA – Based Analysis of bacterial diversity in

- purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 699 – 704.
56. Kirk, J. L., L. Beaudette, M. Hart, P. Moutoglis, J. Klironomos, H. Lee, J. Trevors. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*. 58:169 – 188.
57. Knapp, C. W., D. W. Graham. 2004. Development of alternate ssu-rRNA probing strategies for characterizing aquatic microbial communities. *Journal of Microbiological Methods*. 56: 323 – 330.
58. Koizumi, Y., H. Kojima, M. Fukui. 2003. Characterization of depth-related microbial community structure in lake sediment by denaturing gradient gel electrophoresis of amplified 16S rDNA and reversely transcribed 16S rRNA fragments. *FEMS Microbiology Ecology*. 46: 147 – 157.
59. Krebs, L. 2003. “Respiración del suelo como herramienta para evaluar calidad de fondos en acuicultura. I. Desarrollo de protocolo estándar para medir dióxido de carbono”. Tesis de Magíster en Ciencias, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.

60. Kropf, S., H. Heuer, M. Grüning, K. Smalla. 2004. Significance test for comparing complex microbial community fingerprints using pairwise similarity measures. *Journal of Microbiological Methods*. 57: 187 – 195.
61. Lim, E. L., M. R. Dennet, and D. A. Caron. 1999. The ecology of *Paraphysomonas imperforata* based on studies employing oligonucleotide probe identification in coastal water samples and enrichment cultures. *Limnol. Oceanogr.* 44: 37 – 51.
62. Lin, C. K, and G. L. Nash. 1996. Asian Shrimp News Collected Volume. Bangkok, Thailand: Asian Shrimp Culture Council. 1989 – 1995.
63. Lin, K. C., D. R. Teichert-Coddington, B. W. Green y K. L. Veverica. 1997. Fertilization regimes. *Dynamic of the pond Aquaculture*. CRC Press, New York, EEUU. 73 – 108.
64. López. E. A. 2004. Relación entre el fitoplancton y el bacterioplancton bajo dos regímenes de fertilización en mesocosmos con presencia de sedimentos. Tesis de Magíster en Ciencias, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.
65. Machado, H. 2003. Determinación de metabolitos potencialmente tóxicos en suelos y agua de piscinas camaroneras durante un ciclo de producción. Tesis

- de Ingeniero Químico, Universidad de Guayaquil, Ingeniería Química, Guayaquil, Ecuador.
66. Maier, R., I. Pepper, C. Gerba. 2000. Microorganisms in the Environment. Environmental Microbiology. Academic Press. A Harcourt Science and Technology Company. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo. 20.
67. Marriot, G. F. 2003. Análisis del Sector Camaronero. Apuntes de Economía. 1 – 30.
68. Martin, J. L. M., Y. Veran, O. Guelorget, y D. Pham. 1998. Shrimp rearing: stocking density, growth, impact on sediment, waste output and their relationships studied through the nitrogen budget in rearing ponds. Aquaculture 164:135-149.
69. Martin, A. 2002. Phylogenetic Approaches for Describing and Comparing the Diversity of Microbial Communities. Applied and Environmental Microbiology. 68: 3673 – 3682.
70. Massaut, L. 1999. Manejo de sabores / olores no deseados en cultivos de camarón en el Ecuador. El Mundo Acuicola. 5 (2): 21 – 22.

71. McCaig, A. E., A. Glover and J. Prosser. 2001. Numerical Analysis of Grassland Bacterial Community Structure under Different Land Management Regimens by Using 16S Ribosomal DNA Sequence Data and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Banding Patterns. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 4554 – 4559.
72. Microsoft Corporation. 2005. Anatomía de una bacteria sencilla. Biblioteca de Consulta Microsoft®. Encarta®.
73. Monserrate, M. E. 2003. Efecto de diferentes regímenes de fertilización sobre la relación fitoplancton-bacterioplancton en mesocosmos. Tesis de Magíster en Ciencias, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.
74. Moriarty, D. 1997. The Role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture*. 151: 333 – 349.
75. Morris, C. E., M. Bardin, O. Berge, P. Frey, Klett, N. Fromin, H. Girardin, M. Guinebretière, P. Lebaron, J. Thiéry, and M. Troussellier. 2002. Microbial Biodiversity: Approaches to Experimental Design and Hypothesis Testing in Primary Scientific Literature from 1975 to 1999. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66: 592 – 616.

76. Murray, A. E., J. T. Hollibaugh and C. Orrego. 1996. Phylogenetic Compositions of Bacterioplankton from Two California Estuaries compared by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of 16S rDNA fragments. 62: 2676 – 2680.
77. Muylaert, K., K. Van der Gucht, N. Vloemans, L. D. Meester, M. Gillis and W. Vyverman. 2002. Relationship between Bacterial Community Composition and Bottom – Up versus Top – Down Variables in Four Eutrophic Shallow Lakes. Applied and Environmental Microbiology. 68: 4740 – 4750.
78. Muyzer, G., E. C. De Waal, and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microb. 59: 695 – 700.
79. Neder, M. 1989. Determinación de los principales tipos de bacterias que afectan al cultivo de larvas de *Penaeus vannamei*, en sus diferentes estadios larvarios. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Guayaquil, Ecuador.
80. Nubel, U., F. García-Pichel., M. Kuhl., G. Muyzer. 1999. Quantifying Microbial Diversity: Morphotypes, 16S rRNA Genes, and Carotenoids of

Oxygenic Phototrophs in Microbial Mats. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 422 – 430.

81. Nubel, U., F. Garcia – Pichel, and G. Muyzer. 1997. PCR Primers to amplify 16S rRNA genes from Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 3327 – 3332.
82. Olivo, K. 2002. Calidad de agua asociada al Cultivo de Camarón en suelos con diferente concentración de materia orgánica. Tesis de Ingeniera Química, Universidad de Guayaquil, Ingeniería Química, Guayaquil, Ecuador.
83. Orberá, R. T. 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología*. 21: 15 – 19.
84. Orellana, A. P. 2000. Efecto de diferentes niveles de salinidad y balances proteína/energía en el crecimiento del *Penaeus vannamei*. Tesis de Ingeniero Acuacultor, Universidad Técnica de Machala, Agronomía Veterinaria y Acuicultura, El Oro, Ecuador.
85. Parra, I. 2001. Estandarización de un método de infección artificial que permite evaluar la resistencia a enfermedades bacterianas (*Vibrios*) en postlarvas de *Penaeus vannamei*. Tesis de Médico Veterinario, Universidad

- de Ciencias Aplicadas y ambientales, Ciencias Agropecuarias y Medicina Veterinaria, Bogotá, Colombia.
86. Parsons, T. R., M. Takahashi, and B. Hargrave. 1984. Benthic Communities. Biological Oceanographic Processes. Printed in Great Britain by A. Wheaton & Co. Ltd., Exeter. Pergamon Press. Oxford. 169 – 256.
87. Pintado, J., J. P. Guyot, and F. Ampe. 2003. Múltiple competitive PCR – DGGE as a tool for quantifying and profiling defined mixed cultures of lactic acid bacteria during production of probiotics from complex polysaccharides. *Journal of Applied Microbiology*. 95: 921 – 933.
88. Pillay, T. V. R. 1997. Acuicultura. Principios y Prácticas. Editorial LIMUSA. NORIEGA (eds.). México, D. F. 609
89. Ranjard, L., F. Poly, S. Nazaret. 2000. Monitoring complex bacterial communities using culture – independent molecular techniques: application to soil environment. *Res. Microbiol.* 151: 167 – 177.
90. Regueira, E. 2001. Patrones Espaciales y Temporales de la Producción Camaronera en el Golfo de Guayaquil. Tesis de Magíster en Ciencias, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.

91. Riemann, L., M. Middelboe. 2002. Stability of bacterial and viral community compositions in Danish coastal waters as depicted by DNA fingerprinting techniques. *Aquatic Microbial Ecology*. 27: 219 – 232.
92. Riemann, L., A. Winding. 2001. Community Dynamics of free-living and Particle-associated Bacterial Assemblages during a Freshwater Phytoplankton Bloom. *Microbial Ecology*. 42: 274 – 285.
93. Rodríguez, S. I., H. A. Barrera. 2004. La Reacción en Cadena de la Polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*. 3: 323 – 335.
94. Rojlorsakul, P., V. Boosaeng, W. Panbangred, O. Suthienkul, T. Pasharawipas, T. Flegel. 1998. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp haemolymph by DNA Hybridization and PCR Amplification. *Advances in shrimp biotechnology*. National Center for Engineering and Biotechnology. 227 – 234.
95. Rombaut, G., G. Suantika, N. Boon, S. Maertens, P. Dhert, E. Top, P. Sorgeloos, W. Verstraete. 2001. Monitoring of the evolving diversity of the microbial community present in rotifer cultures. *Aquaculture*. 198: 237 – 252.

96. Rondon, M. R., P. August, A. Bettermann, S. Brady, T. Grossman, M. Liles, K. Loiacono, B. Lynch, I. MacNeil, C. Minor, C. Tiong, M. Gilman, M. Osburne, J. Clardy, J. Handelsman, and R. Goodman. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2541 – 2547.
97. Rønn, R., A. E. McCaig, B. S. Griffiths, and J. I. Prosser. 2002. Impact of Protozoan Grazing on Bacterial Community Structure in Soil Microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 6094 – 6105.
98. Rozalén, J., V. Ceña, J. Jordán. 2003. Terapia génica. Vectores de expresión. *Genética*. 22: 102 – 108.
99. Saldias, C. A. 2001. Efluentes y balance de nutrientes en piscinas camaroneras con diferentes prácticas de manejo. Tesis de Magíster en Ciencias, Escuela Superior Politécnica del Litoral , Guayaquil, Ecuador.
100. San Miguel, L. 1996. Caracterización de una bacteria “Probiotica” en *Penaeus vannamei* y estudio in vivo de la interacción con una bacteria patógena. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Guayaquil, Ecuador.

101. Schafer, H and G. Muyzer. 2001. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis in Marine Microbial Ecology. *Methods in microbiology*. 30: 425 – 466.
102. Schauer, M., V. Balagué, C. Pedrós-Alió, R. Massana. 2003. Seasonal changes in the taxonomic composition of bacterioplankton in a coastal oligotrophic system. *Aquatic Microbial Ecology*. 31: 163 – 174.
103. Schwieger, F., C. C. Tebbe. 1998. A new Approach to utilize PCR – Single – Strand – conformation polymorphism for 16S rRNA gene – based microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 4870 – 4876.
104. Sessitsch, A., A. Weilharter, M. H. Gerzabek, H. Kirchmann, and E. Kandeler. 2001. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4215 – 4224.
105. Siavichay, K. 1997. Aplicación de nuevas técnicas para el seguimiento bacteriológico en un laboratorio de larvas de camarón. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Guayaquil, Ecuador.

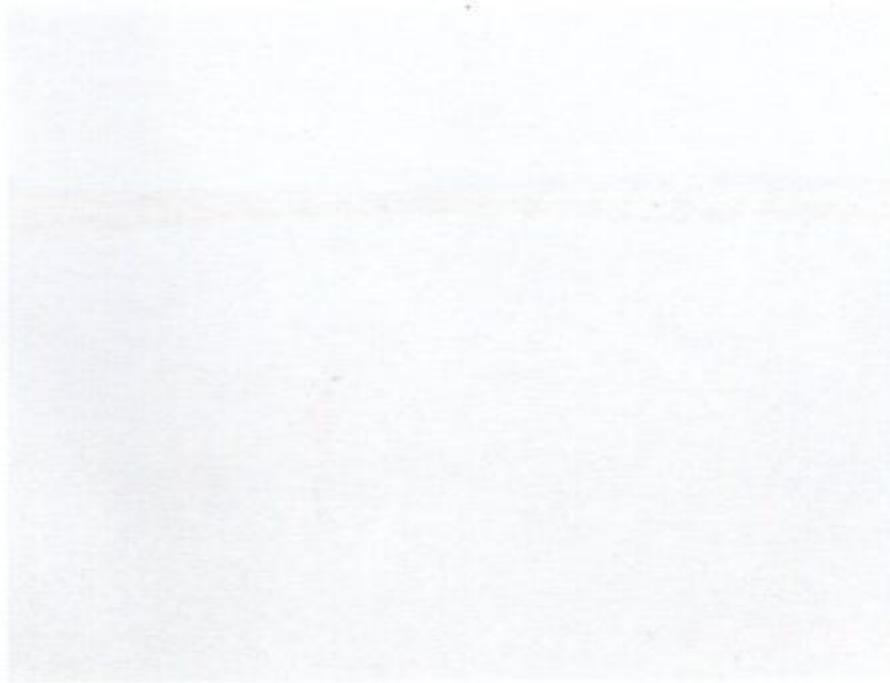
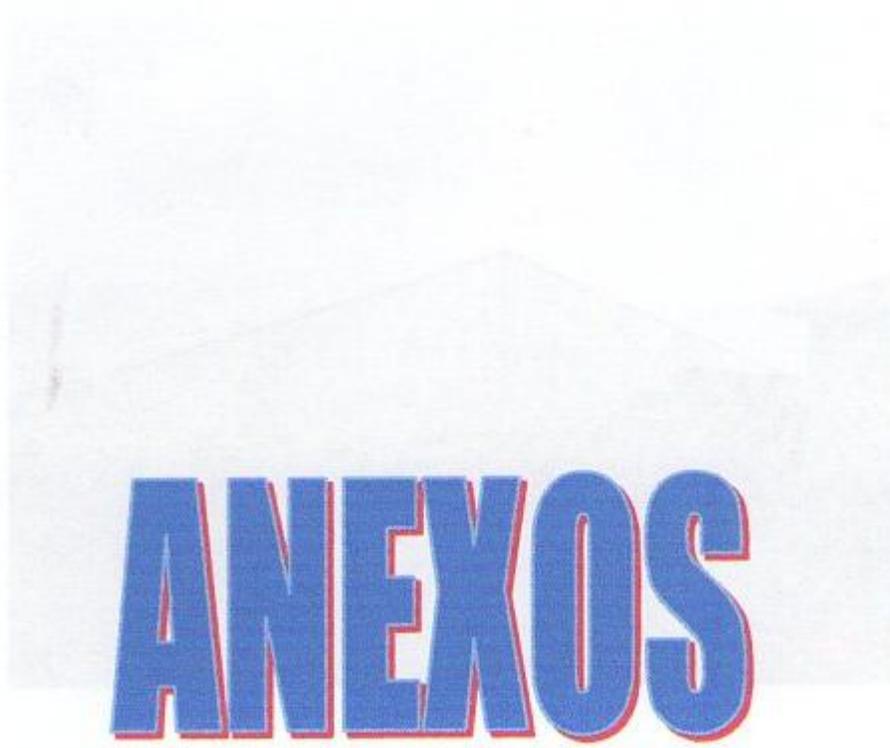
106. Sigler, W. V., C. Miniaci, J. Zeyer. 2004. Electrophoresis time impacts the denaturing gradient gel electrophoresis – based assessment of bacterial community structure. *Journal of Microbiological Methods*. 57: 17 – 22.
107. Smalla, K., N. Cresswell, L. C. Mendonca – Hagler, A. Wolters, and J. D. Van Elsas. 1993. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction – mediated amplification. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 78 – 85.
108. Smit, E., P. Leeflang, and K. Wernars. 1997. Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23: 249 – 261.
109. Smit, E., P. Leeflang, S. Gommans, J. V. D. Broek, S. V. Mil y K. Wernars. 2001. Diversity and Seasonal Fluctuations of the Dominant Members of the Bacterial Soil Community in a wheat field as Determined by Cultivation and Molecular Methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2284 – 2291.
110. Solano, G. W. 2003. “Efecto del hidróxido de calcio sobre la calidad de agua y la producción de estanques de cultivo de *Litopenaeus vannamei* en aguas salobres”. Tesis de Magíster en Ciencias, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.

111. Sonnenholzner, S. 2002. Tolerancia de temperatura. CENAIM INFORMA, Boletín 64.
112. Sotomayor, M. 2000. Obtención de un Modelo de Infección Experimental en Juveniles de *Penaeus vannamei*, con el *Vibrio vulnificus*. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Guayaquil, Ecuador.
113. Stach, J. E. M., L. A. Maldonado, D. G. Masson, A. C. Ward, M. Goodfellow, and A. T. Bull. 2003. Statistical Approaches for Estimating Actinobacterial Diversity in Marine Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 6189 – 6200.
114. Stults, J. R., O. Snoeyenbos – West, B. Methe, D. R. Lovley, and D. P. Chandler. 2001. Application of the 5' fluorogenic exonuclease assay (TaqMan) for quantitative ribosomal DNA and rRNA analysis in sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2781 – 2789.
115. Sung, H. H., H. C. Li, F. M. Tsai, Y. Y. Ting, y W. L. Chao. 1999. Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 236: 261 – 271.

116. Suzuki, M. T., M. S. Rappé, Z. Q. Haimberger, H. Winfield, N. Adair, J. Ströbel, y S. J. Giovannoni. 1997. Bacterial diversity among small-subunit rRNA gene clones and cellular isolates from the same seawater sample. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 983-989.
117. Temmerman, R., I. Scheirlinck, G. Huys y J. Swings. 2003. Culture – Independent Analysis of Probiotic Products by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 220 – 226.
118. Teunissen, O.S.P., R. Faber, G. H. R. Booms, T. Latscha, J. M. Boon. 1998. Influence of vaccination on Vibrios resistance of the giant black tiger shrimp *Peneus monodon* (Fabricius). *Aquaculture*. 164: 359 – 366.
119. Thomas, A., V. Bell and Donald, A. Lightner. 1998. Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. World Aquaculture Society. Louisiana.
120. Vargas, M., F. Novoa. 1999. Consejo genético. Diagnóstico de las enfermedades monogénicas y cromosómicas. *Vox Pediatrica*. 71: 114 – 117.
121. Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological reviews*. 51: 181 – 192.

122. Woese, C. R., O. Kandler, and M. L. Wheelis. 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the national academy of science of the USA*. 87: 4576 – 4579.
123. Woese, C. R. 1992. Prokaryote systematics: the evolution of a science. En A. Balows, H. G. Triiper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (eds.). *The prokaryotes*. Springer – verlag, Nueva York, pp. 1 – 18.

ANEXOS



Anexo # 1. Sistema Intensivo con invernadero: Piscina G-1 de la “Estación Experimental CENAIM”



Anexo # 2. Sistema Semi-intensivo abierto: Piscinas # 15 de la Camaronera “OPUMARSA”



Anexo # 3. Muestras de agua y de sedimento colectadas semanalmente en los sistemas de cultivo



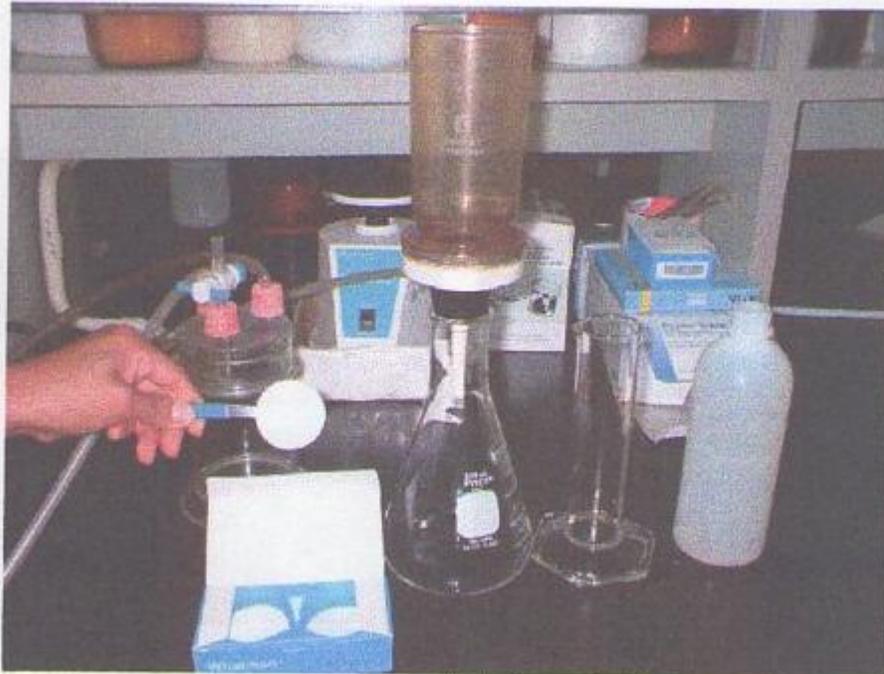
Anexo # 4. Parámetros abióticos: Medición de pH junto a la toma de la muestra. Utilizando un equipo de mano pH testr2 "double junction" (OAKTON® Instruments)



Anexo # 5. Parámetros abióticos: Medición de salinidad junto a la toma de la muestra. Utilizando un refractómetro de mano marca ATAGO, Modelo 5/Mill



Anexo # 6. Parámetros abióticos: Equipos utilizados para la determinación de Sólidos Suspendedos Totales y Materia Orgánica del Agua



Anexo # 7. Purificación del DNA bacteriano, utilizando el Sistema de Purificación (Wizard PCR Preps DNA Purification System – Promega®)



Anexo # 8. Amplificación (PCR – 16S RNA) del DNA bacteriano: Amplificación por PCR, utilizando el equipo PTC – 200 MJ Research®

