



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

**UTILIZACIÓN DE BACTERIAS ASOCIADAS  
AL PERIFITÓN DE SUBSTRATOS  
ARTIFICIALES EN EL SISTEMA DE CULTIVO  
DE CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus  
vannamei*)”**

**TESIS DE GRADO**  
**PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**  
**BIÓLOGO MARINO**  
**JUAN GERARDO QUIMI MUJICA**  
**LA LIBERTAD - ECUADOR**

**2010**

**UNIVERSIDAD ESTATAL**

**PENÍNSULA DE SANTA ELENA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA**

**“UTILIZACIÓN DE BACTERIAS ASOCIADAS AL  
PERIFITÓN DE SUBSTRATOS ARTIFICIALES EN EL  
SISTEMA DE CULTIVO DE CAMARÓN BLANCO  
(*Litopenaeus vannamei*)”**

**TESIS DE GRADO**

**Previa a la obtención del Título de:**

**BIÓLOGO MARINO**

**JUAN GERARDO QUIMI MUJICA**

**LA – LIBERTAD**

**2010**

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

La responsabilidad de los hechos, ideas y doctrinas expuestas en esta tesis corresponden exclusivamente al autor y el patrimonio intelectual de la misma le corresponde a la empresa Concepto Azul S. A.

-----  
Juan Quimi Mujica

C. I. : 0923409239.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo va dedicado a DIOS Ser Supremo y Maravilloso que me dio la fortaleza y la inteligencia para conseguir las metas que decidí obtener en mi vida.

A toda mi amorosa familia, cimiento de mi vida que siempre estuvieron apoyándome incondicionalmente, en especial a mi padre que gracias a su esfuerzo estoy terminando mis estudios superiores.

También dedico este trabajo con mucho amor y cariño a mi madre Jenny Mujica (+) y Tomasa Mujica (+) que desde el cielo me brindan sus bendiciones y me guían por buen camino, siempre van a estar en mi corazón.

A mi querida amiga Johanna Lopez, por darme apoyo moral y espiritual, su amor, paciencia y compañía para terminar mis estudios como Biólogo Marino.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a DIOS, por el infinito amor y el maravilloso don de la vida.

A los Directivos de Concepto Azul: Ph.D. Emmerik Motte, Ph.D. Eric Mialhe, Dra. Virna Cedeño por la amabilidad y amistad prestadas y las facilidades ofrecidas para utilizar las dependencias del citado Centro.

Al personal científico y técnico de Concepto Azul por el apoyo brindado. En especial al M Sc. Benoit Direnger y al Tecnólogo Tayron Vera por brindarme su incondicional amistad y valiosa colaboración.

Al personal técnico de Marinazul S.A. por apoyar mi trabajo en especial al Ing. Angel Vilca, a los señores Pablo Preciado, Jean Zarate y Christian Matthos, gracias por estar dispuestos a ayudarme.

A la M Sc. Janeth Galarza por su invaluable colaboración al supervisar esta investigación. Su guía fue acertada y oportuna siempre.

A los Directivos de la Escuela de Biología Marina: Ing. Gonzalo Tamayo, Blgo. Richard Duque por brindarme el apoyo académico y técnico durante mi carrera estudiantil.

A toda mi familia en general que nunca dejaron de apoyarme y que siempre confiaron en mí, como persona, como estudiante, y como futuro profesional.

## ÍNDICE GENERAL

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| <b>ÍNDICE GENERAL.....</b>  | <b>VI</b>   |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>                                       | <b>X</b>    |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>  | <b>XII</b>  |
| <b>GLOSARIO.....</b>  | <b>XIII</b> |
| <b>ABREVIATURAS.....</b>  | <b>XXII</b> |
| <b>RESUMEN.....</b>   | <b>XXIV</b> |
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>   | <b>1</b>    |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>  | <b>4</b>    |
| <b>3. HIPOTESIS.....</b>  | <b>6</b>    |
| <b>4. ANTECEDENTES.....</b>   | <b>7</b>    |
| 4.1. Importancia del perifitón.....                                 | 7           |
| 4.2. Perifitón un alto potencial para la acuicultura.....           | 8           |
| 4.3. Substratos artificiales para colonización de perifitón.....    | 11          |
| 4.4. Bacterias en el perifitón.....                                 | 15          |
| 4.4.1. Colonización de bacterias en sustrato artificiales.....      | 17          |
| 4.5. Aislamiento de Bacterias.....                                  | 20          |
| 4.6. Identificación de Bacterias.....                               | 21          |
| 4.6.1. Identificación por métodos moleculares.....                  | 23          |
| 4.7. Beneficios de las bacterias del perifitón.....                 | 26          |
| 4.8. Cultivo del camarón en Perú.....                               | 27          |
| 4.9. Principales enfermedades en el cultivo de camarón en Perú..... | 29          |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.9.1. Enfermedades de tipo bacterianas.....                             | 30        |
| 4.9.2. Enfermedades de tipo virales.....                                 | 34        |
| 4.10. Estudios realizados sobre enfermedades de camarón en Perú.....     | 38        |
| <b>5. MATERIALES Y METODOS.....</b>                                      | <b>41</b> |
| 5.1. Área de estudio.....  | 41        |
| 5.2. Aislamiento y Purificación de cepas.....                            | 42        |
| 5.2.1. Colocación de sustratos artificiales.....                         | 42        |
| 5.2.2. Preparación de medios de cultivos.....                            | 43        |
| 5.2.2.1. Medio de cultivo Tryptic soy broth.....                         | 43        |
| 5.2.2.2. Medio de cultivo Trypticase soy agar.....                       | 43        |
| 5.2.2.3. Medio de cultivo Agar marino.....                               | 44        |
| 5.2.3. Recolección de muestras.....                                      | 45        |
| 5.2.4. Aislamiento de Bacterias.....                                     | 46        |
| 5.2.5. Purificación de cepas.....  | 47        |
| 5.2.5.1. Protocolo de tinción de Gram.....                               | 49        |
| 5.3. Identificación de bacterias por técnicas moleculares.....           | 50        |
| 5.3.1. Protocolo de extracción de ADN Bacteriano.....                    | 50        |
| 5.3.2. PCR de las muestras de bacterias.....                             | 51        |
| 5.4. Secuenciación y análisis del producto de amplificación.....         | 54        |
| 5.5. Conservación de cepas bacterianas.....                              | 56        |
| 5.5.1. Conservación por refrigeración.....                               | 56        |
| 5.5.2. Conservación por congelación.....                                 | 57        |
| 5.5.3. Conservación por nitrógeno líquido.....                           | 58        |
| 5.6. Cultivos de cepas bacterianas para colonización de geotextiles..... | 58        |
| 5.7. Colonización de bacterias.....                                      | 60        |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.8 Evaluación de geotextiles inoculados con cepas bacterias en cultivo de <i>L. vannamei</i> .....                  | 61        |
| 5.8.1. Maduración de geotextiles.....  | 62        |
| 5.8.2. Densidad de siembra.....  | 63        |
| 5.8.3. Sistema de cultivo.....   | 63        |
| 5.8.4. Parámetros Físico – Químicos.....   | 64        |
| 5.8.5. Alimentación.....   | 65        |
| 5.9. Análisis de resultados y aplicación de formulas.....  | 66        |
| <b>6. RESULTADOS.....</b>  | <b>68</b> |
| 6.1. Aislamiento de bacterias a partir de geotextiles.....   | 68        |
| 6.2. Pruebas de colonización de bacterias en geotextiles.....  | 68        |
| 6.3. Identificación de bacterias por tinción de Gram.....  | 70        |
| 6.4. Identificación de bacterias aisladas del perifitón aplicando técnicas moleculares.....                          | 72        |
| 6.5. Amplificación del ADN bacteriano por PCR.....   | 72        |
| 6.6. Análisis de similitud de secuencias del gen 16S RNA bacteriano comparado con otras especies.....                | 74        |
| 6.7. Conservación de cepas bacterianas.....  | 80        |
| 6.8. Cultivo de cepas bacterianas para la colonización de geotextil.....   | 80        |
| 6.8.1. Densidad celular.....   | 81        |
| 6.9. Colonización de bacterias en el geotextil.....  | 81        |
| 6.10. Evaluación de los geotextiles inoculados con bacterias en los niveles de producción de cultivo de camarón..... | 82        |
| 6.10.1. Tratamientos bacterianos en cultivo del camarón aplicando geotextiles.....                                   | 83        |
| 6.10.2. Supervivencia.....   | 84        |
| 6.10.3. Crecimiento.....   | 85        |

|  |           |
|--|-----------|
| 6.10.4. Biomasa.....                       | 86        |
| <b>7. DISCUSIONES.....</b>                 | <b>89</b> |
| <b>8. CONCLUSIONES.....</b>                | <b>94</b> |
| <b>9. RECOMENDACIONES.....</b>             | <b>96</b> |
| <b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b> | <b>97</b> |
| <b>ANEXOS</b>                              |           |

## INDICE DE FIGURAS

|            | <b>Pág.</b>  |
|------------|--|
| Figura 1.  | Fotografía Satelital de la Camaronera Marinazul.....44       |
| Figura 2.  | Geotextil utilizado como sustrato artificial.....45          |
| Figura 3.  | Vista superficial de la piscina extensiva 21.....45          |
| Figura 4.  | Vista superficial de la piscina de reproductores 13D1.....45 |
| Figura 5.  | Medio de cultivo Tryptic soy broth.....46                    |
| Figura 6.  | Medio de cultivo Tryticase soy agar.....47                   |
| Figura 7.  | Medio de Cultivo Agar marino.....47                          |
| Figura 8.  | Corte de una sección del geotextil.....49                    |
| Figura 9.  | Muestras de geotextil recolectadas.....49                    |
| Figura 10. | Siembra de Bacterias por estrías.....50                      |
| Figura 11. | Aislamiento de bacterias por puntas estériles.....50         |
| Figura 12. | Purificación de Cepas bacterianas.....51                     |
| Figura 13. | Cepas Bacterianas puras.....51                               |
| Figura 14. | Procedimiento de la tinción de Gram.....53                   |
| Figura 15. | Procedimiento de la Extracción de ADN Bacteriano.....54      |
| Figura 16. | Procedimiento del desarrollo de la técnica de PCR.....57     |
| Figura 17. | Secuenciación de las muestras.....58                         |
| Figura 18. | Cepas Conservadas en refrigeración.....60                    |
| Figura 19. | Cepas Conservadas en congelación.....60                      |
| Figura 20. | Cepas Conservadas en nitrógeno líquido.....61                |

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Figura 21. | Esquema del proceso de cultivo de las cepas bacterianas.....   | 62 |
| Figura 22. | Colonización de bacterias.....   | 64 |
| Figura 23. | Maduración de los sustratos artificiales.....  | 65 |
| Figura 24. | Colocación de los sustratos colonizados con bacterias en los tanques de cultivos.....                              | 65 |
| Figura 25. | Siembra de postlarva en los tanques de cultivos.....   | 66 |
| Figura 26. | Monitoreo de los parámetros en los tanques de cultivos.....  | 68 |
| Figura 27. | Cepa Bacteriana 6 G.....   | 72 |
| Figura 28. | Cepa Bacteriana 15 G.....  | 72 |
| Figura 29. | Cepa Bacteriana 17 G.....  | 73 |
| Figura 30. | Cepa Bacteriana 32 G.....  | 73 |
| Figura 31. | Cepa Bacteriana 76 G.....  | 73 |
| Figura 32. | Amplificación con primer RL 71 A y RL 72 A y MPM de 100 pb obteniendo un fragmento de amplificación de 585 pb..... | 76 |
| Figura 33. | Amplificación de las cepas 6G, 15G y 17G con los primers RL 71A y RL 72 A.....                                     | 76 |
| Figura 34. | Amplificación de las cepas 32 G y 76G con los primers FC 27 y RC1492.....  | 77 |
| Figura 35. | Análisis de la cepa bacteriana 6G con un nivel superior de 200 pb idénticas.....                                   | 78 |
| Figura 36. | Porcentaje de similitud entre la cepa bacteriana 6G y cepas del Gen Bank.....                                      | 79 |
| Figura 37. | Postlarva pastoreando los geotextiles.....   | 86 |
| Figura 38. | Supervivencia obtenida en los diferentes tratamientos.....   | 88 |
| Figura 39. | Incremento semanal obtenida durante el bioensayo.....  | 89 |
| Figura 40. | Biomasa obtenida en cada tratamiento.....  | 90 |

## INDICE DE TABLAS

|             | <b>Pag.</b>   |
|-------------|---|
| Tabla # 1.  | Datos de recolección de muestras.....45   |
| Tabla # 2.  | Descripción de las colonias aisladas.....47                                       |
| Tabla # 3.  | Primers universales de bacterias.....52   |
| Tabla # 4.  | Reactivos para el mix de PCR.....53   |
| Tabla # 5.  | Programación del termociclador.....53   |
| Tabla # 6.  | Cantidades de Fertilizantes usados en el bioensayo.....64                         |
| Tabla # 7.  | Parámetros físico – químicos óptimos de cultivo en la camaronera Marinazul.....64 |
| Tabla # 8.  | Análisis Químico proximal del alimento balanceado....65                           |
| Tabla # 9.  | Características morfológicas, tiempo de colonización...69                         |
| Tabla # 10. | Identificación de las cepas bacterianas en estudios por tinción de Gram.....71    |
| Tabla # 11. | Resultados del análisis de secuenciación.....77                                   |
| Tabla # 12. | UFC/mL. de las diferentes cepas bacterianas.....81                                |
| Tabla # 13. | UFC/mL en el proceso de colonización.....82                                       |
| Tabla # 14. | Promedio de parámetro físico – químico.....84                                     |
| Tabla # 15. | Datos del incremento semanal de cada tratamiento.....86                           |

## **GLOSARIO.**

**Alcohol-acetona:** Sirve para realizar la decoloración, ya que en la misma es soluble el complejo I<sub>2</sub>/cristal violeta. Los organismos Gram positivos no se decoloran, mientras que los Gram negativos sí lo hacen.

**Alfa Proteobacterias:** Los integrantes de este sub-phylum crecen con niveles bajos de nutrientes (oligotróficos), algunos poseen prostecas (prolongaciones celulares). Incluye a fijadores de nitrógeno, quimioautótrofos y quimioheterótrofos.

**Atrofia:** En términos biológicos consiste en una disminución importante del tamaño de la célula y del órgano del que forma parte, debido a la pérdida de masa celular.

**Bacterias desnitrificantes:** Son bacterias heterótrofas que actúan en la reducción del ion nitrato presente en el agua, a nitrógeno molecular.

**Bacterias nitrificantes:** Son bacterias que actúan en la oxidación biológica de amonio con oxígeno en nitrito realizadas por bacterias nitrosomonas, seguido por la oxidación de esos nitritos en nitratos realizadas por las bacterias nitrobacter.

**Biofilm Bacteriano:** Es la adhesión de bacterias a un sustrato que se estabilizan gracias a la producción de polímeros extracelulares que permiten su fijación.

**Biofiltración:** Es la transformación de la materia orgánica presente en las aguas residuales que es llevada a cabo por poblaciones bacterianas que se adhieren al soporte granulado y lo colonizan. Así, el medio filtrante se colmata progresivamente debido tanto a la generación de una película biológica en la superficie del soporte como a la retención de las materias en suspensión. El exceso de la biomasa debe ser eliminada periódicamente del sistema para mantener la capacidad de depuración del mismo. Esta operación se realiza mediante un lavado con aire y agua.

**Bromuro de etidio:** Es un agente intercalante usado comúnmente como marcador de ácidos nucleicos en laboratorios de biología molecular para procesos como la electroforesis en gel de agarosa. Cuando se expone esta sustancia a luz ultravioleta, emite una luz roja-anaranjada, que se intensifica unas 20 veces después de haberse unido a una cadena de ADN.

**Compuestos Nitrogenados.**  $\text{NH}_3/\text{NH}_4 - \text{NO}_2 - \text{NO}_3$  surgen como resultado de la biodegradación de la materia orgánica producida en el estanque: excremento de camarones, resto de comidas, plantas muertas, etc.. por parte de las llamadas bacterias nitrificantes.

**Cultivo extensivo:** Es el sistema de producción usado en las fincas acuícolas camaroneras, donde no se proporciona ninguna clase de alimentos suplementario y la cosecha se efectúa a partir del momento en que se obtiene animales de talla comercial. Las densidades a las cuales se siembran los organismos son bajas y la intervención del hombre se limita simplemente a la siembra y al aprovechamiento de estos organismos.

**Cultivo intensivo:** Se efectúa básicamente con fines comerciales y para ésto se necesitan estanques técnicamente contruidos con entrada y salida de agua. Las cosechas y las siembras se llevan a cabo periódicamente obedeciendo a una programación de la producción. En este tipo se realiza un control permanente de la calidad del agua y se practican abonamientos frecuentes con fertilizantes orgánicos e inorgánicos. Se suministra alimento concentrado con buenos niveles de proteína en forma permanente y se programa la densidad de siembra, la cual varía de acuerdo a la especie y al grado de explotación. Se aplica una mayor tecnología cuya base está dada por los recambios continuos de agua y/o la aireación.

**Cultivo semi-intensivo:** Es el sistema de producción usado en las fincas acuícolas camaroneras, donde se limita a la siembra de los camarones, abonamiento, preparación del estanque y se suministra alimento concentrado rico en proteína. Se emplean densidades un poco más altas que en el sistema extensivo y se controla el cultivo; además existe una mayor producción debido al suministro de alimentos y abonamiento.

**Cristal violeta:** Colorante catiónico que penetra en todas las células bacterianas tanto Gram positivas como Gram negativas.

**Cromatóforo:** Consiste en una célula discoidal o en forma de estrella aplanada con puntas ramificadas, que contiene en su interior aparte del núcleo, mitocondrias y demás organelos citoplásmicos cientos e incluso miles de gránulos de alguna sustancia colorida.

**Electroforesis:** La electroforesis es un proceso que se utiliza para separar macromoléculas en una solución. La electroforesis en agarosa permite separar moléculas de DNA, cuando éstas son sometidas a un campo eléctrico y atraídas hacia el polo opuesto a su carga neta.

**Estratificación horizontal:** Estratificación espacial que se debe a la existencia de distintos tipos de vegetación desde el centro hasta los límites del ecosistema. Estas variaciones se deben al clima y factores locales del sustrato.

**Estratificación vertical:** Estratificación espacial determinada por la luz y temperatura, donde cada estrato constituye un microhabitat.

**Fertilización:** Es la práctica de aumentar el nivel de nutrientes en el suelo o columna de agua en un estanque, utilizados por el fitoplancton para su crecimiento y multiplicación, mediante la aplicación de fertilizantes orgánicos e inorgánicos, lo cual incide en el incremento de la productividad primaria.

**Geotextil:** Es un material textil permeable de estructura planar, formada por fibras sintéticas poliméricas (polipropileno, poliéster o poliamidas) unidas de diversas formas.

**Hemocitos:** Son las células sanguíneas del camarón que son producidas por los tejidos hematopoyético.

**Lugol:** Está formado por  $I_2$  (yodo) en equilibrio con KI (yoduro de potasio), el cual está presente para solubilizar el yodo. El  $I_2$  entra en las células y forma un complejo insoluble en solución acuosa con el cristal violeta.

**Metabolitos:** Sustancia que el cuerpo elabora o usa cuando descompone los alimentos o sustancias químicas, este proceso produce energía y los materiales necesarios para el crecimiento, la reproducción y ayuda a eliminar las sustancias tóxicas.

**Mutualismo:** Es una relación interespecífica temporal en que ambos organismos obtienen algún grado de beneficio.

**PCR:** La reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde. Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN.

**Perifitón:** Comunidad compleja de microbiota que se encuentra asociada a un sustrato natural o artificial sumergido en el agua.

**Postlarva:** Es un estadio del ciclo biológico del camarón marino, alcanzado después de haber evolucionado a través de los diferentes estadios larvales. Es en este estadio cuando logra crecer a un tamaño de 7 a 12 mm, para ser utilizado en el cultivo en estanques de producción de las fincas.

**Primers:** Son oligonucleótidos sintéticos que hibridan con la región, complementaria al ADN molde, que se desea amplificar y propician el inicio de la reacción de elongación por la Taq ADN polimerasa.

**Probiótico:** Son microorganismos vivos que se adicionan a un alimento que permanecen activos en el intestino y ejercen importantes efectos fisiológicos. Ingeridos en cantidades suficientes tienen efecto muy beneficioso, como contribuir al equilibrio de la flora bacteriana intestinal del huésped y potenciar el sistema inmunológico.

**Proteobacterias:** Son uno de los principales grupos de bacterias. Patógenas y de vida libre, e incluyen muchas de las bacterias responsables de la fijación del nitrógeno. Gram negativas, con una pared celular formada principalmente de lipopolisacáridos. Muchas se mueven utilizando flagelos. La mayoría de las proteobacterias son anaerobias, pero hay muchas excepciones. La nutrición es usualmente heterótrofa, pero hay grupos que realizan fotosíntesis.

**Prueba de la Catalasa:** Se utiliza para comprobar la presencia del enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo.

**Prueba de la Oxidasa:** Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana.

**Quorum sensing:** Es un mecanismo de control de expresiones genéticas dependiente de la densidad celular. Este fenómeno es el responsable de que un conjunto de células independientes, bajo la generación de señales extracelulares, desarrolle comportamientos sociales coordinados.

**Rickettsia:** Son pequeñas bacterias del orden de las proteobacterias son parásitos intracelulares obligados, muy pequeñas, Gram-negativas y no forman esporas. Son altamente pleomórficas pues se pueden presentar como cocos (0,1  $\mu\text{m}$  de diámetro), bacilos (1-4  $\mu\text{m}$  de longitud) o hilos (10  $\mu\text{m}$  de largo).

**Safranina:** Sirve para hacer una tinción de contraste que pone de manifiesto las bacterias Gram negativas.

**Secuencias conservadas:** Son secuencias biológicas similares o idénticas que pueden encontrarse en ácidos nucleicos, proteínas o polisacáridos, dentro de múltiples especies de organismos o dentro de diferentes moléculas producidas por el mismo organismo.

**Selección genética:** Consiste en elegir los reproductores para obtener, a más o menos largo plazo, animales que satisfagan el objetivo buscado.

**Sucesión:** Es la sustitución de las comunidades de una zona a lo largo del tiempo. La sucesión es un proceso lento y gradual.

**Tinción de Gram:** Es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología para la caracterización de bacterias. Considerándose Bacteria Gram positiva a las bacterias que se visualizan de color violeta y Bacteria Gram negativa a las que se visualizan de color rosa.

**Vibriosis:** Son enfermedades bacterianas resultantes de la producción masiva y coordinada de toxinas por vibrios.

**Virión:** Unidad estructural de los virus. Consta fundamentalmente de dos estructuras imprescindibles: Un ácido nucleico (ADN o ARN) y una envoltura proteica (cápside). A estas estructuras básicas se añade en algunos casos una envoltura lipídica (pelos) y/o espículas de glucoproteína.

## ABREVIATURAS

|                |   |
|----------------|---|
| %              | Porcentaje  |
| °C             | Grados Centigrados  |
| ADN            | Ácido desoxirribonucleico                                       |
| ARNr           | Ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal                       |
| BET            | Bromuro de etidio   |
| BP             | <i>Baculovirus penaei</i>                                       |
| CIPs           | Cuerpos de inclusión polihedrales                               |
| DMSO           | Dimetil sulfoxido   |
| EPS            | Sustancias extrapolisacaridas.                                  |
| G              | Geotextil   |
| G<             | Gramos  |
| Ha             | Hectáreas   |
| IHNNV          | Virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética<br>infecciosa |
| Kg             | kilogramos  |
| L              | Litros  |
| mL             | Mililitros  |
| m <sup>2</sup> | Metros cuadrados  |
| mg             | Miligramos  |
| MPM            | Marcador de peso molecular                                      |
| NaCl           | Cloruro de sodio  |
| NHP-B          | Necrosis Hepatopancreática                                      |

|           |                                       |
|-----------|---------------------------------------|
| PCR       | Reacción en cadena de la polimerasa   |
| PBS       | Solución Buffer Fosfatada             |
| Pb        | pares de base                         |
| PL        | Postlarva                             |
| RDS       | Síndrome de la deformidad del rostrum |
| rpm       | Revoluciones por minutos              |
| T         | Tratamientos                          |
| TAE       | Tris – Acido - EDTA                   |
| TE        | Tris – EDTA.                          |
| TSA       | Trypticase soy agar                   |
| TSB       | Tryptic Soy Broth                     |
| UPS       | Unidades practicas de salinidad       |
| UFC       | Unidad formadora de colonias          |
| <i>ul</i> | Microlitros.                          |
| WSSV      | Virus de la mancha blanca             |

## RESUMEN

El uso de sustratos artificiales es una técnica de manejo que hacen más eficientes los sistemas de cultivos acuáticos. El perifitón o biofilm que se fija a estos, aumenta la producción de alimento natural suplementario, mejoran los niveles de calidad de agua y se obtienen efluentes más limpios. Se evaluó el efecto de bacterias fijado a sustratos artificiales sobre la supervivencia, crecimiento, biomasa de *Litopenaeus vannamei* en cultivo por un periodo de 30 días. en un tanque de 0,64 m<sup>2</sup> se instalaron 2 secciones de geotextiles de 100 cm<sup>2</sup> colonizados con las diferentes bacterias (6G, 15G, 17G, 32G y 76G), donde se colocaron PL10 a razón de 160 individuos por m<sup>2</sup>, la fertilización y alimentación se realizó según los protocolos de la Empresa Marinazul S.A. (Tumbes – Perú).

La supervivencia fue del 99 % con los tratamientos bacterianos 6G, 32G y 76 G, 6% más que el tratamiento control (sin sustrato artificiales). El peso final fue entre 2,11 g y 2,45 g en los diferentes tratamientos, superando al peso final del control que fue de 1,78 g. La biomasa final de 35 % más con el tratamiento 76 G,

mientras que con los otros tratamientos se obtuvo entre 20 % y 27 % más que el tratamiento sin substrato. De todos los tratamientos se obtuvo mayor resultado en cuanto a supervivencia, crecimiento y biomasa con la cepa bacteriana 76G (*Bacillus sp* ).

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarón se inició a gran escala en diversos países del mundo en los años ochentas, a partir de entonces las producciones se incrementaron rigurosamente (Chávez & Higuera, 2003). Al respecto, Tacon (2002) indica que alrededor de 50 países se dedican al cultivo de este organismo. El principal mercado para el camarón es USA; aunque en los últimos años se viene incrementando la demanda en Europa y Japón (Tobey et al., 1998). La rápida expansión de la crianza de camarón ha generado ingresos substanciales para muchos países en desarrollo, así como para los países desarrollados (Chávez & Higuera, 2003; FAO et al. 2006). Tacon (2002) describe que los sistemas de cultivo de camarón pueden ser divididos en tres categorías básicas: extensivo, semi-intensivo e intensivo, aun cuando las definiciones precisas de estos sistemas varían de país a país. Asimismo, Chávez & Higuera (2003) mencionan que mientras más intensivo sea el sistema de cultivo de camarón, mayor será la dependencia por la alimentación artificial.

La industria camaronera mundialmente se ve afectada por varios problemas ligados a: 1) Las enfermedades infecciosas y no infecciosas, 2) Al incremento del costo de producción, en particular del alimento balanceado Y 3) El impacto sobre el medio ambiente.

Esta situación se ha ido empeorando con la intensificación del cultivo de camarón. Entre las enfermedades infecciosas de importancia económica para el camarón de cultivo constan las virales, las causadas por bacteria intracelular (ricketsias), y extracelular (vibriosis). (Lightner 1993,1996; Brock and Lightner 1990; Flux and Main, 1992; Jonson and Cassout, 1995). Un número de enfermedades no infecciosas son también de importancia en la industria, generalmente inducidas por el exceso de compuestos nitrogenados que se vuelven tóxicos ( $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$ ) o causadas por condiciones ambientales extremas, desequilibrios alimenticios, y factores genéticos (Brock and Lightner, 1990; Braca, 1992; Johson, 1995; Lightner, 1996).

La utilización exclusiva de larvas provenientes de reproductores certificados y realizando selección genética de líneas resistentes ha permitido de combatir las enfermedades virales y causadas por bacterias intracelulares.

El perifitón es una comunidad compleja de microbiota que tiene el potencial de incrementar la producción del estaque, de mejorar la calidad de agua, reducir la dependencia de recursos externos y reciclar los nutrientes

En acuicultura se estudia cada día más la utilización del perifitón para mejorar las condiciones de cultivo y aumentar la productividad. En definitiva, el perifitón presenta la ventaja de alimentar a los camarones con masa microbiana.

Por todo lo anteriormente descrito la presente investigación tuvo como propósito, identificar las comunidades bacterianas que componen el perifitón natural dentro de piscinas de cultivo utilizando técnicas de Microbiología tradicional y técnicas de Biología Molecular, posteriormente realizando bioensayos con geotextiles que permitieron seleccionar las bacterias beneficiosas para finalmente aplicarlas en los sistemas de cultivo en donde se evaluarán sus efectos beneficiosos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 .OBJETIVO GENERAL:**

- Utilizar bacterias beneficiosas del perifitón a través de bioensayos de fijación en sustratos artificiales (geotextiles) que permitan evaluar los efectos favorables en el cultivo de *Litopenaeus vannamei* en Tumbes (Perú).

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Obtener un banco de cepas bacterianas nativas del perifitón, mediante su aislamiento desde sustratos artificiales (geotextiles), en cultivo de *Litopenaeus vannamei* para posteriores estudios de identificación y cultivo
- Identificar las bacterias aisladas mediante técnicas de Biología Molecular a partir del gen ribosomal 16Sr para su registro como componente del perifitón.
- Desarrollar un protocolo de cultivo y siembra de estas cepas que colonicen geotextiles y tractos digestivos de camarones para la utilización en el sistema de cultivo del *Litopenaeus vannamei*

- Evaluar el potencial de los sustratos artificiales (geotextiles) inoculados con bacterias, mediante bioensayos que permitan la comprensión de los efectos beneficiosos de estas cepas bacterianas en los niveles de producción (supervivencia y crecimiento), de cultivo del *Litopenaeus vannamei*

### **3. HIPÓTESIS**

La utilización de bacterias fijadas sobre sustratos artificiales (geotextiles) dentro del sistema de producción de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* ayudará a mejorar los niveles de supervivencia y crecimiento del camarón.

## CAPÍTULO II

### 4. ANTECEDENTES.

#### 4.1 Importancia del perifitón en los sistemas acuáticos.

El perifitón, definido como una comunidad compleja de microbiota que se encuentra asociada a un substrato natural o artificial sumergido en el agua, cobra gran importancia tanto en ambientes lóticos (sistema de agua corriente como en los ríos, arroyos y manantiales) como lénticos (es de agua quieta o de escaso caudal como en los lagos, estanques, pantanos y embalses). La comunidad del perifitón comprende: bacterias, hongos, protozoarios, fitoplancton, zooplancton, organismos bentónicos, detritos orgánicos y un rango de otros invertebrados y sus larvas. (Van Dam et al. 2002).

La importancia que en general se atribuye al perifitón en los ecosistemas acuáticos fue resumida por Moreira (1998) quien destacó su producción de metabolitos orgánicos que alimentan diversos organismos; su contribución con más del 70 % de la materia orgánica a la productividad total; sus altas tasas de reciclaje de los nutrientes (compuestos nitrogenados y fosfatados); su posibilidad de proporcionar alimento a varios tipos de organismos, contribuye a la fijación del carbono en ecosistemas acuáticos, excelente indicador de cambios ocurridos en el medio acuático, es usado para mejorar la calidad del agua en lagos y reservorios.

Para mantener una alta producción primaria dentro del perifitón se ha sugerido que exista una relación mutualista entre las algas y las bacterias permitiendo un ciclo interno eficaz de nutrientes incluyendo el carbono. Así, las bacterias pueden tomar los exudados algáceos y las algas pueden beneficiarse de la regeneración de los nutrientes realizados por las bacterias. Una relación tan mutualista ha sido divulgada por varios autores y puede dar lugar a alta actividad bacteriana dentro de biofilms autotróficos.

#### **4.2. El perifitón: un alto potencial para la acuicultura.**

Para que la acuicultura se consolide como una actividad económicamente viable y ecológicamente sustentable, debe superar algunos retos entre los que destaca el de entender el importante papel del alimento natural (incluyendo microorganismos), en la dieta completa de especies bajo condiciones prácticas de cultivo. En acuicultura se estudia cada día más la utilización del perifitón para mejorar las condiciones de cultivo y aumentar la productividad. En definitiva, el perifitón presenta la ventaja de alimentar a los camarones con masa microbiana que se estaría regenerando a través de la absorción de los nutrientes del agua lo que permite disminuir la cantidad de alimento ofrecido.

En los últimos años el perifitón se considera un grupo poco estudiado, rico en diversas formas, géneros y especies, con un alto potencial para ser usado como

fuente de alimento vivo para los organismos que se cultivan con interés comercial y que presenten hábitos bentónicos al menos en alguna fase de su ciclo de vida (Alfonso, et al. 2004).

Los sistemas de acuicultura basados en perifitón ofrecen la posibilidad de aumentar la producción primaria y la disponibilidad del alimento (Huchette, Beveridge, & de Baird; Irlanda 2000; Azim, Wahab, van Dam, & de Beveridge; Verdegem 2001) La disponibilidad del alimento natural para los organismos cultivados es más alta en los sistemas basados en substratos debido a que el perifitón sirve como alimento adicional además del fitoplancton (Miller & Falace 2000; Azim 2001). La nueva producción primaria y la producción secundaria béntica de las comunidades fijadas en el substrato artificial sirven como una nueva red alimenticia, terminando como biomasa de los organismos cultivados. (Miller & Falace 2000).

Trabajos relacionados con la alimentación indican que los camarones podrían aprovechar más del 40 – 50 % del perifitón para su metabolismo (Journal Experimental Marine Biology Ecology, 34:788-96, 2007; Aquaculture Research, 35: 508-515, 2004).

Según estudios realizados por Goldman y Horne (1994), las comunidades que componen el perifitón, representan un rol importante en el desarrollo de la red

alimenticia de ecosistemas loticos, debido que el pastoreo (bidimensional) de éste resultan ser, mecánicamente, más eficiente que la filtración (tridimensional) de fitoplancton.

El perifitón, ha sido utilizado como alimento en cultivos de tilapia *Oreochromis niloticus* (Phillips et al., 1994). Estudios realizados por Dempster et al. (1993, 1995) demostraron que la tasa de ingestión en tilapias, es mayor cuando consumen organismos propios del perifitón que fitoplanctónicos.

En la India se realizaron pruebas para determinar los efectos del perifitón sobre la producción de carpas (Rohu, *Labeo rohita* y Gonia, *Labeo gonius*), para ello se compararon los resultados obtenidos entre el sistema de cultivo tradicional y uno que incluía fragmentos de bambú como sustrato para el desarrollo del perifitón. La producción de Rohu, fue superior en un 75 % en el sistema de cultivo con bambú que el tradicional, mientras que para Gonia, no hubo mayores variaciones entre ambos sistemas. (Azim et al 2001).

Abreu et al. (2007), estudiando la contribución del perifitón y alimento artificial sobre el crecimiento de *F. paulensis* en tanques y rediles, observaron que en los rediles, la especie preferentemente consumió diatomeas céntricas y concluyeron que el camarón ingiere selectivamente algunos microorganismos del perifitón o

asimila diferencialmente compuestos específicos del alimento artificial, debido a la digestibilidad diferencial.

En Venezuela, datos de 8 ciclos de cultivo larvario demostraron que el uso de aquamats, reduce en 60 % el alimento suplementario y aumenta la sobrevivencia de 74% a 82%, mientras que en Ecuador, se utilizaron los aquamats para cultivo larvario de *Litopenaeus vannamei*, con los siguientes resultados: un ahorro de 4 días en el ciclo de cultivo, 50 % de ahorro en el uso de artemia, y un 85 % de sobrevivencia PL-1 y PL-12. (Campaña 2004).

El ensamblaje del perifitón es un componente importante del ecosistema que funciona, limpiando grandes cantidades de nitrógeno y de fosforo de la columna de agua (Blumenshine 1997), proporcionar una fuente nutritiva fácilmente disponible de alimento para el pastoreo de invertebrados (Fink y Von Elert 2006) y actúa como un componente clave de metabolismo del sistema, siendo un productor primario importante y por lo tanto un removedor importante del CO<sub>2</sub> de los ecosistemas acuáticos.

#### **4.3 Substratos artificiales para la colonización del perifitón.**

El mejor método para el estudio de la colonización y sucesión del perifitón, es el uso de substratos artificiales. Son ideales para estudiar ritmos de colonización,

interacciones entre poblaciones, impacto por contaminantes, y para comparar distintos ambientes entre sí (Lin y Shao 2002). Los substratos artificiales (vidrio, plástico, cerámica y madera, entre otros) permiten realizar estimaciones cuantitativas con relativa precisión, de fácil manipulación y son indicados para analizar estrategias adaptativas de los organismos al hábito perifítico (Roldán 1992).

En acuicultura se han utilizado los substratos artificiales para mejorar la calidad del agua y la producción de la especie cultivada, se han utilizado varios tipos de materiales tales como plásticos, bambú, madera, jacinto de agua, red de nylon (Huchette y Beveridge, 2005), PVC (Keshavanath et al, 2001), hojas plásticas (Tidwell et al. 1998) y materiales creados para requisitos particulares como Aquamats (Bratvold y Browdy, 2001) se han utilizado como substratos.

Los substratos artificiales constituyen una superficie adicional para incrementar la producción natural del agua de los estanques a través de la fijación de perifitón o biofilm los que proveen de un alimento natural suplementario para los cultivos, permitiendo aumentar la capacidad de carga de estos sistemas, mejorando su producción y productividad a menores costos. Así mismo, los organismos del perifitón biofiltran el agua de cultivo generando efluentes más limpios y de mínimo impacto sobre los ecosistemas exteriores a los sistemas de cultivo.

El perifitón fijado a sustratos artificiales proporciona un hábitat adicional para potenciales organismos que sirven de alimento para el camarón, pueden servir como un refugio para pequeños crustáceos o camarones que son vulnerables al canibalismo. Del mismo modo crean un hábitat para bacterias nitrificantes y denitrificantes que pueden proporcionar mejor calidad de agua en el cultivo por convertir el nitrógeno tóxico residual en formas menos tóxicas (Otoshi et al. 2006).

El sustrato proporciona al perifitón estabilidad contra la corriente y los cambios de flujo. Debido a que el perifitón puede colonizar diferentes sustratos (arena, sedimento, rocas, plantas y animales), se considera como uno de los factores que determina la abundancia y composición de la comunidad. (Gualtero 2007).

Martínez et al. (2004), refieren que los sustratos artificiales proveen una fuente de alimento natural, biofiltración y estructura (para soportar densidades de siembra más altas y reducir la depredación).

La orientación del sustrato (horizontal o vertical), es también un factor importante, (Ács y Kiss, 1991). A partir de varios estudios resulta conveniente emplear la disposición vertical para restringir únicamente la colonización de especies propias del perifitón, ya que ésta orientación reduce la acumulación del detritus y a su vez la acumulación de especies planctónicas. (Lane y Taffs 2003).

La estratificación vertical de la comunidad es representativa de la respuesta de organismos a los gradientes de la luz, oxígeno, sulfuro, y pH en la relación con sus requisitos fisiológicos.

Los substratos introducidos en un agua de superficie para la colonización biótica se han utilizado extensivamente para caracterizar las comunidades algáceas que habitaban ecosistemas acuáticos. Se han utilizado para estudiar la colonización, la sucesión, la dinámica y la contaminación.

Estos substratos representan un ejemplo típico de las asociaciones microbianas estratificadas en una microescala según la fisiología de los organismos y los gradientes fisicoquímicos del ambiente. Son sistemas altamente productivos y la materia orgánica formada por fotosíntesis oxigenica en el milímetro más predominante se recicla casi totalmente en capas más profundas a través de metabolismos aerobios y anaerobios.

En acuicultura los substratos microbianos se han utilizado como alimentación para la Tilapia, *Oreochromis niloticus* (Phillips 1994) y como sistema de filtración de efluentes, y como transformadoras de compuestos nitrogenados (Bender 2004; Lee 1996).

#### **4.4 Bacterias en el Perifitón.**

Las bacterias pueden adherirse a las superficies naturales o artificiales y formar las comunidades multicelulares sésiles conocidas como biofilms (Dalton 1998). El biofilm es el agregado de microorganismos y productos extracelulares asociados a un sustrato. Dentro de todos los microorganismos que componen el perifitón, las bacterias son las más importantes debido a que:

- Son las primeras a colonizar el sustrato, y que en función de ellas se desarrollan las otras comunidades de microorganismos.
- Las bacterias favorecen la fijación de las diatomeas a la superficie del geotextil. (Riemann et al. 2000).
- El biofilm bacteriano contribuye al crecimiento de las larvas ya que le provee de nutrientes esenciales (esteroles, ácidos grasos esenciales, aminoácidos y vitaminas) esto hace entonces una fuente complementaria importante del alimento. (Thompson et al., 2002).
- El consumo de bacterias probióticas fijadas en el geotextil permite de colonizar el intestino del camarón lo que ayuda a combatir enfermedades como la vibriosis mejorando así la producción en el sistema de cultivo. También, grandes cantidades de bacterias capaces de fijarse tienen la

capacidad de producir enzimas extracelulares que mejoraran la asimilación del alimento.

- Las bacterias juegan un rol importante en los ciclos de mineralización de la materia orgánica a dióxido de carbono, maximizando la productividad primaria que estimula la producción de camarón, la nitrificación y desnitrificación. Las bacterias transforman sustratos complejos en formas más fáciles de utilizar por otros organismos heterotróficos, dando una continuidad al flujo del carbono en el ambiente acuático (Smith et al., 1995).

Buford et al. (2005), en el cultivo intensivo de camarones, estimaron que la biota natural dominada por partículas de floc bacterianos contribuyeron sustancialmente a la nutrición del camarón sin importar la talla. Esto es complementado por Avnimelech (2000) en Ballester et al. (2003) quienes determinaron que la presencia de microorganismos fijados a sustratos en tanques de cultivo aumentó la eficiencia de conversión proteica de 20 % a 25 % hasta 45 %, concluyendo que estos convierten el actual nitrógeno inorgánico en el agua y lo ponen a disposición bajo la forma de proteína microbiana que es ingerida por los organismos cultivados, ahorrando el alimento balanceado suministrado.

La función principal de bacterias heterotróficas en las interacciones con el fitoplancton es degradación de la materia orgánica y la producción de biomasa de

la célula, que está principalmente acanalado a niveles tróficos más altos de la red alimenticia acuática. Las bacterias también aumentan las probabilidades de la agregación del fitoplancton o otras partículas y actúan como estabilizadores. Por lo tanto, las bacterias libremente o asociado firmemente al fitoplancton pueden aumentar eficientemente la sedimentación y el retiro de la materia orgánica de la columna de agua.

Bender y Phillips (2004) indican que los substratos microbianos se presentan en la naturaleza como comunidades estratificadas de cianobacterias y bacterias, pero que ellas pueden ser cultivadas a gran escala y manipuladas para una variedad de funciones; Además reportan que las funciones de los substratos bacterianos cubren áreas de la acuicultura y la biorremediación. En este sentido, las investigaciones actuales examinan el rol de los substratos en la nitrificación de los efluentes de la acuicultura enriquecidos de nutrientes.

#### **4.4.1 Colonización de Bacterias en Substratos Artificiales.**

Dentro del proceso de colonización de una superficie sumergida, las bacterias son consideradas como una comunidad importante por ser los primeros organismos colonizadores además influenciando en la fijación de otros microorganismos a través de relaciones inter-microbianas. Para este proceso las bacterias forman un “Biofilm bacteriano” que se define como la adhesión de bacterias a un substrato

que se estabilizan gracias a la producción de polímeros extracelulares que permiten su fijación. Estas pueden presentar una única especie o un abanico de especies diferentes (Davey y O'Toole; 2000, Kraigsley et al 2002).

No todas las bacterias son capaces de adherirse a un substratos, hay ciertas bacterias que sufren cambios en su morfología para poder adherirse al substrato, además están van a depender de las primeras bacterias para poder fijarse a este proceso es denominado como "Biofilm bacteriano" El proceso empieza a formarse cuando alguna célula individual se une inicialmente a una superficie, después de la unión, la célula empieza a desarrollarse y a esparcirse sobre la superficie en una monocapa, mientras forma micro colonias, mientras tanto, las células cambian su comportamiento y dan lugar al biofilm maduro, uno de estos cambios es la producción de la matriz de exopolisacáridos que cementará todo el conjunto (Danese et al. 2000). Además estas primeras bacterias fijadas en el substrato artificial favorecerán la dinámica de adhesión de los colonizadores sucesivos (bacterias colonizadoras secundarias, micro algas, protozoarios, nemátodos y otros).

El biofilm se puede dividir en cuatro fases: 1) adsorción de los compuestos orgánicos disueltos, es decir macromoléculas que atan a las superficies sumergidas siendo un proceso fisicoquímico espontáneo; 2) establecimiento bacteriano, después de la colonización bacteriana comienza a producir las sustancias poliméricas extracelulares (EPS), estas las protegen contra

depredadores, y aumentan su resistencia a la radiación y a la deshidratación; 3) colonización por los microorganismos unicelulares eucarióticos, principalmente el protozoario, las microalgas y cianobacterias y 4) establecimiento de organismos multicelulares eucarióticos.

La composición de especie de biofilms depende sobre todo de los aspectos cualitativos y cuantitativos del inóculo, la luz, el substrato, la fuente nutriente, la competición son importantísimos en la determinación de si la superficie colonizada se convertirá en un ecosistema dinámico del biofilms, o si organismos más altos se establecerán para producir una comunidad del clímax (Biggs 1996).

Los organismos de Biofilm producen una medida de protección contra los agentes antagónicos que están presentes en el ambiente. Protección contra bacterias liticas tales como *Bdellovibrio spp*, los efectos tóxicos de los metales pesado, y los agentes bactericidas son ventajas importantes producidas a microorganismos dentro de biofilms.

Las sustancias poliméricas extracelulares también tienen el potencial para prevenir el acceso de ciertos agentes antimicrobianos actuando como intercambiador de iones (Gilbert 1997). Además, pueden proporcionar la protección contra una variedad de tensiones ambientales por ejemplo radiación ultravioleta, cambios del pH, choque osmótico, y desecación.

La composición y las características de las sustancias poliméricas extracelulares se han identificado en estudios de ciertos organismos modelo como: *Pseudomonas aeruginosa* (Wingender, 2001). Abarcan principalmente de exopolysacaridos: (40 – 95 %), de proteína (1 – 60 %), de ácidos nucleicos (1 -10 %), y de lípidos (1 – 40 %).

Los mats microbianos desarrollados en aguas superficiales están compuestos primariamente de cianobacterias y diatomeas oxigénicas (en las capas más superiores), bacterias púrpuras y verdes sulfurosas (en las capas intermedias) y bacterias reductoras de sulfatos (en las capas profundas). También se observan poblaciones de microorganismos heterótrofos y fermentativos y oxidantes de sulfuro que no forman capas estables y no tienen una posición definida en los tapetes. (Navarrete et al., 2000).

#### **4.5 Aislamiento de Bacterias.**

El aislamiento consiste en separar un tipo de microorganismo a partir de una población que los contiene de varios tipos. En hábitats naturales, raramente encontramos a los microorganismos en cultivo puro (un solo tipo de microorganismo), por lo tanto es necesario hacer algún procedimiento de aislamiento para separar e identificar los distintos tipos de microorganismo

presentes. El aislamiento se puede lograr directamente a partir de una muestra cuando el o los microorganismo está en una proporción adecuada.

Cuando el microorganismo que se desea aislar e identificar se encuentra en baja proporción en la muestra, o interesa un solo tipo de microorganismo se lleva a cabo un procedimiento llamado búsqueda que involucra una primera etapa de aumento del número de microorganismos del tipo que se desea aislar en relación al resto de la población. Luego se aísla por el método de estrías o por dilución y se identifica.

#### **4.6 Identificación de Bacterias.**

Casi todos los miembros de una misma especie bacteriana deben poseer un sistema metabólico similar, por lo que las enzimas y metabolitos presentes en la bacteria, no diferirán mucho entre sí. La dificultad en la identificación de una especie bacteriana estriba en que los enzimas o moléculas responsables de determinados procesos metabólicos no siempre se expresan fenotípicamente.

La identificación es un proceso por el cual debemos determinar a qué especie pertenece una determinada cepa bacteriana, mediante la comparación de una serie de características que pueden ser puestas en evidencia en el laboratorio.

Las características que se tienen en cuenta para lograr una correcta identificación son las siguientes:

**Características bacterianas:** Medios en los que crece, temperatura, atmósfera de crecimiento (crecimiento en aero o anaerobiosis) y morfología de las colonias.

**Características estructurales:** Tinción de Gram, morfología, dimensiones, forma de agruparse, presencia de estructuras (cápsula, flagelos, esporas) y movilidad.

**Características metabólicas:** Acción bacteria/sustrato: (Enzimáticas, no enzimáticas), Acción agente químico/bacteria: (Pruebas de susceptibilidad), determinación de metabolitos libres, características inmunológicas y análisis de DNA.

En el proceso de identificación tradicional se establecen tres niveles de procesamiento: el primero hace referencia a la morfología y a su comportamiento ante la tinción de Gram u otras tinciones que se utilicen específicamente para cada grupo, el segundo nivel de identificación debe especificar el género al que pertenece el microorganismo, por último, la conclusión debe hacerse con la identificación a nivel de especie.

#### 4.6.1 Identificación por técnicas moleculares.

En bacterias, la identificación de especie a nivel molecular se basa en el análisis del gen que codifica para el ARN ribosomal de la subunidad 16S (16S rRNA). Esta molécula de alrededor de 1.500 pb, presente en todas las bacterias, fue la primera en utilizarse para identificación bacteriana y ha sido la más ampliamente utilizada para estudios de filogenia y taxonomía bacteriana, lo que ha contribuido a que existan amplias bases de datos. Generalmente, es suficiente analizar las primeras 500 pb de este gen, ya que es la región más variable, pero en otros casos no es posible resolver a nivel de especie aun secuenciando el gen completo, por lo que se debe recurrir al estudio de otros sitios del genoma.

El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese a principios de la década de 1970. Los estudios de Woese originaron la división de los procariotas en dos grupos o reinos: *Eubacteria* y *Archaeobacteria*, cuya divergencia es tan profunda como la encontrada entre ellos y los eucariotas. Además, permitieron establecer las divisiones mayoritarias y subdivisiones dentro de ambos reinos. Posteriormente, Woese introdujo el término dominio para sustituir al reino como categoría taxonómica de rango superior, y distribuyó a los organismos celulares en tres dominios: *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*, el último de los cuales engloba a todos los seres eucariotas. Desde entonces, el análisis de los ARNr 16S se ha utilizando

ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procariota, causando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana.

La identificación de microorganismos por PCR universal a partir de cultivo se ha convertido en una herramienta importante en laboratorios de referencia, sobre todo para identificar microorganismos con características fenotípicas equívocas y también para clasificar bacterias u hongos poco comunes, por lo que se espera que se incorpore cada vez más a la rutina del laboratorio clínico.

El uso de técnicas para la detección de ácidos nucleicos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha tenido un gran impacto en el diagnóstico microbiológico, ocupando un lugar importante en el laboratorio clínico. La mayoría de las técnicas en uso han sido diseñadas para la detección específica de un microorganismo. Sin embargo, también es posible identificar el agente etiológico aunque se desconozca la especie o el género, utilizando cebadores universales para amplificar el ADN de bacterias y hongos, y luego secuenciar para identificar la especie (PCR universal o de amplio espectro). Esta metodología se aplica en cultivos difíciles de clasificar por técnicas fenotípicas, pero también se ha comenzado a utilizar directamente en muestras clínicas, en las que la detección e identificación del agente infeccioso por técnicas tradicionales resulta difícil o no es posible.

La PCR universal consta de dos etapas: la amplificación del ADN bacteriano o fúngico de la muestra y la posterior secuenciación del fragmento de PCR para la identificación del microorganismo. Las regiones del genoma que se utilizan deben cumplir con características fundamentales: a) estar presentes en todas las especies bacterianas o fúngicas; b) contener secuencias altamente conservadas a las cuales van dirigidos los cebadores; c) incluir secuencias polimórficas para poder diferenciar distintas especies.

Luego de amplificar y secuenciar el fragmento, la secuencia obtenida se compara con aquellas depositadas en bases de datos públicas como Genbank del NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) o RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Organisms, [www.ridom.de](http://www.ridom.de)).

Para el alineamiento de secuencias están disponibles programas como BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) que permiten la comparación de secuencias on line. Aunque aún no hay definiciones claras respecto de los porcentajes de similitud (entre secuencia obtenida y la de referencia) para delimitar la pertenencia a una especie o género, están disponibles hoy guías como las del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), con criterios para la interpretación de los resultados que son de gran ayuda para los laboratorios que realizan estas metodologías.

#### **4.7. Beneficios de las bacterias del Perifitón en los sistemas de cultivo (camarón).**

La presencia del biofilm bacteriano en sistemas de cultivo ayuda a mantener la calidad del agua en buen estándar debido a la absorción de la producción del amonio, del fosfato y del oxígeno (Thompson et al. 2002). Por otra parte aumenta la supervivencia y las tasas de crecimiento de varios organismos cultivados. (Huchette et al. 2000; Azim et al. 2001, 2002, 2003, 2004; Bratvold & Browdy 2001; Mridula et al. 2003; Keshavanath al. 2004).

Balleste et al 2007, demostró que el consumo del biofilm por el camarón rosado *Farfantepenaeus paulensis* significativamente aumenta la supervivencia y tasas de crecimiento.

Thompson et al. 2002. Los microorganismos presentes en el biofilm representan una fuente complementaria de alimento, proporcionando los nutrientes esenciales, ácido grasos poliinsaturados (PUFA), esteroides, aminoácidos, vitaminas y pigmentos que ayuda a un mejor desarrollo de organismos cultivados.

Davey & OToole 2000. La matriz orgánica del biofilm representa una fuente de polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y otros polímeros.

Van Dam et al. 2002. Las medidas de la calidad nutricional del biofilm indican que su contenido proteico puede variar a partir de 12 – 30 % del peso seco, mientras que el contenido de lípido representa 2 – 9 % de la materia seca del biofilm. La calidad nutricional del biofilm varía probablemente según las condiciones iniciales de cultivo y los sistemas de fertilización y la sucesión microbial.

#### **4.8 Cultivo de Camarón en Perú.**

La acuicultura de camarones peneidos en el Perú se inició en la década del 70 en el departamento de Tumbes, único con una porción de territorio con condiciones climáticas apropiadas. Debido a lo atractivo de esta industria, rápidamente adquirió un importante rol en la economía de esta región, y por muchos años en la principal actividad de la acuicultura peruana.

Tradicionalmente el cultivo de camarones en el Perú se estuvo practicando en sistemas semi-intensivos de 1 a 20 Has; sin embargo, en los últimos años muchas empresas han cambiado sus sistemas de producción, con una medida de prevención de enfermedades, incursionando en sistemas intensivos con lo cual han logrado incrementar su producción.

Aún cuando los sistemas intensivos son mucho más productivos que los extensivos o semi-intensivos, éstos requieren de costos de producción más altos y tienen un mayor impacto ambiental negativo, debido al mayor consumo de agua y a la descarga de efluentes. No obstante, estos impactos se pueden disminuir con tecnologías de cultivo de cero descargas.

En el caso del Perú, la actividad camaronera tiene dos etapas importantes: antes y después del virus de la “mancha blanca”. Según Berger et al (2004) el método de cultivo semi-intensivo (tradicional) era el más empleado; esto significaba estanques grandes, con una mayor tasa de recambio de agua, y con un menor rendimiento por hectárea, sin embargo, en los últimos años cada vez son más las camaroneras que han reconvertido sus sistemas de cultivo tradicionales a sistemas más intensivos.

Los cultivos intensivos se caracterizan por el empleo de estanques de menor tamaño y una mayor densidad de cultivo. Su principal ventaja radica en que se puede ejercer un mejor control del cultivo. Actualmente, este tipo de sistema está ganando una mayor participación, debido a que permite ampliar la frontera del cultivo de camarones al sur (través del uso de invernaderos), además, se puede emplear en zonas alejadas de la costa y permiten establecer medidas efectivas de bioseguridad.

La especie cultivada en el Perú es el *Litopenaeus vannamei* o camarón blanco. En este país el cultivo de esta especie se ha intensificado debido, principalmente, al aumento de la demanda mundial, a la disminución de los volúmenes obtenidos por extracción, la rentabilidad de su cultivo y a su gran importancia como generador de divisas, pretendiéndose alcanzar una mayor producción según la demanda y cotización internacionales.

En el 2009, la exportación de crustáceos creció 9.9 % durante el primer trimestre sumando ventas por 18 millones 387 mil dólares, superior a los 16 millones 387 mil dólares registrados en similar periodo del 2008, según la Asociación de Exportadores (Adex). Actualmente, Perú exporta colas de camarones hacia E.E.U.U. y camarones enteros hacia España, sus principales mercados de destino, gracias a la viabilidad técnica y modelo de gestión biológico de alta seguridad que le permite producir más. Antes por 1 has se producía 2 TM al año, ahora por 1 has se produce hasta 40 TM con métodos intensivos, aunque la inversión es costosa, dada la alta tecnología que se usa (desarrollada básicamente por las empresas del sector).

#### **4.9 Principales enfermedades del cultivo de camarón en Perú.**

Uno de los principales problemas del cultivo de camarón en Perú lo constituyen las enfermedades infecciosas, principalmente vibriosis y rickettsiosis, Sin

embargo, este problema se ha vuelto superable, a corto plazo, a través de la utilización exclusiva de larvas sanas provenientes de reproductores certificados y, a mediano plazo, la selección genética de líneas resistentes. A pesar de esto, la industria camaronera enfrenta otros problemas como son, el incremento de los costos de producción y la acumulación de compuestos nitrogenados y fosfatados provenientes de la acumulación de alimento artificial en las piscinas de cultivo.

#### **4.9.1 Enfermedades de tipo Bacteriana NHP – B y Vibriosis.**

La hepatopancreatitis Necrotizantes (NHP-B) es una enfermedad de origen bacteriano causada por una Rickettsia. Las rickettsias son bacterias aerobias que no poseen paredes celulares y que pueden ser controladas o destruidas por antibióticos. La bacteria predominante de este grupo y mas patógena es un cocobacilo Gram-negativo con un diámetro promedio de 0,36 micras, la cual infecta y se multiplica en el citoplasma de las células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas (glándula digestiva en los camarones). Esta bacteria se reproduce por fisión binaria en la célula hospedera, ya que carece de un sistema enzimático que le suministre energía para la reproducción.

La NHP – B causa atrofia, deformaciones y necrosis a los túbulos del hepatopáncreas. Al inicio causa una reducción en el consumo de alimento en los individuos, hasta que estos dejan de comer por completo.

En esta enfermedad se puede identificar tres fases: inicial, aguda y crónica. La fase inicial se caracteriza por escasa melanización, atrofia tubular y un aumento de la necrosis de las células y de los túbulos del hepatopáncreas. En la fase aguda se observa la atrofia severa de los túbulos del hepatopáncreas, formación de granulomas en el tejido del hepatopáncreas, que afectan a los túbulos, además, cantidades de bacterias en las células epiteliales. En la fase crónica se observa el epitelio de los túbulos del hepatopáncreas con gran atrofia con formaciones de nódulos hemolíticos mecanizados.

La NHP – B en su fase inicial no presenta signos de organismo enfermo, por ello, es muy importante observar de manera sistemática los individuos en cultivo. Los signos clínicos de las enfermedades en el camarón son muy similares, en el caso de la NHP – B los más comunes son: bajo consumo de alimento, nado errático, animales moribundos con palidez generalizada del cuerpo, en vista microscópica del tejido hepatopancreático se observan atrofas de los túbulos. La forma más adecuada de diagnosticar esta enfermedad es por histopatología, confirmándola con la técnica molecular PCR.

Las bacterias del género *Vibrio*, se han registrado a menudo como patógenas oportunistas para camarón tanto en la fase de larvicultura como en la engorda. En cada una de estas etapas algunos vibrios se han perfilado como más frecuentes, de esta manera se ha reconocido la presencia de *Vibrio parahaemolyticus*, *V.*

*alginoliticus*, *V. vulnificus* y *Photobacterium daunselae*, (anteriormente clasificada como *V. Damsela*) principalmente en estanques de engorda de camarón así como *V. harveyi* y *V. splendidus* que se han detectado mayormente en el cultivo larvario. Sin embargo, muchas de estas especies también han sido encontradas en la hemolinfa y el hepatopáncreas de juveniles sanos de *L. vannamei* (Gómez-Gil et al., 1998).

La vibriosis puede ser definida como una infección causada por bacterias del género *Vibrio*. Prácticamente todas las especies de *Vibrio* han sido encontradas en camarones con problemas, pero esto no implica que sean las responsables primarias de la infección, sino que debido a su carácter oportunista, proliferan cuando el camarón se encuentra debilitado.

La vibriosis sistemática esta enfermedad se considera una infección generalizada que involucra varios sitios como: cutícula, hepatopáncreas, órgano linfoide, glándula antenal, corazón, hemolinfa y músculo estriado (Brock y Main, 1994). Los camarones presentan señales de severo estrés que comprenden: opacidad de la musculatura abdominal y anorexia (no comen), expansión de los cromatóforos y flexión ocasional del abdomen cerca del tercer segmento abdominal; se les observa nadando erráticamente en la superficie y orillas de los estanques (Ruangpan y Kitao, 1992). La coagulación de la hemolinfa es muy lenta y con apariencia turbia. La cantidad de hemocitos puede reducirse drásticamente. En larvas y postlarvas hay algunos síntomas claros de vibriosis que incluyen: la

melanización y necrosis de la punta de los apéndices y la presencia de numerosas y visibles bacterias en el hemocele de organismos moribundos. Los signos clínicos también incluyen inflamación tanto del hepatopáncreas como del tejido muscular infectado, normalmente contiene un fluido de apariencia lechosa en los lugares donde se da la inflamación (Ruangpan y Kitao 1992).

*Vibrio harveyi* es la bacteria causal de la vibriosis luminiscente y constituye parte de la flora normal de las aguas costeras y lagunares. Este microorganismo puede adherirse a las superficies de los crustáceos marinos o establecerse en el tracto digestivo de dichos organismos al ser ingerido. Esta ruta de entrada, muy probablemente, es el mecanismo por medio del cual este patógeno, presente en cantidad elevada dentro del estanque, puede ingresar al camarón a través del agua o el alimento, iniciando así una colonización. Los episodios de mortalidad han sido precedidos por cambios en las poblaciones bacterianas de *Vibrio* en los estanques con incrementos en la presencia de bacterias luminiscentes (Lavilla-Pitogo et al., 1998).

El hepatopáncreas es, principalmente, el órgano afectado por la mayoría de los patógenos bacterianos del camarón y es también el sitio más dañado por *V. harveyi*. Este patógeno invade masivamente el hepatopáncreas, provocando mortalidades como respuesta a una severa inflamación que abarca a todo el órgano, en donde puede observarse también melanización, fibrosis y necrosis. En los juveniles de mayor edad (mayores de 45 días de cultivo), la infección se

presenta de manera crónica, en donde sólo unos cuantos túbulos del hepatopáncreas se ven afectados, lo que provoca un crecimiento lento. Este cuadro causa severos problemas en el camarón debido a que el hepatopáncreas tiene un papel central en la realización de las funciones digestivas, pues ahí se absorben y almacenan nutrientes, por lo cual, esta disfunción altera severamente el desarrollo del camarón.

#### **4.9.2 Enfermedades de tipo Virales. WSSV, IHHNV y BP.**

La actividad camaronera en el Perú se vió afectada desde agosto 1999 con la presencia del virus de la mancha blanca, que causó mortalidades masivas en los sistemas de producción.

El WSSV, este virus es ahora y ha sido por algún tiempo la más seria amenaza que ha enfrentado la industria del cultivo de camarón en Latinoamérica (desde 1999) y en Asia (desde 1992). Es un virus de doble cadena de ADN, presenta forma elíptica a cilíndrica, membrana trilaminar. El genoma tiene tamaño aproximado de 290 Kbp, lo cual lo hace uno de los virus más complejos que infectan al camarón.

Durante la fase aguda de la enfermedad los camarones tienden a mostrar una reducción en el consumo de alimento, se vuelven letárgicos, la cutícula se

desprende fácilmente y presenta manchas blancas (de ahí el nombre dado a la enfermedad) de aproximadamente 0.5 a 20 mm de diámetro, las cuales son más notables en la parte interna del caparazón.

Cuando el síndrome del virus de la mancha blanca se presenta en forma crónica ocurre mortalidad pero no es completa, aparecen pequeñas cantidades de camarones muertos con manchas blancas en cada muda y pareciera que la infección no se ha dispersado en el estanque; si ocurrieran fuerte factores de estrés, las mortalidades se incrementan rápidamente.

La transmisión del WSSV se produce tanto por cohabitación con crustáceos infectados, y de forma experimental, altas diluciones ( $10^{-7}$ /ml) del virus en el agua son infectantes. Igualmente se puede transmitir el virus por ingestión, bien en fenómenos de canibalismo, predación, o por inclusión en la dieta de crustáceos infectados.

También se ha comprobado la vía vertical, donde el virus se transmite por células de las oogonias, y a través de células conectivas presentes en el espermatóforo, infectando los huevos antes de la eclosión. Esta vía de transmisión tiene una fuerte repercusión económica, al morir las larvas antes de la eclosión y por tanto reducirse la productividad, pero no tanta trascendencia en la transmisión de la enfermedad (Lo y Kou, 1998).

El virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) presenta una simetría icosaédrica, carece de envoltura, mide aproximadamente 22 nm, contiene ADN unicitenario linear de un tamaño estimado en 4.1 kb, y posee una cápside con cuatro polipéptidos . El virus ha sido clasificado como miembro de la familia Parvoviridae.

Los modos de transmisión del Virus: Son las importaciones de camarones vivos en todas sus fases de desarrollo para uso en acuicultura, las importaciones de insumos para acuicultura tales como artemia, poliquetos, etc.

IHHNV se caracteriza por provocar infecciones persistentes y latentes en poblaciones de *P. stylirostris*, *L. vannamei* y *P. monodon*; estos portadores asintomáticos pueden transmitir verticalmente la infección a su progenie y horizontalmente a otras poblaciones.

En *L. vannamei* IHHNV causa una enfermedad crónica conocida como ‘síndrome de la deformidad y del enanismo’ (RDS), caracterizada por una baja producción, aumento en la variabilidad del tamaño de los camarones, índices reducidos de crecimiento y deformaciones cuticulares.

La aparición del síndrome RDS es el síntoma más típico de la infección por IHHNV. Los camarones pueden presentar desviación o deformidades del rostrum, antenas arrugadas, aspereza del caparazón y otras deformidades cuticulares. Los juveniles presentan una variación de tamaños muy grande, con una proporción de camarones pequeños “enanos” mayor a lo esperado normalmente.

La transmisión ocurre rápidamente por canibalismo de los camarones débiles o moribundos. IHHNV puede ser transmitido de un camarón a otro a través del agua, pero esta forma de transmisión es menos eficiente que la que ocurre por canibalismo. Aunque se sabe que la transmisión vertical ocurre y que es importante para la dispersión del virus, todavía no se ha determinado el mecanismo exacto.

El BP (*Baculovirus penaei*) están incluidos solo o en grupos en estos cuerpos de inclusión polihedrales (CIPs). Los viriones tienen forma de bastón y contienen ADN de doble banda. Los cuerpos de inclusión polihedrales se hallan en el núcleo de las células epiteliales del acinus de la hepatopáncreas (región más externa de esta glándula) y con menos frecuencia en el núcleo de las células del intestino medio en los camarones infectados. En infecciones de leves a moderadas los CIPs ocurren en focos, pero en fuertes infecciones estos se distribuyen homogéneamente. Estos CIPs son tetrahédricos o piramidales en forma tridimensional, ubicándose en la clase polihédrica con simetría

El diagnóstico de este baculovirus puede hacerse basada en la demostración de la presencia de los CIPs en el núcleo de las células epiteliales en preparados frescos, tomados a partir del hepatopáncreas e intestino medio de los camarones y examinados al microscopio de luz.

Presencia de camarones amarillo café, intestino semivacío, cromatóforos del intestino expandidos de color anaranjado, pérdida parcial o total de lípidos en el hepatopáncreas, coloración amarillenta pálida de los túbulos, no se observan daños o deformaciones en la estructura de los túbulos, no se observa infiltración de hemocitos ni de flora bacteriana, con o sin presencia de cuerpos de oclusión. Normalmente se presenta antes de los eventos de mancha blanca, aunque no se observa mortalidades durante su episodio, a mayor incidencia de BP mayor afectación por WSSV.

#### **4.10 Estudios realizados sobre enfermedades de camarones en Perú.**

El Instituto del Mar del Perú (IMARPE) sede Regional de Tumbes, evaluó la distribución y prevalencia del WSSV en diferentes especies de crustáceos de la zona de esteros (2001 al 2006) y en estanques de cultivo intensivo y semiintensivo de *Litopenaeus vannamei* (2006) de la región de Tumbes. Para los años 2001 al 2004 se colectaron 3633 muestras, las que estuvieron constituidas por postlarvas, juveniles y preadultos de peneidos (*Litopenaeus vannamei*, *P. stylirostris*, *P.*

*occidentalis* y *P. californiensis*) otros crustáceos (*Metamysidopsis sp.*, *Macrobrachium sp.*, *Palaemon sp.*, *Callinectes sp.*, *Uca sp.*, *Panopeus sp.*, *Grapsus grapsus*, *Callapa sp.*, *Ocypode sp.*, *Ucides occidentales* y *Oediplax granulatus*) Adicionalmente en los años 2003 y 2004 se colectaron 126 muestras de postlarvas de peneidos de las playas de litoral de Tumbes. Las muestras fueron analizadas por Nested-PCR, del total de muestras de esteros analizadas, el 4.8% fueron positivas al Virus de la Mancha Blanca, siendo las postlarvas, juveniles y preadultos de peneidos los organismos más afectados, seguidos de *Callinectes sp.*, de las muestras de playa, el 7.8% fueron positivas al virus. Durante los años de muestreo la temperatura promedio del agua fue de 26.9 °C, la salinidad tuvo valores mínimos de 8.0 y máximos de 45.8 UPS.

Durante el 2005 se colectaron 1270 muestras, que fueron analizadas por las mismas técnicas moleculares que en años anteriores, obteniéndose una ocurrencia de WSSV del 3.3 %, siendo igualmente positivos a la infección las postlarvas, juveniles y adultos de peneidos, así como *Palaemon sp.*, *Uca sp.*, *Callinectes sp.*, *Panopeus sp.*, y *Grapsus sp.*

Para el año 2006 se colecto 1611 muestras de crustáceos, obteniéndose una prevalencia al WSSV de 1.7 %, siendo las postlarvas, juveniles y preadultos de peneidos los organismos con mas ocurrencia, seguido de *Callinectes sp.*, *Panopeus sp.*, *Palaemon sp.* y *Uca sp.*, Estos organismos por ser cohabitantes del mismo ecosistema, el que a su vez se encuentra estrechamente ligados a los

estanques de cultivo de *L. vannamei* , se constituyen como el principal foco de infección para estos.

Asimismo, se colectaron 3590 muestras de *L. vannamei* de cultivo intensivo y 3890 de cultivos semiintensivo. Las muestras de camarones de los primeros (temperatura promedio del agua 32.1 +/- 0.5 °C) fueron negativas al virus, y en los cultivos semiintensivos (temperatura promedio del agua 28.3 +/- 1.5 °C) se obtuvo una prevalencia de 1,7 %.

Como conclusión de este estudio realizado por el IMARPE durante los años 2001 al 2006 se encontró en todos los casos la relación directa entre las menores temperaturas del medio acuático (inferior a 29 °C) y el aumento de ocurrencia del WSSV en los organismos en estudio, tanto de ambientes naturales como de cultivos semiintensivo. Asimismo, se encontró que el virus está distribuido tanto en ambientes naturales como en estanques de cultivo de todo el litoral tumbesino.

## CAPÍTULO III.

### 5. Materiales y Métodos.

#### 5.1 Área de Estudio.

La investigación se realizó en las instalaciones de la camaronera Marinazul, ubicada en el Departamento de Tumbes, en la zona de Zarumilla (Aguas Verdes), la misma que se encuentra ubicada en las coordenadas  $3^{\circ}28'20''$  S y  $80^{\circ}15'58''$  O (Fig # 1), la cual cuenta con un área de producción de 252.34 Ha. Dentro del área de la camaronera se encuentra el laboratorio de perifitón que cuentan con un área experimental (10 raceways de 20 toneladas) y el área de laboratorio equipado para desempeñar dicho proyecto. Además la empresa cuenta con un Laboratorio de Biología Molecular donde se realizó los respectivos análisis de PCR.



Fig # 1 Fotografía Satelital de la Camaronera Marinazul S. A. (Google Earth)

## 5.2 Aislamiento y Purificación de bacterias a partir de geotextiles para la obtención del banco de cepas bacterianas.

### 5.2.1 Colocación del Substrato.

Se colocó un substrato artificial (geotextil) de 20 cm de ancho x 100 cm de largo, en la parte superficial lleva un flotador y en la parte inferior un peso para que se mantenga estable en la columna de agua (Fig # 2), las mismas que fueron colocadas en las piscinas 21(Extensiva)(Fig # 3) y en la piscina 13D1 (Reproductores) (Fig # 4) para poder observar el proceso de colonización del perifitón espontaneo en el geotextil.



Fig # 2 Geotextil 20 x 100 cm, utilizado como substrato para el perifitón.



Fig # 3 Vista superficial de la piscina 21



Fig # 4 Vista superficial de la piscina 13D1

## 5.2.2 Preparación de medios de cultivo.

**5.2.2.1 Tryptic Soy Broth. (TSB).** Medio líquido nutritivo que favorece el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, en especial las bacterias anaerobias facultativas y aerobias comunes. Es un medio de digeridos enzimáticos de caseína y harina de soja. Se utilizó este medio en la preparación de inóculos y suspensión de las cepas bacterianas. (Fig # 5).

Disolver 30 g del medio en 1 L de agua purificada. Mezclar bien, caliente suavemente para disolver completamente el medio, autoclave a 121 °C, durante 15 minutos. Adicionar 2.5 % de NaCl.



Fig # 5 Medio Tryptic Soy Broth

**5.2.2.2 Trypticase soy agar (TSA).** Es un medio de uso general que vertido en placas de petri o tubos favorece el crecimiento de microorganismos tanto no exigentes como moderadamente exigentes. Es un agar de soja triptica, Este medio

se utilizo para el aislamiento de microorganismos, recuento en placas y mantenimiento de cultivos. ( Fig # 6)

Disolver 40 g del medio en 1 L de agua purificada, mezcle bien, caliente agitando frecuentemente durante 1 minuto para disolver completamente el producto, autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Adicionar 2.0 % de NaCl.



Fig # 6 Medio Trypticase soy agar

**5.2.2.3 Agar Marino Zobel 2216.** Es un medio para el cultivo, aislamiento y mantenimiento de gran variedad de bacterias marinas heterotróficas. (Fig # 7)

Disolver 55.85 g del medio en 1 L de agua purificada, mezcle bien, caliente agitando frecuentemente durante 1 minuto para disolver completamente el producto, autoclave a 121 °C durante 15 minutos.



Fig # 7 Medio Agar Marino Zombel 2216.

### 5.2.3 Recolección de muestras de geotextiles.

Se procedió a la recolección de muestras a partir de la media hora de colocar el geotextil en las piscinas, posteriormente se colectaron muestras a las 2, 4, 6, 12, y 24 Horas, luego se recolectaron muestras diariamente.

Para la recolección de muestra se procedió hacer un corte de una sección del geotextil (Fig # 8), y con la ayuda de una pinza estéril se colocó en tubos eppendorf de 1.5 ml con agua de la piscina, para procesar la muestra en el laboratorio ( Fig # 9). Además se anotó los datos de recolección en una hoja de registro. (Tabla # 1).

| <b># de Cepa</b> | <b>Piscina</b> | <b>Tiempo de Colonización</b> | <b>Hora de Recolección</b> |
|------------------|----------------|-------------------------------|----------------------------|
| 6 G              | 21 E           | 30 minutos                    | 8:00 AM                    |
| 15 G             | 13 D 1         | 30 minutos                    | 8:00 AM                    |
| 17 G             | 21 E           | 1 Día                         | 8:00 AM                    |
| 32 G             | 13 D 1         | 3 Día                         | 8:00 AM                    |
| 76 G             | 13 D 1         | 4 Día                         | 8:00 AM                    |

Tabla # 1 Hoja de registro de datos de Recolección de Substratos.



Fig # 8 Corte de una sección del geotextil



Fig # 9 Muestras de geotextiles recolectadas.

#### 5.2.4 Aislamiento de Bacterias.

Las muestras de geotextil fueron lavadas con solución salina al 3 %, para eliminar la materia orgánica y sólidos en suspensión no adheridos. Luego con la ayuda de una pinza estéril se sacó fibras del geotextil en un tubo eppendorf con TSB, se dejó incubar 5 minutos con el TSB y luego se homogenizó la muestra se recupera 20  $\mu\text{L}$  del caldo de bacterias y se realizaron diluciones sucesivas en 180  $\mu\text{L}$  hasta la  $10^6$ . Se recuperó 10  $\mu\text{L}$  de caldo para sembrar por la técnica de estrías en medios sólidos Agar Marino, TSA (Fig # 10). Luego se aisló la colonia bacteriana utilizando el asa de platino o puntas de siembras estériles (Fig # 11) para ser incubados en medio líquido (TSB) y se dejó incubar por 24 horas a temperaturas de 28°C a 30 °C. Además se ingresó en una hoja de registro de datos las características morfológicas de las colonias (forma, tamaño y color), para lo cual se diseñó la siguiente planilla. (Tabla # 2).

| # de Cepa | Tamaño      | Forma       | Color      |
|-----------|-------------|-------------|------------|
| 6 G       | Mediana (M) | Redonda (R) | Blanca (B) |
| 15 G      | Grande (G)  | Redonda (R) | Blanca (B) |
| 17 G      | Pequeña (P) | Redonda (R) | Blanca (B) |
| 32 G      | Mediana (M) | Redonda (R) | Crema (Cr) |
| 76 G      | Grande (G)  | Redonda (R) | Crema (Cr) |

Tabla # 2. Descripción morfológica de las colonias aisladas.



Fig # 10 Siembra por Estrías

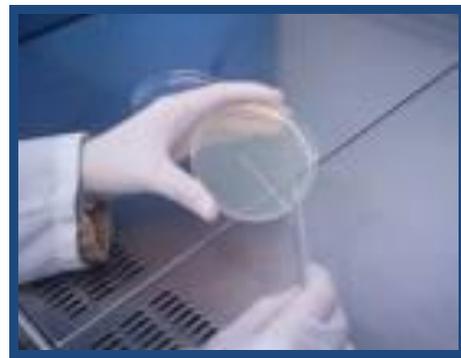


Fig # 11 Aislamiento por Puntas estériles

### 5.2.5 Purificación de Cepas.

Después del aislamiento de colonias bacterianas se procedió a su purificación, mediante diluciones del cultivo inicial, posteriormente sembradas en placas con medio sólido, para obtener una única colonia de bacteria, que corresponderá a la colonia con la misma referencia (forma, tamaño y color) de la colonia inicialmente aislada de esta manera se asegura que se trata de la misma colonia (Fig # 12). Estas cepas bacterianas purificadas se mantuvieron en un medio de cultivo líquido y en agar inclinado (TSA) (Fig # 13).

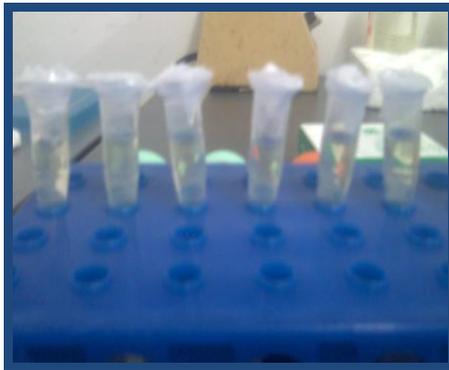


(a)

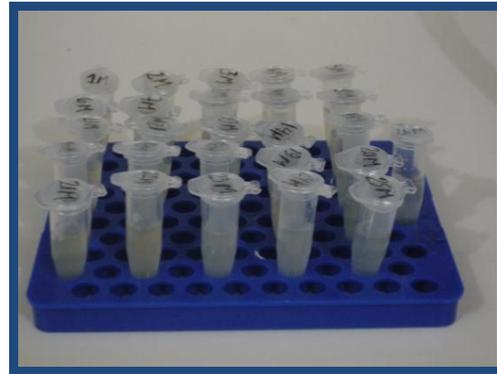


(b)

Fig # 12 Purificación de Bacterias: (a) Cultivo inicial antes de la purificación y (b) bacteria purificada mediante diluciones seriadas.



(a)



(b)

Fig # 13 Cepas bacterianas puras: (a) En medio líquido y (b) en Agar Inclinado.

Se confirmó la presencia de la única cepa bacteriana en estudio mediante la técnica de tinción de Gram (Fig # 14) que es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología para la caracterización de bacterias. Considerándose Bacteria Gram positiva a las bacterias que se visualizan de color violeta y Bacteria Gram negativa a las que se visualizan de color rosa

**5.2.5.1 Protocolo de Tinción de Gram utilizado para la identificación de bacterias (Wikipedia enciclopedia libre).**

1. Recoger muestras con el asa de platino
2. Hacer el extendido en espiral en el portaobjeto
3. Dejar secar a temperatura ambiente
4. Fijar la muestra al calor (flameado 3 veces aprox.)
5. Agregar azul violeta (cristal violeta o violeta de genciana) y esperar 1 minuto. Todas las células gram positivas y gram negativas se tiñen de color azul-purpura.
6. Enjuagar con agua.
7. Agregar lugol y esperar 1 minuto
8. Enjuagar con agua.
9. Agregar alcohol acetona y esperar 15 – 20 segundos
10. Enjuagar con agua.
11. Agregar safranina y esperar 1- 2 minutos. Este tinte dejará de color rosado las bacterias Gram negativas.
12. Enjuagar con agua.
13. Para observar al microscopio óptico es conveniente hacerlo a 100x con aceite de inmersión

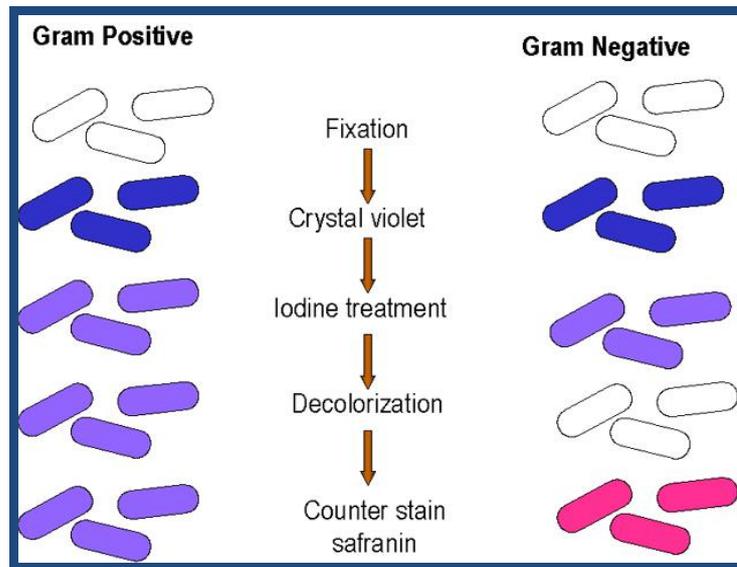


Fig # 14. Procedimiento Tinción de Gram. (Enciclopedia Wikipedia).

### 5.3 Identificación de Bacterias por Técnicas Moleculares.

La identificación de las cepas bacterianas se realizó a nivel genético: mediante extracción del ADN genómico, siguiendo un protocolo especial para bacterias (Empresa Concepto Azul S.A. Ecuador).

#### 5.3.1 Protocolo de extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) de bacterias.

1. Colocar 1.2 mL de caldo de cultivo en un tubo eppendor de 1.5 ml y microcentrifugar a 10000 rpm por 2 min.

2. Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 500  $\mu\text{L}$  de PBS1X.
3. Microcentrifugar a 10000 rpm por 2 min. Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 200  $\mu\text{L}$  TE.
4. Llevar a ebullición por 10 minutos e inmediatamente centrifugar 30seg
5. Colocar sobre hielo por 5 minutos y transferir 10  $\mu\text{L}$  del sobrenadante a un nuevo micro tubo de 1.5 mL.
6. Adicionar 90  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura, y conservar en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  Tomar 2  $\mu\text{L}$  para la PCR

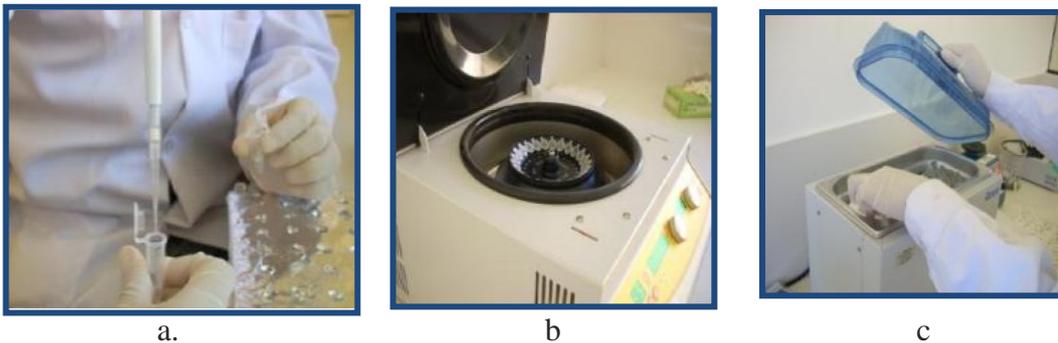


Fig # 15 Procedimientos en la extracción de ADN de cepas bacterianas: (a) adición de la solución de extracción en los microtubos, (b) Centrifugación y (c) Ebullición.

### **5.3.2 PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) de las muestras de Bacterias.**

La PCR es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN

particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde. Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad es que, tras la amplificación, resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad virus o bacterias causantes de una enfermedad o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado.

Para realizar la caracterización molecular de las cepas bacterianas aisladas del perfitón mediante la técnica de la PCR (Fig # 16) se probaron dos juegos de primers universales para bacterias.( Tabla # 3).

| <b>Cebador</b> | <b>Sentido</b> | <b>Secuencia</b>           | <b>Referencia</b> |
|----------------|----------------|----------------------------|-------------------|
| RL 71 A        | Forward        | 5-CCTACGGGAGGCAGCAG-3      | Dang H.<br>2000   |
| RL 72 A        | Reverse        | 5-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3   |                   |
| 16SrRNAFC27    | Forward        | 5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3   | Gontang<br>2007   |
| 16SrRNARC1492  | Reverse        | 5-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3 |                   |

Tabla # 3 Descripción de los juego de primers universales para bacterias utilizadas.

Los cuales reconocen secuencias universales del gen 16S rRNA (se utiliza en estudios filogenéticos de identificación bacteriana ya que es altamente conservada) o secuencias de genes asociados con actividades metabólicas como la oxidación de amonio o oxidación de nitritos.

### Preparación del mix de PCR.

| <b>Reactivo</b> | <b>Concentración final</b> | <b><math>\mu</math>L/ Reacción</b> |
|-----------------|----------------------------|------------------------------------|
| Agua Ultrapura  |                            | 34.80                              |
| Buffer 5X       |                            | 10.00                              |
| DNTPs           | 200 $\mu$ M.               | 1.00                               |
| Primer Forward  | 400 nM                     | 1.00                               |
| Primer Reverse  | 400 nM                     | 1.00                               |
| Taq DNA pol     | 1 Unidad                   | 0.20                               |
| ADN             |                            | 2.00                               |
| Total           |                            | 50.00                              |

Tabla # 4. Reactivos para el mix de PCR.

### Programación del termociclador.

Para los dos juegos de primers en estudio se utilizó el mismo programa de amplificación:

| <b>Ciclo</b> | <b>Procedimiento</b> | <b>Temperatura</b> | <b>Tiempo</b> |
|--------------|----------------------|--------------------|---------------|
| 1            | Desnaturalización    | 94 °C              | 4 minutos     |
| 34           | Desnaturalización    | 94 °C              | 45 segundos   |
|              | Hibridación          | 58 °C              | 1 minuto      |
|              | Polimerización       | 72 °C              | 2 minutos     |
|              | Polimerización Final | 72 °C              | 10 minutos    |
|              | Conservación         | 4 °C               | Indefinido    |

Tabla # 5 Programación del termociclador para la PCR

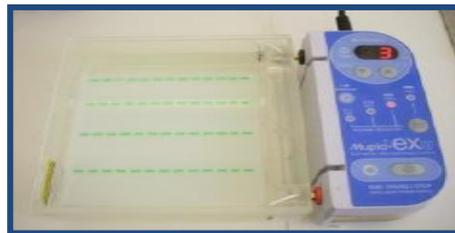
Para observar los resultados el producto amplificado se sometió a electroforesis en gel de agarosa de 1.5% (1,8g de agarosa, 120mL de TAE 1x, 5ul de bromuro de etidio BET)



a.)

b).

c).



d.)

Fig # 16. Proceso de desarrollo de la técnica PCR: a.) Preparación del mix de PCR b) mix de PCR depositando en los microtubos, c) amplificación del ADN en el termociclador d) sistema de electroforesis en gel de agarosa

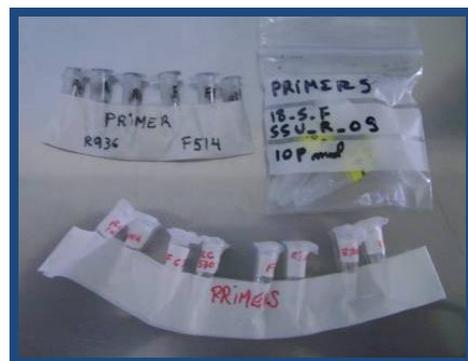
#### **5.4. Secuenciación y análisis del producto de amplificación.**

Para conocer la secuencia amplificada se envió al laboratorio MACROGEN de Estados Unidos, una cantidad de 20 ul del producto amplificado y 3 ul de los primers o cebadores utilizados. (fig # 17).

Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias de 16S rADN que se encuentran en el Gen Bank mediante el software BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Una vez obtenido el resultado de identificación se consideraron todos los organismos que presentaron igual porcentaje de similitud con la secuencia problema. El ADN DataBank of Japan (DDBJ), The European Molecular Biology laboratory (EMBL) y el NCBI (National Center for Biotechnology Information, EUA) forman el International Nucleotide Sequence Database Collaboration. Esta base de datos actualmente dispone de una colección de aproximadamente de 28.507.990.166 bases y 22.318.833 secuencias registradas. Estas tres organizaciones intercambian datos diariamente siendo el objeto común dar a conocer abiertamente la información obtenida individualmente y formar un Gen Bank a nivel mundial cada día más amplio.



a.)



b.)

Fig # 17 Muestras previas a la secuenciación a.) Amplicones de las cepas bacterianas y b.) Primers

## **5.5 Conservación de cepas bacterianas.**

Las cepas valiosas se tienen que conservar durante largos periodos de tiempos libres de cambios fenotípicos adversos. Los cultivos se siembran en medios estériles y en condiciones de asepsia y se mantienen activos aplicando alguno de los siguientes métodos.

### **5.5.1 Refrigeración.**

Reduciendo o controlando su actividad metabólica a través de la refrigeración. Este método solo es aplicable durante periodos cortos de almacenaje (En medios líquidos o tubos inclinados de Agar). El objetivo es incrementar la vida útil de los cultivos y en consecuencia incrementar sus posibilidades de conservación (Casp y Abril 1999). Los tubos de cultivos almacenados en contenedores que no permiten la pérdida de humedad pero si el intercambio de gases, a una temperatura de 5 – 8 °C necesitan transferencias cada 6- 8 meses.

Las cepas se mantuvieron en tubos de agar inclinado y tubos con medios líquidos y en placas de agar a temperaturas de 4 °C. ( Fig # 18).



a.)



b.)

Fig # 18. Cepas en Refrigeracion a.) Medio Líquido y b.) En placas de agar

### 5.5.2. Congelación

Es un método efectivo para mantener la viabilidad de las bacterias. Cuanto menor sea la temperatura de almacenamiento, mayor será la supervivencia de las bacterias. El principal problema del mantenimiento de microorganismos a temperaturas por debajo del punto de congelación es la muerte durante los procesos de congelación y descongelación.

Se agregó glicerol (15% concentración final) como crioprotector en 200  $\mu$ L de bacterias en fase exponencial. Se mezcló suavemente el medio antes de congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$ . ( Fig # 19)



Fig # 19. Cepas bacterianas en Congelación

### 5.5.3. Nitrógeno Líquido.

La actividad metabólica de los microorganismos puede ser reducida considerablemente almacenándolos a temperaturas muy bajas ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) lo cual se puede lograr utilizando la refrigeración con nitrógeno líquido. Según Stanbury et al. (1995) este es el método más adecuado para la mayoría de células. La técnica consiste en obtener el crecimiento del cultivo hasta lograr la máxima densidad celular en fase estacionaria, resuspender las células en un agente crioprotector (como glicerol al 10 % estéril o dimetil sulfoxido DMSO al 10 %).

Su utilización como crioprotector DMSO al 10 % en 250  $\mu\text{L}$  de cultivo bacteriano en fase exponencial. ( Fig # 20).



Fig # 20 Cepas de bacterias en nitrógeno líquido.

### 5.6 Cultivo de cepas de bacterias para la colonización de geotextiles.

El proceso se inició desde 1 mL de cultivo bacteriano obtenido desde el tubo de cepa madre, luego es replicado a 50 mL con Medio TSB, luego es replicado a 500

mL (200 ml del medio de cultivo TSB, 250 ml agua de mar esterilizada, 500 *ul* de melaza esterilizada), posteriormente es replicado a 5 L (500 ml medio TSB, 4L de Agua de mar esterilizada, 5 mL de melaza esterilizada) luego se replica a 50 L (45 L de Agua de mar tratada, 100 mL de melaza esterilizada). Todos los repliques incubados por 18 a 24 H a temperaturas de 28 °C. (Fig # 21).

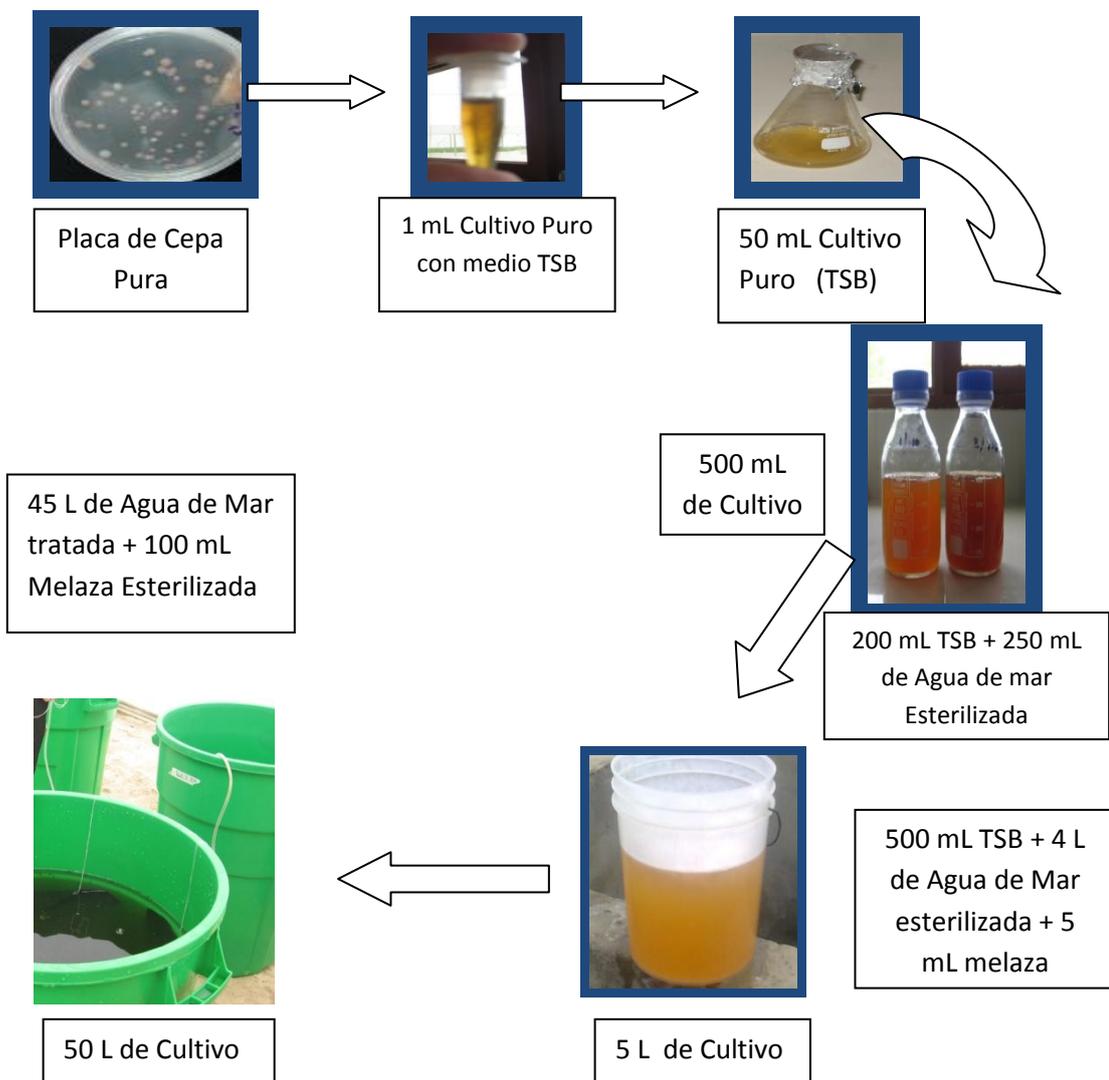


Fig. # 21 Esquema del Proceso de Cultivo de las Cepas Bacterianas.

El conteo de la unidad formadora de colonias (UFC). Es el número mínimo de células separables sobre la superficie, o dentro, de un medio de agar sólido que da lugar al desarrollo de una colonia visible del orden de decenas de millones de células descendientes. Las UFC pueden ser pares, cadena o racimos, así como células individuales. Se miden en UFC/ mL.

Se utilizó el método de Recuento de células viables, donde se mide solo las células vivas de una población, es decir aquellas capaces de reproducirse. Para calcular los UFC por mL, se divide el número de colonias por el factor de la dilución multiplicado por la cantidad de inóculo agregado al agar.

$$\text{UFC/mL} = \text{N}^\circ \text{ de colonias (UFCs)} / (\text{dilución} \times \text{inóculo})$$

Se realizó en placas de Agar TSA por triplicado, para cada una de las cepas bacterianas, mediante diluciones seriadas hasta  $10^7$ .

### **5.7 Colonización de bacterias en el geotextil.**

Se realizó en un volumen de 50 L con un cultivo bacteriano a una concentración de  $1 \times 10^9$  adicionando 100 mL de melaza autoclavada y se colocó un geotextil de 20 cm x 10 cm a cada recipiente. Luego se procedió a sacar muestra del geotextil a las 6, 12 y 24 horas de colonización. La colonización bacteriana se realizó por separado cada bacteria. Como podemos observar en la figura # 22.



Fig # 22 . Colonización de bacterias por cepas separadas en tinas de 50 Litros

### **5.8 Evaluación de los geotextiles inoculados con bacterias, en los niveles de producción de cultivo del *Litopenaeus vannamei*.**

Para este bioensayo se utilizaron 5 cepa de bacterias (6 G, 15 G, 17G, 32G, 76G) las cuales mediante una PCR se determinó que hubo amplificación para bacteria lactonasa utilizando los primers BacLact 1Fy BacLact 1R, considerándolos como posibles probióticos. Las vibriosis son enfermedades bacterianas resultantes de la producción masiva y coordinada de toxinas por vibrios. Los vibrios posean un sistema elaborado de comunicación conocido como Quórum sensing, el cual está basado en la producción extracelular de lactonas. Cuando los niveles de lactonas sobrepasan ciertas concentraciones, genes de producción de toxinas en los vibrios se activan. Bacterias antagonistas a los vibrios han desarrollado un sistema de inhibición del Quórum sensing llamado el Quórum Quenching. Esas cepas producen enzimas tipo lactonasa que degradan las lactonas y así cortan la comunicación entre los vibrios.

Estas mismas fueron colonizadas en substrato artificiales (20 x 50 cm) incubados por 24 horas y luego fueron ofrecidos durante 30 días a postlarvas de *Litopenaeus vannamei* (PL 10), el bioensayo se realizó en un volumen de 1000 L cada tratamiento por duplicado, mas los controles.

### 5.8.1. Maduración de Geotextiles.

La maduración de geotextiles se realizo en un volumen de 100 L de bacterias con una concentración de  $10^9$  en donde se colocaron 2 pedazos de geotextiles de  $100\text{ cm}^2$  (Fig # 23), realizando esta maduración para cada cepa bacteriana, luego de 24 horas de incubación se colocaron en los tanques de cultivo.(Fig # 24).



Fig # 23 Maduración de los substratos en las diferentes cepas de bacterias

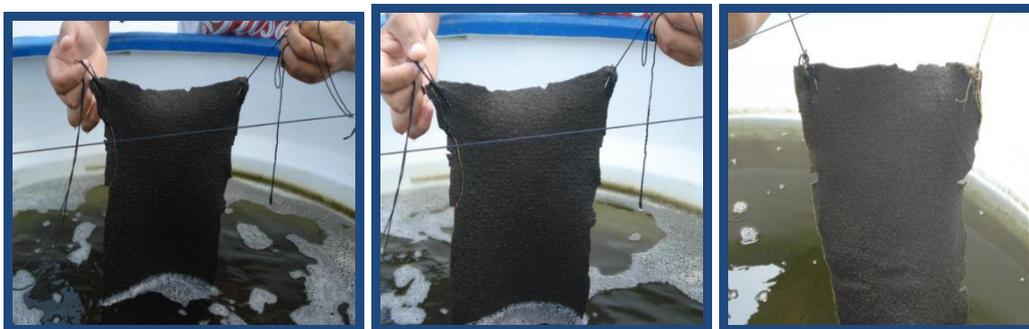


Fig. # 24 Colocación del substrato colonizado con bacterias en los tanques de cultivos.

### 5.8.2 Densidad de siembra.

Se sembró a una densidad de 250 PL/m<sup>2</sup> como en un sistema intensivo. El área del tanque fue de 0,64 m<sup>2</sup> donde se colocó 160 postlarva PL10. (Fig # 25).



Fig # 25. Siembra de 160 pl/m<sup>2</sup> en los tanques donde se realizó el bioensayo.

### 5.8.3 Sistema de Cultivo.

Para el manejo del sistema de cultivo en lo que se refiere a fertilización y alimentación se siguió el mismo protocolo de cultivo intensivo que utiliza la camaronera Marinazul S.A. El protocolo de fertilización es el siguiente Nutrisil 100 kg /Ha, Nutrilake 150 Kg/Ha Bicarbonato de Sodio 100 Kg /Ha esta cantidad es en el primer día, el segundo se adiciona el 75 %, el tercer día el 50 % y el cuarto día el 25%, luego se fertilizó con el 10 % y para favorecer el crecimiento de las bacterias se adicionó azúcar 25 Kg/ Ha, esta fue adicionada todos los días de cultivo. (Tabla # 6).

| <b>Días de cultivo</b> | <b>Nutrisil g/m3</b> | <b>Nutrilake g/m3</b> | <b>Bicarbonato de sodio g/m3</b> | <b>Azúcar g/m3</b> |
|------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------------------|--------------------|
| 1                      | 10                   | 15                    | 10                               | 2.5                |
| 2                      | 7.5                  | 11.25                 | 7.5                              | 2.5                |
| 3                      | 5                    | 7.5                   | 5                                | 2.5                |
| 4                      | 2.5                  | 3.75                  | 2.5                              | 2.5                |
| 5 al 30                | 1                    | 1.5                   | 1                                | 2.5                |

Tabla # 6 Cantidad de fertilizante utilizado en el bioensayo durante 30 días

#### 5.8.4. Parámetros físico- químico.

En lo que se refiere a parámetros de cultivo se siguió el mismo protocolo de Marinazul S.A. donde diariamente se toman dos veces una en la mañana y una en la tarde. Los parámetros como la Temperatura, pH y Oxígeno fueron registrados diariamente, mientras que la Salinidad se registró una vez a la semana. (Tabla # 7) (Fig # 26).

| <b>Parámetro</b> | <b>Niveles Óptimos</b> |
|------------------|------------------------|
| Temperatura      | 27 - 30 ° C            |
| Oxígeno disuelto | > 4.0 mg /L            |
| pH               | 7.5 a 8.5              |

Tabla # 7 Parámetros óptimos en el cultivo en la camaronera Marinazul.



Fig # 26. Registro de parámetros de los tanques de cultivo

### 5.8.5. Alimentación.

La aplicación del alimento balanceado se realizó siguiendo el sistema de cultivo intensivo 2.5 Kg de alimento por cada 1000000 Pl. Por tanto en 160 Pl se empleó 0.4 g de alimento balanceado aplicado en dos dosis, cada día se aumentaba el 25 %. La empresa que suministra el alimento balanceado proporciona a la camaronera con los siguientes alimentos: Pre – Cría 1 que se le da desde Pl 10 a 1g y el KR -1 que se le da a partir de 1 g a 3 g. (tabla # 8).

| <b>Producto</b> | <b>% Humedad</b> | <b>% Proteína</b> | <b>% Grasa</b> | <b>% Ceniza</b> | <b>% Fibra</b> |
|-----------------|------------------|-------------------|----------------|-----------------|----------------|
| Pre- Cria 1     | Max 12 %         | Min 40 %          | Min 5 %        | Max 15 %        | Max 3 %        |
| KR- 1           | Max 12 %         | Min 40 %          | Min 5 %        | Max 15 %        | Max 3 %        |

Tabla # 8 Análisis químico proximal del alimento balanceado

## **5.9 Análisis de Resultado y Aplicación de formulas.**

Se determinó el porcentaje de supervivencia y la biomasa final de cada uno de los tratamientos utilizados en el bioensayo mediante la cosecha después de los 30 días de cultivo.

Para calcular el porcentaje de supervivencia se aplica la siguiente fórmula:

$$S = Nf / No * 100$$

Donde:

Nf = Población final

No = Población inicial

Conociendo la población inicial que fue la misma para todos los tratamientos incluyendo los controles, de 160 pl/m<sup>2</sup>, y conociendo la población final valor que se obtuvo al final de la cosecha dió el porcentaje de supervivencia para cada tratamiento.

Para obtener el valor de la biomasa final se utilizó la siguiente fórmula:  
(Saldarriaga 1995):

$$B = Wx * S * No / 100$$

Donde:

B = biomasa final (kg).

Wx = peso promedio final (kg).

S = supervivencia (%).

No = población inicial.

Se necesita los datos de peso promedio final de cada tratamiento y el dato de supervivencia tomando en cuenta la población inicial que es de 160 pl/m<sup>2</sup> se obtendrá el valor de la biomasa final de cada tratamiento, que se expresa en Kg.

## **CAPÍTULO IV.**

### **6. RESULTADOS.**

#### **6.1 Aislamiento de bacterias a partir de substrato artificiales (Geotextil).**

Durante los dos años que duró el proyecto perifitón en las instalaciones de la camaronera Marinazul S.A (Tumbes – Perú) se llegó a aislar e identificar un total de 200 cepas bacterianas de las cuales solo cinco (5) cepas resultaron ser bacterias lactonasas positivas, identificadas a nivel molecular por PCR. Estas cepas fueron enumeradas de acuerdo al día de muestreo y codificadas con la letra G debido a que fueron aisladas de Geotextiles.

#### **6.2 Pruebas de colonización de bacterias en el geotextil y su cultivo en agares especiales.**

Las cinco cepas en estudio fueron puestas a prueba para conocer el poder de colonización sobre el geotextil y evaluar su crecimiento en medios de cultivo especiales durante 24 horas a una temperatura de 28 – 30 °C (Tabla # 9 ) y (figura # 27 - 31).

| <b>Código de cepa</b> | <b>Morfología bacteriana</b>    | <b>Lugar de aislamiento</b>   | <b>Tiempo de colonización en el geotextil</b> | <b>Medio de cultivo</b> |
|-----------------------|---------------------------------|-------------------------------|---|-------------------------|
| 6G                    | Colonia Mediana Redonda Blanca  | Piscina 21E                   | 30 min  | TSA                     |
| 15G                   | Colonia Grande Redonda Blanca   | Piscina de reproductores 13D1 | 30 min  | TSA                     |
| 17G                   | Colonias pequeña redonda blanca | Piscina 21E                   | 1 día   | TSA                     |
| 32G                   | Colonias mediana redonda crema  | Piscina de reproductores 13D1 | 3 días  | agar marino zombel 2216 |
| 76G                   | Colonias grandes redonda crema  | Piscina de reproductores 13D1 | 4 días  | TSA                     |

Tabla # 9 Característica morfológica de las cepas bacterianas en cultivos, lugar y tiempo de colonización.

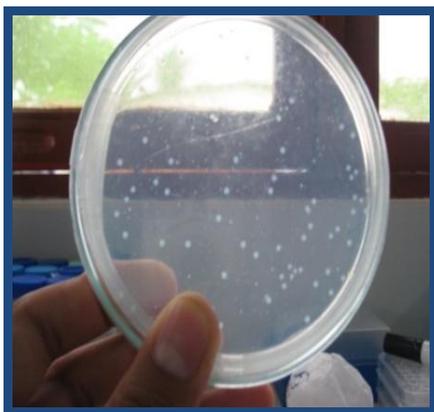


Fig # 27 Cepa Bacteria 6G.

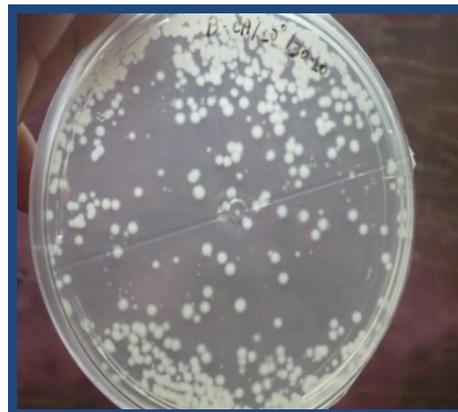


Fig # 28 Cepa Bacteria 15 G



Fig # 29 Cepa Bacteria 17G.

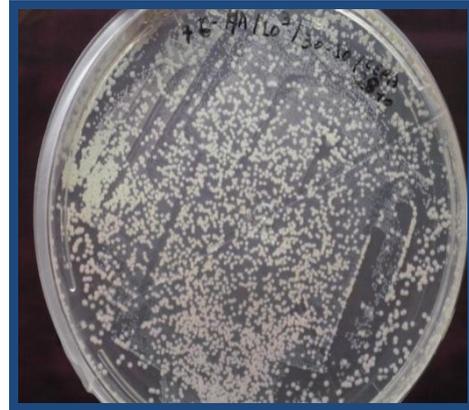


Fig # 30 Cepa Bacteria 32 G



Fig # 31 Cepa Bacteria 76 G

### **6.3 Identificación de bacterias mediante Tinción de Gram.**

Las colonias bacterianas en estudio fueron identificadas aplicando la técnica de Gram, para evaluar la pureza antes de conservarlas. Los resultados fueron colonias azules lo que determinó que las bacterias obtenidas desde los geotextiles son Gram + (Tabla # 10).

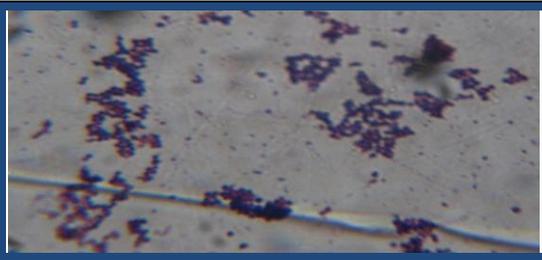
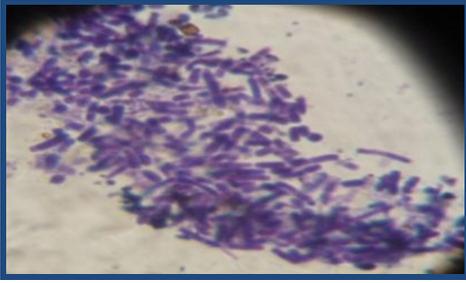
| Código de cepa | Prueba Gram | Forma bacteriana    | Figura   |
|----------------|-------------|---------------------|--|
| 6G             | +           | <i>Bacillus</i>     |    |
| 15G            | +           | <i>Bacillus</i>     |    |
| 17G            | +           | <i>Cocos</i>        |   |
| 32G            | +           | <i>Estafilococo</i> |  |
| 76G            | +           | <i>Bacillus</i>     |  |

Tabla # 10 . Identificación de las cepas bacterianas por tinción de Gram.

#### **6.4 Identificación de bacterias aisladas del perifitón aplicando técnicas moleculares.**

En bacterias, la identificación de especie a nivel molecular se basa en el análisis del gen que codifica para el ARN ribosomal de la subunidad 16S (16S rRNA). Esta molécula de alrededor de 1.500 pb, está presente en todas las bacterias. Es debido a su alta conservación, es decir que cambia lentamente durante la evolución, que el gen 16S rRNA ha sido retenido como principal gen de estudio para la taxonomía molecular de las cepas.

#### **6.5 Amplificación del ADN bacteriano por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

Para amplificar el genoma bacteriano se aplicó la técnica de PCR simple, debido a que el ADN extraído proviene de un cultivo puro. En la amplificación se utilizó dos juegos de primers universales para bacterias los mismos que al ser analizados en el programa de análisis molecular de secuencias de nucleótidos en el Blast indicó que el primer juego flanqueaba un fragmento de 585 pb (fig # 32) y el segundo un fragmento de 1465 pb. En esta investigación tres cepas (6G, 15G, 17G) fueron amplificadas con el primer juego de primers (Fig # 33) y dos (32G y 76G) con el segundo juego (Fig # 34). El producto amplificado se observa en el gel de agarosa el mismo que al ser comparado con el marcador de peso molecular

de 100 pb (MPM), indica que los fragmentos resultantes corresponden a 585 pb y 1465 pb este resultado determina que las cepas en estudio pertenecen al tipo de bacterias lactonasas positivas (+).

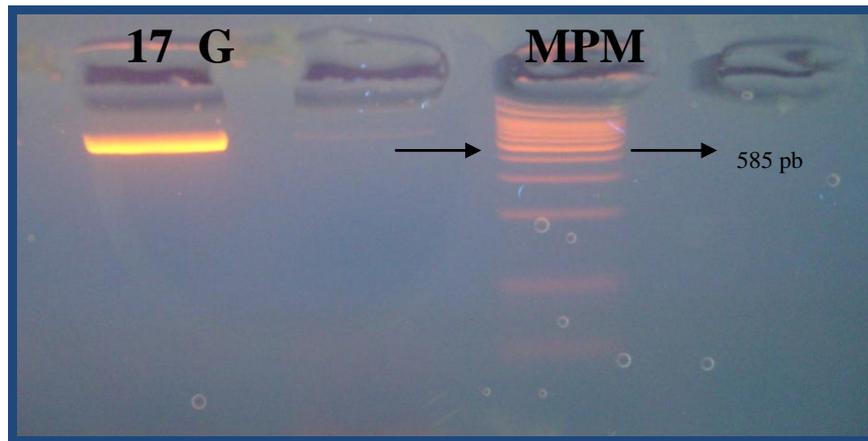


Fig # 32 Amplificación de la 17 G con Primers RL 71 A y RL 72 A amplicon de 585 pb.

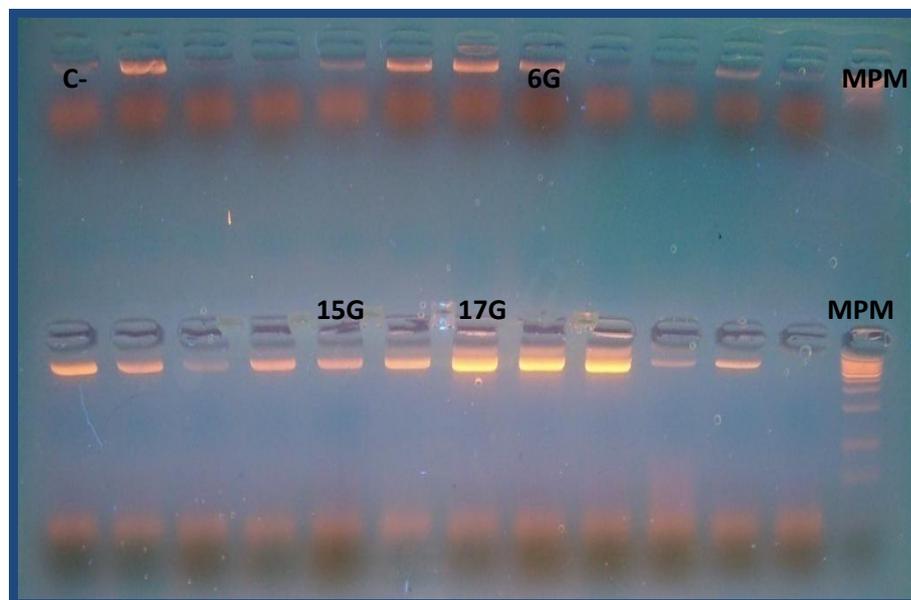


Fig # 33 Amplificaciones de la Cepa 6G, 15G, 17G con primer juego de primers con un tamaño de 585 pb con un MPM de 100 pb.

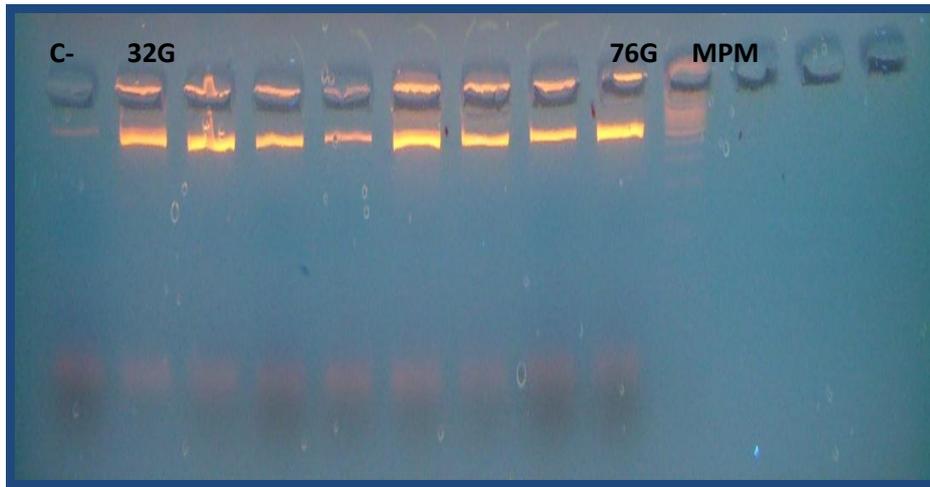


Fig # 34 Amplificaciones de la Cepa 32G, 76G con segundo juego de primers con un tamaño de 1465 pb

### **6.6 Análisis de similitud de secuencias del gen 16S RNA bacteriano comparado con otras especies.**

El análisis de similitud de secuencias del producto amplificado del gen que codifica para la subunidad 16S RNA ribosomal se realizó mediante programas computarizados como el NCBI – Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), seleccionando a todas aquellas especies que demuestran un nivel de similitud del 99 – 100 % con las cepas en estudio.

La secuencia de la cepa 6G se ilustra a continuación en forma textual tal como se ingresa al NCBI- Blast.

>080821-03\_I08\_6G-RL71A.ab1 567 0 567 ABI

```
NNNGGGTGAGGTGAAGTAGACGAGCACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCG
TAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGG
TATCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
GGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCT
GATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGT
GCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGG
AACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCG
TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTA
AGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTG
GGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGANNNNNNNNN
```

El resultado del análisis computarizado presenta un cuadro de líneas del mismo tamaño que resulta de la comparación de la secuencia analizada en este caso 6G con las existentes en la base de datos de BLAST®. La barra de colores en la parte superior indica el nivel de correlación con su respectivo código: rojo corresponde a un nivel superior a 200 bp idénticas (Fig # 35).

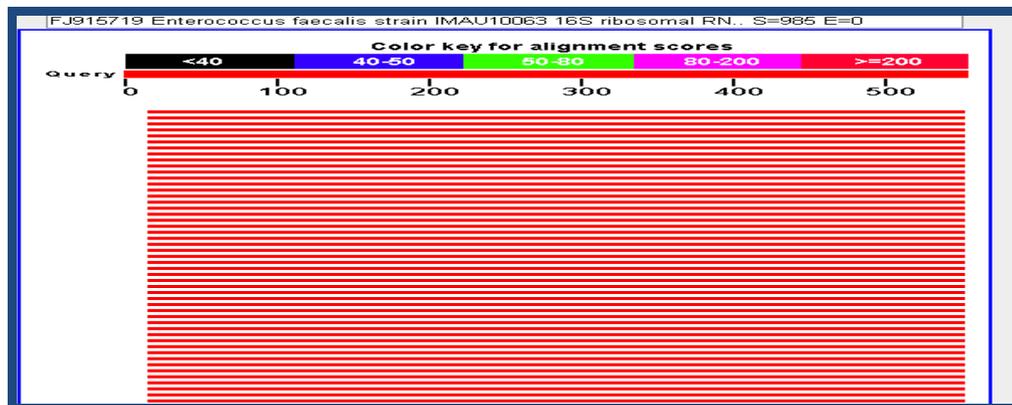


Fig # 35 Análisis de la cepa 6G donde el color rojo corresponde a un nivel superior a 200 bp idénticas.

A continuación se muestra el detalle de la comparación de la similitud que existe entre la secuencia de la cepa en estudio (6G) con la secuencias de otras cepas

registradas en el Blast. Además indica los códigos de acceso al GenBank, la descripción de la cepa y el porcentaje de similitud desde diferentes puntos de vista (Fig 36 ).

| Accession                  | Description   | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident |
|----------------------------|---|-----------|-------------|----------------|---------|-----------|
| <a href="#">GU177628.1</a> | Enterococcus faecalis strain 3-12 16S ribosomal RNA gene, partial s | 985       | 985         | 96%            | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">AB534553.1</a> | Enterococcus faecalis gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence  | 985       | 985         | 96%            | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">GU064365.1</a> | Enterococcus faecalis strain V13 16S ribosomal RNA gene, partial s  | 985       | 985         | 96%            | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">GQ456060.1</a> | Enterococcus faecalis strain CMA33 16S ribosomal RNA gene, partie   | 985       | 985         | 96%            | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">GQ395611.1</a> | Enterococcus faecalis strain D023 16S ribosomal RNA gene, partial   | 985       | 985         | 96%            | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">GQ337884.1</a> | Enterococcus faecalis strain KLD54.0341 16S ribosomal RNA gene,     | 985       | 985         | 96%            | 0.0     | 99%       |

Fig # 36 Porcentaje de similitud entre la cepa 6G y cepas registradas en el GenBank.

De acuerdo a estos resultados la secuencia de la cepa 6G tiene una similitud del 99 % con las cepas *Enterococcus faecalis* registradas en la base de datos del GenBank, esta alta similitud confirma que la cepa en estudio se trata de una bacteria de tipo *Enterococcus faecalis*

La escala taxonómica de la Cepa 6G es la siguiente:

Reino: Bacteria

Phyllum: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Lactobacillales

Familia: Enterococcaceae

Género: *Enterococcus*

Especie: *faecalis*

Nombre científico: *Enterococcus faecalis*

Fuente: Gen Bank

El mismo procedimiento para la identificación molecular y análisis de secuencias se siguió para las cuatro cepas en estudio, el detalle del análisis véase en Anexo 1.

Los resultados generales del análisis de secuencias de las cepas 15G, 17G, 32G y 76G son los siguientes (Tabla # 11).

| <b>Código de cepa</b> | <b>Nombre científico y descripción de la secuencia comparada.</b> | <b>Máxima similitud entre secuencia en estudio y las registradas en el GenBank</b> |
|-----------------------|---|--|
| 6G                    | <i>Enterococcus faecalis</i>                                      | 99 %   |
| 15G                   | <i>Vibrio alginolyticus</i> RNA ribosomal 16S                     | 94 %   |
| 17G                   | <i>Vibrio alginolyticus</i> , RNA ribosomal 16S                   | 99 %   |
| 32G                   | <i>Vibrio</i> sp RNA ribosomal 16S                                | 99 %   |
| 76G                   | <i>Bacillus</i> sp RNA ribosomal 16S                              | 98 %   |

Tabla # 11 Resultados del análisis de secuencias de las 5 cepas bacterianas con las registradas en el Gen Bank.

La cepa 15G resultó tener un 94 % de similitud con la secuencia del gen del ARN ribosomal 16S del *Vibrio alginolyticus*, este dato no está dentro del rango (98 % al 100%) aceptable de similitud molecular entre especies, lo que significa que es un *Vibrio alginolyticus* pero que probablemente se trata de otro tipo de cepa y que requiere nuevos análisis moleculares.

Como demuestran los resultados las cepas 17G, presenta un 99 % de similitud con la secuencia del gen del ARN ribosomal 16S del *Vibrio alginolyticus*, lo que determina que la bacteria en estudio corresponde a un *Vibrio alginolyticus*.

La similitud de secuencia de la cepa 32G comparada con las secuencias del gen del ARN ribosomal 16S del *Vibrio sp* es del 99 %, lo que indica que indudablemente la cepa en estudio es un *Vibrio sp*.

Finalmente la cepa 76G presento un 98 % de similitud con las cepas registradas en el Gen Bank por lo que se identificó como *Bacillus sp*.

Una vez identificada la especie de las cepas en estudio se procede a ubicar en la escala taxonómica a cada una.

Escala taxonomía de la Cepa 15G:

Reino: Bacteria

Phyllum: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Vibrionales

Familia: Vibrionaceae

Género: *Vibrio*

Especie: *alginolyticus*

Nombre Científico: *Vibrio alginolyticus*

Fuente: Gen Bank

Escala taxonómica de la Cepa 17G.

Reino: Bacteria

Phyllum: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Vibrionales

Familia: Vibrionaceae

Género: *Vibrio*

Especie: *alginolyticus*

Nombre Científico: *Vibrio alginolyticus*

Fuente: Gen Bank

Escala taxonómica de la Cepa 32G

Reino: Bacteria

Phyllum: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Vibrionales

Familia: Vibrionaceae

Género: *Vibrio*

Especie: sp

Nombre Científico: *Vibrio sp*

Fuente: Gen Bank

Escala taxonómica de la Cepa 76G

Reino: Bacteria

Phyllum: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Bacillaceae

Género: *Bacillus*

Especie: sp

Nombre Científico: *Bacillus sp*

Fuente: Gen Bank

### **6.7 Conservación de cepas bacterianas.**

Para conservar las cepas bacterianas, se centrifugo un caldo de la cepa resuspendida en un medio TSB con 15 % (volumen a volumen) de glicerol. El caldo bacteriano esta conservado en duplicado, a -4 °C o -20 °C. Se pueden conservar las cepas según el mismo procedimiento en nitrógeno liquido a -196 °C. Cada cepa fue sembrada en agar inclinado (TSA) y conservada a 4 °C.

### **6.8 Cultivo de cepas bacterianas para la colonización de geotextiles.**

El proceso de cultivo bacteriano se realizó siguiendo el sistema de repiques indicado en materiales y métodos, el mismo que se inicia con 1mL de cultivo partiendo desde el tubo de cepa madre y a medida que la densidad bacteriana aumentaba se realizaron las correspondientes repliques.

### 6.8.1 Densidad celular (UFC).

Para conocer la densidad celular o unidades formadoras de colonias (UFC) de los cultivos en prueba (cepas 6G, 15G, 17G, 32G y 76G) se utilizó la técnica y formulas descritas en materiales y métodos. El conteo de UFC se realizó en placas de Agar TSA por triplicado, para cada una de las cepas bacterianas, mediante diluciones seriadas hasta  $10^7$  luego se incubó por 24 horas a temperaturas de 28 – 30 °C, los resultados fueron los siguientes: La Cepa Bacteriana con una mayor densidad celular fue *Vibrio alginolyticus* (15 G), con un valor de  $270 \times 10^9$  UFC/mL, seguido del *Vibrio alginolyticus* cepa (17 G) con  $100 \times 10^9$  UFC/mL y en menores densidades las cepas 76G, 6G y 32G como se demuestra en la tabla # 12

| Código de Cepa | UFC/ ml           |
|----------------|-------------------|
| 6 G            | $32 \times 10^9$  |
| 15 G           | $270 \times 10^9$ |
| 17 G           | $100 \times 10^9$ |
| 32 G           | $2 \times 10^9$   |
| 76 G           | $60 \times 10^9$  |

Tabla # 12 UFC/mL de las diferentes cepas bacterianas.

### 6.9 Colonización de bacterias en el geotextil.

La densidad celular del ensayo de colonización bacteriana sobre los geotextiles en tiempos de 6, 12 y 24 horas, dieron como resultado una mayor densidad celular la

cepa 15G desde la primera toma de muestra a las 6 horas  $15 \times 10^9$ , por consiguiente fue aumentando a las 12 y 24 horas  $425 \times 10^9$ ,  $460 \times 10^9$  respectivamente; seguido por la cepa 76G (tabla # 13).

| # de Cepa | 6 Horas<br>UFC/mL | 12 Horas<br>UFC/mL | 24 Horas<br>UFC/mL |
|-----------|-------------------|--------------------|--------------------|
| 6 G       | $8 \times 10^9$   | $94 \times 10^9$   | $300 \times 10^9$  |
| 15 G      | $15 \times 10^9$  | $425 \times 10^9$  | $460 \times 10^9$  |
| 17 G      | $9 \times 10^9$   | $131 \times 10^9$  | $290 \times 10^9$  |
| 32 G      | $2 \times 10^9$   | $143 \times 10^9$  | $288 \times 10^9$  |
| 76 G      | $17 \times 10^9$  | $310 \times 10^9$  | $412 \times 10^9$  |

Tabla # 13 UFC/mL en el proceso de colonización de las bacterias.

Para observar la dinámica de colonización de las cepas bacterianas en el geotextil se utilizo la microscopía confocal de barrido laser, donde se observo como las bacterias se fijan en el substrato donde la intensidad del color rojo esta en relación a la cantidad de bacterias fijadas al geotextil . Anexo 2.

#### **6.10 Evaluación de los geotextiles inoculados con bacterias, en los niveles de producción de cultivo del *Litopenaeus vannamei***

La evaluación de los geotextiles con las 5 cepas bacterianas (6, 15, 17, 32, 76G) fueron ofrecidos durante 30 días a 160 postlarvas de *Litopenaeus vannamei* (PL

10) por tanque, densidad de siembra 250 pl/m<sup>2</sup> como en un sistema intensivo.  
( Fig # 37).



Fig # 37. Postlarva pastoreando los geotextiles.

#### **6.10.1 Tratamientos en el cultivo de *Litopenaeus vannamei* aplicando geotextiles**

Los tratamientos (T) aplicados al cultivo en prueba fueron: T<sub>0</sub> que es el control donde no se utilizó substratos artificiales colonizados con bacterias, T<sub>1</sub> Tratamiento usando substrato artificial colonizado con la cepa 32G (*Vibrio sp*), T<sub>2</sub> Tratamiento utilizando la cepa bacteriana 6 G (*Enterococcus faecalis*); T<sub>3</sub> Tratamiento usando la cepa 17 G (*Vibrio alginolyticus*) T<sub>4</sub> Tratamiento utilizando la cepa bacteriana 15 G (*Vibrio alginolyticus*) y T<sub>5</sub> Tratamiento usando la cepa 76 G (*Bacillus sp*). Cada tratamiento se realizó por duplicado.

- **Parámetros físicos- químicos.**

El registro de datos de los parámetros físico - químico que se tomaron durante el mes de cultivo se indica en la tabla # 14.

| <b>Promedio de Parámetros en el cultivo</b> |                 |                |
|---|-----------------|----------------|
|   | Mañana<br>08:00 | Tarde<br>17:00 |
| pH  | 8.3             | 8.5            |
| Temperatura (°C)                            | 29.9            | 32.6           |
| Oxígeno (mg/L)                              | 5.1             | 5.0            |
| Salinidad                                   | 35 UPS          |                |

Tabla # 14 Promedio de los parámetros de cultivo.

### 6.10.2 Supervivencia de los organismos en el bioensayo

La supervivencia de *L. vannamei* cultivado con alimento balanceado y bacteria 32G (T<sub>1</sub>), 6G (T<sub>2</sub>), 76G (T<sub>5</sub>) fijadas a substratos artificiales (geotextiles), fue de 99 %, es decir un 6 % más que el control (T<sub>0</sub>) en donde solo se le dio alimento balanceado. Mientras que la cepa 17 G (T<sub>3</sub>) se mantuvo el mismo porcentaje que el control y la cepa 15G un 2 % menos que el control.(Anexo 3). Y Figura # 38.

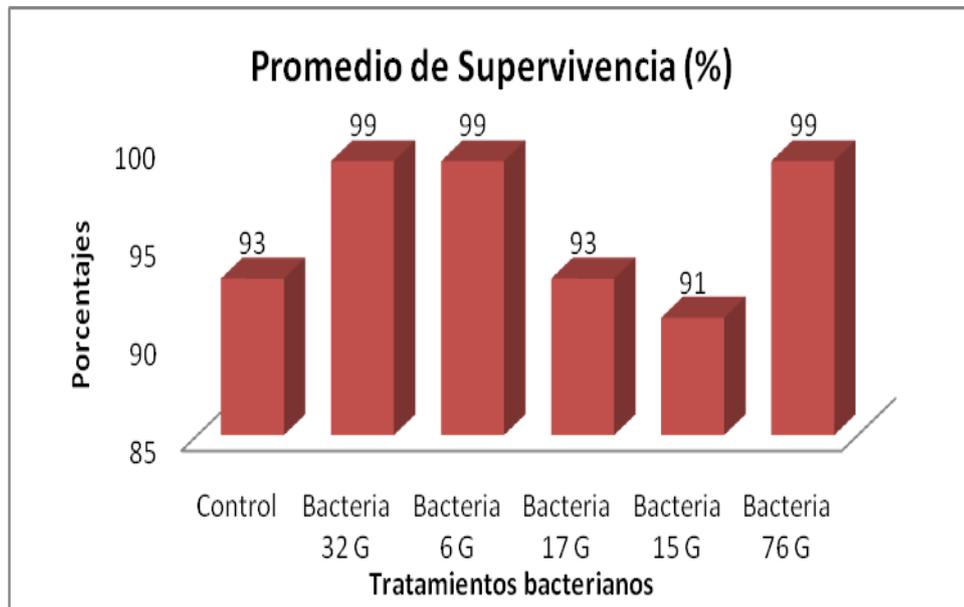


Fig # 38. Supervivencias obtenidas en los diferentes tratamientos utilizando las 5 cepas bacterianas

### 6.10.2 Crecimiento.

Para conocer el crecimiento de *L. vannamei*, se realizó semanalmente a través del peso promedio de 30 postlarvas por tratamiento, de los cuales a la quinta semana de estudio se obtuvo un 2,262 g de incremento semanal con la cepa bacteriana 76 G (*Bacillus sp.*), que equivale a 0,48 g más que el control. Mientras que con la cepa 17 G (*Vibrio alginolyticus*) con 2,250 g de incremento semanal que equivale a 0,47 g más que el control. En lo que se refiere al incremento semanal todos superaron al control a partir de la quinta semana (tabla #15 y fig # 39).

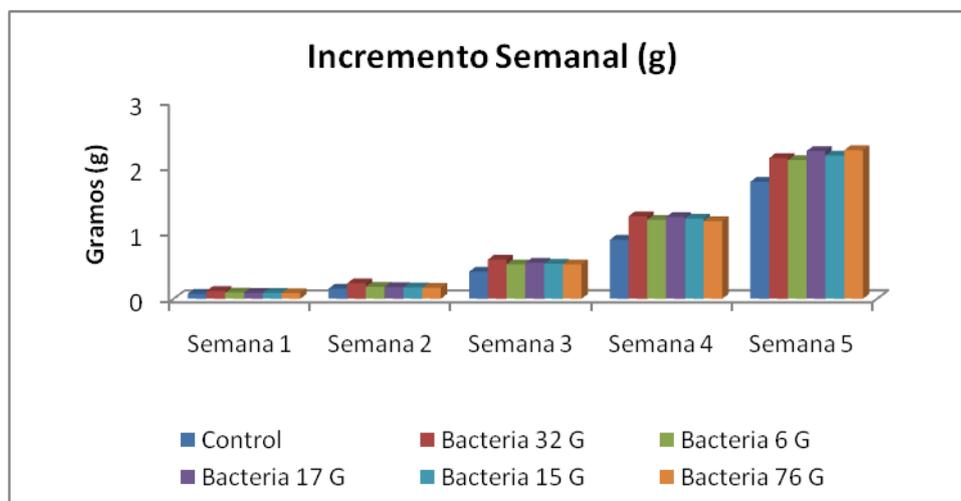


Fig # 39. Incremento en peso obtenido en cada tratamiento durante 5 semanas

| Incremento semanal (gramos)                   | Peso inicial | 1° Semana | 2° Semana | 3° Semana | 4° Semana | 5° Semana |
|---|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>T<sub>0</sub>: Control</b>                 | 0,002        | 0,077     | 0,152     | 0,411     | 0,897     | 1,782     |
| <b>T<sub>1</sub>: Perifiton Bacteria 32G</b>  | 0,002        | 0,118     | 0,235     | 0,597     | 1,256     | 2,143     |
| <b>T<sub>2</sub>: Perifiton Bacteria 6G</b>   | 0,002        | 0,093     | 0,184     | 0,526     | 1,202     | 2,111     |
| <b>T<sub>3</sub>: Perifiton Bacteria 17G</b>  | 0,002        | 0,090     | 0,179     | 0,547     | 1,244     | 2,250     |
| <b>T<sub>4</sub>: Perifiton Bacteria 15G</b>  | 0,002        | 0,088     | 0,173     | 0,536     | 1,223     | 2,180     |
| <b>T<sub>5</sub>: Perifiton Bacteria 76 G</b> | 0,002        | 0,085     | 0,167     | 0,525     | 1,184     | 2,262     |

Tabla # 15. Datos del incremento en peso de cada tratamiento durante 5 semanas

#### 6.10.4 Biomasa.

Los substratos artificiales colonizados con las diferentes tipos de bacterias afectó significativamente la biomasa final (Tabla # 15), obteniéndose valores superiores a la del control, 35 % con la cepa 76 G, 27 % con la 32 G, 26 % con la cepa 6 G y

17 G y 20 % con la cepa 15 G (Fig # 40). Las formulas para obtener la biomasa final se encuentran descritas en materiales y métodos.

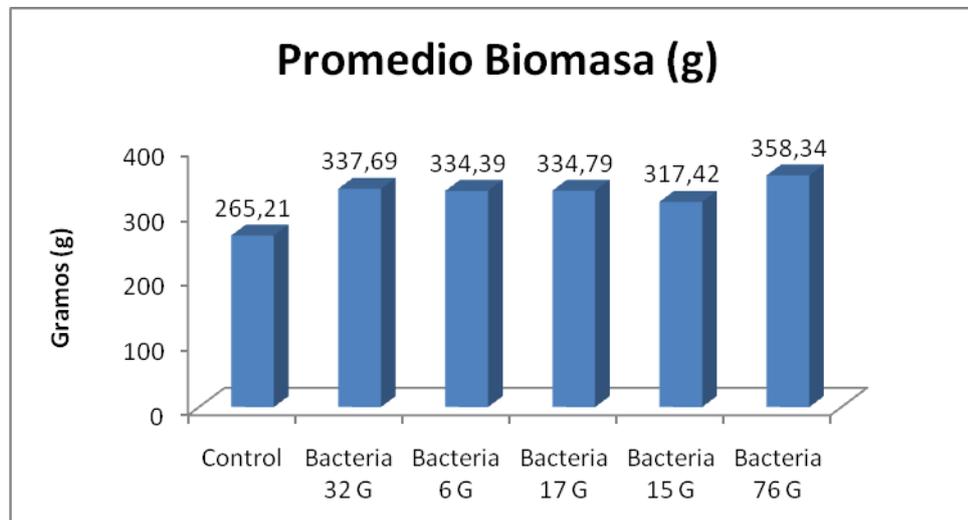


Fig 40 Biomasa Final obtenida de cada tratamiento durante el bioensayo.

Los resultados obtenidos en la evaluación del perifitón fijado a sustratos artificiales sobre la supervivencia, crecimiento de *L. vannamei*, muestran que la utilización de bacterias tipo lactonasas positivas son favorables debido a que aumenta la producción de alimento natural suplementario, mejoran los niveles de calidad de agua, Todas las cepas mostraron un efecto positivo, resultando ser la mejor cepa la 76G con un 6 % más de supervivencia y 0.48 g más que el control en donde no se utilizó sustrato fijado con bacterias.

La aplicación de la Cepa 76G, en cultivos experimentales de camarón *L. vannamei* presentó mayores porcentajes de biomasa y supervivencia. En base a

estos resultados se realizó pruebas a nivel de producción en la Camaronera Inversiones Silma. (Tumbes- Peru) en piscinas semi- intensivas de 0.8 Ha., de 155 días de cultivos, en donde se obtuvo un incremento de biomasa cosechada de 10 % con 8 % menos de alimento balanceado, ofreciendo un beneficio económico al sector camaronera, demostrando además que la utilización de bacterias mejora el crecimiento, supervivencia del camarón obteniendo mejores índices de conversión alimenticia en la producción, logrando cumplir con los objetivos de este estudio.

## **CAPÍTULO V.**

### **7. DISCUSIONES.**

La identificación de microorganismos por la técnica PCR ha tenido un gran impacto en el diagnóstico microbiológico, ya que es posible identificar el agente etiológico aunque se desconozca la especie o el género, utilizando primers (iniciadores) universales. Para amplificar el ADN de las cepas bacterias en estudio se utilizaron dos juegos de primers. El primer juego fue utilizado por Dang H & Lovell CH. 2000 en colonización primaria bacteriana y sucesión temprana en superficies de aguas marinas, a través del análisis filogenético las cepas fueron identificadas en la división Proteobacteria ( $\alpha$ -Proteobacteria) con fragmentos de 585 pb, resultando ser iguales a los fragmentos obtenidos para las cepas 6G, 15G y 17G. El segundo juego de primer fue utilizado por Gontang *et al.*, 2007 en la diversidad filogenética de las bacterias gran positivas cultivadas de los sedimentos marinos, identificando 1624 bacterias gran positivas de las cuales el 65,6 % pertenecen a la clase Actinobacteria y un 34,4 % de la Clase Bacilli. Con un fragmento de 1475 pb igual a los obtenidos para la cepa 32G y 76G de la presente investigación.

Varios estudios han demostrado que los *Vibrios* son los patógenos causantes de la vibriosis enfermedad bacteriana responsable de grandes mortalidades en el cultivo de camarón en todo el mundo (Lightner & Lewis, 1975; Adams, 1991; Lightner et al., 1992; Lavilla-Pitogo et al., 1996; Lavilla-Pitogo et al., 1998; Chen et al., 2000), la enzima que les permite comunicarse y por ende proliferarse a estos patógenos es la lactonasa, para contrarrestar este problema existen bacterias lactonasas que degradan las lactonas y así cortar la comunicación entre *Vibrios*, por tal motivo en este trabajo se utilizó los primers BacLact 1Fy BacLact 1R (Empresa Concepto Azul S.A.) que amplifica el gen de la enzima lactonasa resultando ser bacterias lactonasas positivas, las mismas que fueron aplicadas al cultivo de camarón en donde se obtuvo valores mayores o igual al 98 % en supervivencia, lo que sugiere que estas bacterias reducen la producción de lactonas de los *Vibrios*

En esta investigación la Cepa Bacteriana con una mayor densidad celular fue *Vibrio alginolyticus* (15 G), con un valor de  $270 \times 10^9$  UFC/mL, siendo la misma cepa la que colonizó primero y con una densidad celular de  $425 \times 10^9$  UFC/mL en la prueba de colonización sobre el geotextil esto fortalece los resultados y corrobora lo investigado por Thompson & Polz en el 2006, quien asegura que los *vibrios* se encuentran en altas densidades en el ecosistema marino.

Varios estudios sobre probióticos indican que las cepas utilizadas en esta investigación: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio sp* y *Bacillus sp.* son bacterias

lactonasas positivas que se pueden considerar como cepas probióticas, así lo demuestra Sotomayor 2003, quien utilizó mezclas de cepas probióticas para la inhibición de vibrios patógenos de camarones, las cepas fueron: (*Vibrio alginolyticus*) aislada por (Morales fide San Miguel, 1992), caracterizada por San Miguel (1996) y estudiada su efecto probiótico en larvas de camarón por Serrano (1996) y las cepas P62 y P63 (*Vibrio sp.*) y P64 (*Bacillus sp.*) aisladas del hepatopáncreas de animales silvestres sanos de *Litopenaeus vannamei* y estudiados sus efectos probióticos individualmente en camarones juveniles por Gullian (2001).

El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese a principios de la década de 1970. Cetina et al. 2001 identificó y comparó con la base de datos y reveló que las muestras de sedimentos marinos obtuvieron una identidad del 97 % con el género *Pseudoalteromonas sp.* Gontang 2007. Identificó 52 cepas pertenecientes al orden Actinomycetales con un porcentaje de identidad mayor o igual al 98% y 26 cepas pertenecientes al orden Bacillales con un porcentaje de identidad mayor o igual al 98 % ratificando los resultados en este trabajo donde las similitudes de secuencias son de 94 % al 99 % con los registros del Gen Bank.

El porcentaje de supervivencia de camarones utilizando sustratos artificiales (geotextiles) fue entre 93 % y 99 %, coincidiendo con Otoshi *et al.* (2006) quienes reportaron que la supervivencia de *L. vannamei* fue alta, entre 94 % a 100 %, significativamente iguales, cuando se cultivaron sin y con sustratos artificiales. Del mismo modo, Ballester *et al.* (2003), para la etapa de precría de *F. paulensis* reportan supervivencias entre 82,58 % a 100 %, sugiriendo que en esta etapa del cultivo al utilizar sustratos artificiales las supervivencias son altas y similares.

La utilización de cepas bacterianas fijadas en sustratos artificiales (geotextiles), permitió un peso promedio final mayor entre 18 % - 27 % mas que el tratamiento sin sustrato, siendo porcentajes similares obtenidos por Otoshi *et al.* (2006) Martínez *et al.* (2004), Moss and Moss (2004) y Bratvold and Browdy (2001), quienes reportaron que para *L. vannamei* obtuvieron, un peso promedio final mayor en 27 %; 28 %; 26,0 %, 17,4 %, 34,5 % y 28 – 37 %, respectivamente, en el tratamiento con sustratos artificiales frente al tratamiento sin estos. Se propone que la actividad de los complejos bacterianos en la mejora nutricional del camarón es efectiva, apoyando a Ballester *et al.* (2003), quienes señalan que los complejos bacterianos convierten el nitrógeno inorgánico presente en agua y los ponen a disposición en una forma de proteína microbiana que es ingerida por los organismos cultivados aumentando la eficiencia de conversión proteica y economizando el alimento ofrecido mientras que Buford *et al.* (2005) afirma que los flocs bacterianos contribuyen sustancialmente a la nutrición del camarón sin importar la talla.

Al evaluar el efecto del perifitón sobre la biomasa final de *L. vannamei*, se encontró una ventaja de 26 % y 35 % a favor del tratamiento con substratos artificiales. Esta tendencia, también fue reportada por Díaz y Maldonado (2008), Domingos (2003) y Martínez et al. (2004) quienes obtuvieron ventajas significativas de 25 %, 23 % y 58 %, respectivamente, en la biomasa de *L. vannamei* cuando fue cultivado con substratos artificiales frente al cultivo sin estos.

Los resultados de esta investigación demuestran que la aplicación de geotextiles utilizando cepas bacterianas del perifitón estrictamente seleccionadas proyecta resultados prometedores a la industria camaronera peruana, debido a que, en el cultivo de peneidos la alimentación balanceada representa el mayor costo de producción, este puede variar entre 28 % a 50 % con el uso de los substratos artificiales (geotextiles); ya que incrementan el alimento natural suplementario para los cultivos, permitiendo aumentar la capacidad de carga de estos sistemas, mejorando su producción y productividad a menores costos, esto podría reducir significativamente los costos de producción y los riesgos de contaminación del agua debido al uso inadecuado de dietas artificiales.

## 8. CONCLUSIONES

- Las cepas bacterianas aisladas desde sustratos artificiales (geotextiles) en cultivos de *Litopenaeus vannamei* fueron cinco (códigos 6G, 15G, 17G, 32G y 76G), que corresponden a las formas bacterianas *Bacillus* *cocos* y *estafilococos*.
- La identificación molecular a través de la técnica PCR simple utilizando primers (iniciadores) universales para bacterias, dio como resultado fragmentos de 585 pb y 1465 pb., y el análisis de secuencias con un nivel de similitud del 99 % confirmó que las especies con las que se trabajó son *Enterococcus faecalis*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio* sp y *Bacillus* sp., las mismas que pertenecen al grupo de bacterias lactonasas positivas que se consideran como cepas probióticas.
- Los métodos y técnicas utilizados para estudiar las bacterias del perifitón resultaron ser competentes para colonizar sustratos artificiales, en este caso geotextiles y las pruebas de aplicación de estos sustratos con las cepas *Vibrio alginolyticus* (17G) y *Bacillus* sp (76 G) en los cultivos de *Litopenaeus vannamei* fueron favorables con un promedio de crecimiento semanal de 0,10 g en las dos primeras semanas y de 0.50 g en las últimas semanas, peso promedio de 2.3 g.

- La supervivencia de *L. vannamei* mejoró significativamente en un 6% por el consumo de perifitón fijado a los geotextiles con las cepas bacterianas *Enterococcus faecalis* (6G) *Vibrio* sp (32G) y *Bacillus* sp (76G).
- La composición de la comunidad de microorganismos del perifitón influyó en la calidad alimenticia de *L. vannamei* y el adecuado manejo del cultivo contribuyó significativamente a obtener resultados favorables.

## 9. RECOMENDACIONES.

- Utilizar geotextiles como substratos artificiales con una amplia superficie adicional sobre la cual los camarones pueden proveerse de alimento natural suplementario al alimento balanceado, para mejorar el cultivo de camarón en lo que se refiere a crecimiento, biomasa y supervivencia.
- Utilizar la cepa 76 G identificada en este trabajo como *Bacillus sp*, como la mejor opción para colonizar geotextiles, favorecer al crecimiento, talla peso y con mayor porcentaje de supervivencia en cultivos de camarón *L. vannamei*
- Aplicar la técnica molecular PCR simple, la misma que es muy sensible y específica para la identificación de organismos como los obtenidos en esta investigación.
- Seguir con precaución los métodos y técnica detalladas en este trabajo para el estudio de bacterias del perifitón y realizar nuevos ensayos con las 4 bacterias restantes.
- Considerar el impacto del consumo del geotextil por los camarones de acuerdo a la sucesión microbiana, esto ayudará a una mejor manipulación del alimento natural proveniente del perifitón.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABREU Paulo Cesar; Eduardo. Ballester; Clarisse Odebrecht, Wilson Wasielesky Jr. , Ronaldo O. Cavalli, Wilhelm Graneli, Alexandre M. Anesio. (2007) Importance of biofilm as food source for shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*) evaluated by stable isotopes. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 347 88 – 96.
- ÁCS, É., y Kiss K. 1991. Investigation of Periphytic Algae in the Danube at Göd (1669 river km, Hungary). Archiv für Hydrobiologie Supplement 89 – Algological studies 62: 47–67.
- ALFONSO E., Almaguer Y., y Leal S. 2004. Aislamiento y Cultivo de dos Especies de Diatomeas bentónicas. Rev. Invest. Mar. 25(1):57-64. Sitioweb: [http://www.dict.uh.cu/Revistas/Inv\\_Marinas/25\(1\)pdf/2004-57.pdf](http://www.dict.uh.cu/Revistas/Inv_Marinas/25(1)pdf/2004-57.pdf).
- ANNE A. van Dam, Malcolm C.M. Beveridge, M. Ekram Azim & Marc C.J. Verdegem. 2002. The potential of fish production based on periphyton. Reviews in Fish Biology and Fisheries 12: 1–31
- AZIM ,*et al.* 2005. Ecology, Exploitation and management of periphyton CAB International
- AZIM, M. E., M. A. Wahab, A. A. van Dam, M. C. Beveridge, A. Milstein and MC. Verdegem. 2001. Optimization of fertilization rate for maximizing periphyton production on artificial substrates and the

implications of periphyton-based aquaculture. *Aquaculture Research*. 32:749-760.

BALLESTER, E. L. C., W. Wasielesky Jr., R. O. Cavalli, M. H. S. Santos e P. C. Abreu. 2003. Influência do biofilme no crescimento do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* em sistemas de berçário. *Atlântica*, Rio Grande. 25(2): 117-122.

BARRAGUET. Christiane, Bart Veuger, sebastien A.M. Van Beusekom, Peter Marvan, Jan J. Sinke and wim Admiraal. (2005) Divergent composition of algal – bacterial biofilms developing under various external factors. Taylor & Francis Group. *European Journal of Phycology*. 40: 1 -8.

BENDER Judith, Peter Phillips. (2004) Microbial mats for multiple applications in aquaculture and bioremediation. *Bioresource Technology* 94 229-238.

BIGGS, B.J.F., Stokseth, S., 1996. Hydraulic habitat suitability for periphyton in rivers. *Regulated Rivers: Res. Manage.* 12, 251±261.

BLUMENSHINE, S.C., Vadeboncoeur, Y., Lodge, D.M., Cottingham, K.L. and Knight, S.E. (1997) Benthic-pelagic links: response of benthos to water-column nutrient enrichment. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 16, 466–479.

BRATBAK G. & Thingstad. T. 1985 Phytoplankton – bacteria interactions: an apparent paradox? Analysis of a model system with both competition and commensalism. *Marine Ecology*. Vol 25: 23 – 30.

BRATVOLD, D. and C. L. Browdy. 2001. Effects of sand sediment and vertical surfaces (AquaMats™) on production, water quality, and microbial

ecology in an intensive *Litopenaeus vannamei* culture system. *Aquaculture*. 195:81–94

BROCK, J.A. and Lightner, D.V. 1990. Chapter 3: Diseases of Crustacea. In: O. Kinne (ed.) *Diseases of Marine Animals Vol. 3*, Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg. pp. 245-424.

BUFORD, M. A., P. Thompson, R. Mc Intosh, R. Bauman. 2005. ¿Cuán efectiva es la comunidad microbiana en sistemas intensivos de cultivo de camarón para mejorar la eficiencia de la producción? VIII Congreso Ecuatoriano Acuicultura. *Revista de Resúmenes*. 78-81.

CAMPAÑA A., Martínez L., y Martínez M. 2004. Manejo de la Productividad Natural en el Cultivo del Camarón. Sitio web: [www.educacion.uanl.mx/publicaciones/maricultura/vii/pdf/32LuisMartinez.pdf](http://www.educacion.uanl.mx/publicaciones/maricultura/vii/pdf/32LuisMartinez.pdf)

CALLOW J. A., M. E. Callow. *Biofilm*. 1998. School of Biosciences, The University of Birmingham.

CANO Ana María. 2007. Una aproximación al cultivo sostenible del camarón marino. [www.aquahoy.com/content/view/519/lang.es](http://www.aquahoy.com/content/view/519/lang.es).

CASTRO Mejia German, Jorge Castro Mejia, Thalia Castro Barrera, Alejandra Estrada Zaragoza y Veronica Garcia Castillo. 2005 Importancia de los probióticos en la acuicultura, utilizando *Artemia franciscana* como bioencapsulante. UAM-X. Division de CBS. Depto. El hombre y su Ambiente. *Contactos* 57, 39 – 43.

- CHÁVEZ, M. y I. Higuera. 2003. Manual de Buenas Prácticas de Producción Acuícola de Camarón para la Inocuidad Alimentaria. CIAD – SENASICA. Mazatlán, México. 95p.
- DALTON HM, March PE (1998) Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. *Curr Opin Biotechnol* 9:252–255.
- DANESE, P. N., L. A. Pratt and R. Kolter 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K – 12 biofilm architecture. *J bacteriol.* 182 (12): 3593 – 6.
- DAVEY, M. E.; and G.O. y O'Toole. 2000 Microbial biofilms: from ecology to molecular gelimpoics. *Microbiol. Mol. Biol. Revs.* 64(4):847-67.
- DEMPSTER, P.W., Beveridge, M.C.M. and Baird, D.J. (1993) Herbivory in the tilapia *Oreochromis niloticus*: a comparison of feeding rates on phytoplankton and periphyton. *J. Fish Biol.* 43, 385–392.
- DÍAZ, R. J. L. y E. R. Maldonado. 2008. Uso de substratos artificiales verticales en la producción de *Penaeus vannamei* cultivado en sistema semi-intensivo. Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Pesquero. Tumbes, Perú: Universidad Nacional de Tumbes. Facultad de Ingeniería Pesquera.
- DOMINGOS, J. 2003. Efeito do uso de diferentes quantidades de substratos artificiais na engorda do camarao marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), em um sistema de cultivo semi-intensivo. Florianópolis, Brasil: Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciencias Agrarias. Curso de Pos-Graduacao em Aqüicultura,

- DURAND, S., D.V. Lightner, L.M. Nunan, R.M. Redman, J. Mari, and R. Bonami. (1996). Application of gene probe as diagnostic tools for White Spot Baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 27, 59- 66.
- GILBERT P, Das J, Foley I (1997) Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* 11: 160–167
- GRAW William. Diciembre 2002 Utilización de bacterias heterotróficas y autótrofas en la acuicultura.: Boletín Nicovita
- GOLDMAN C. y Horne A. 1994. *Limnology*, Second ed. McGraw-Hill Book Company, USA. En: Asaeda T., y Hong Son D. 2000. Spatial Structure and Populations of a Periphyton Community: A Model and Verification. *Ecological Modelling* 133: 195–207.
- GOMEZ – Gil, B. Herrera – Vega, M. A., Abreu – Gorbois, A. and Roque, A. 1998. Evaluation of potential probionts for use in penaeid shrimp larval cultura. Ph.D. thesis, Institute of Aquaculture, University of Stirling, Uk 259 pp.
- GONTANG. E. , William Fenical, and Paul R. Jensen. 2007. Phylogenetic Diversity of Gram-Positive Bacteria Cultured from Marine Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, May 2007, p. 3272-3282, Vol. 73, No. 10
- GUALTERO L. D. 2007. Composición y Abundancia de las Algas Bénticas de Cinco Sistemas Lóticos de Puerto Rico. Sitio web: <http://www.grad.uprm.edu/tesis/gualteroleal.pdf>

GULLIAN, M. 2001. Estudio del efecto inmunoestimulante de bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Penaeus vannamei*. Tesis de Magister en Ciencias, ESPOL, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador

HANS – PETER Grossart, Gertje Czub y Meinhard Simon. 2006. Algae – Bacteria interactions and their effects on aggregation and organic matter flux in the sea. Institute of Chemistry and Biology of the Marine Environment, University of Oldenburg. Germany. 8 (6) 1074 – 1084

HORNE, A.J. and Goldman, C.R. (1994) Limnology, 2nd edn. McGraw-Hill Book Company, USA.

HONGYUE Dang and Charles R. Lovel. 2000. Bacterial Primary Colonization and Early Succession on Surfaces in Marine Waters as Determined by Amplified rRNA Gene Restriction Analysis and Sequence Analysis of 16S rRNA Genes. Applied and Environmental Microbiology, February 2000, p. 467-475, Vol. 66, No. 2

HUCHETTE, S.M.H., Beveridge, M.C.M., Baird, D.J. and Ireland, M. (2000) The impacts of grazing by tilapias (*Oreochromis niloticus*) on periphyton communities growing on artificial substrate incages. Aquaculture 186, 45–60.

KESHAVANATH, P., B. Gangadhar, T. J. Ramesh, J. M. van Rooij, M. C. M Beveridge, D. J. Baird, M. C. J. Verdegem and A. A. van Dam. 2001. Use of artificial substrates to enhance production of freshwater herbivorous fish in pond culture. Aquaculture Research. 32:189-197.

LAVILLA-PITOGO, C.R., Leano, E.M. y Paner, M.G. (1998). Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with

dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. *Aquaculture*, 164 (1-4): 337-349.

LANE Ch. y Taffs K. 2003. A Comparison of Diatom Community Structure on Natural and Artificial Substrata. *Hydrobiologia* 493:65-79. En: Guevara G., Reinoso G., y Villa F. 2006. Comunidad de Invertebrados del Perifiton del río Combeima (Tolima, Colombia). *Revista Tumbaga*, 1, 43-54.

LIGHTNER, D.V. (ed.). 1996. *A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.

LIN H-J y Shao K-T. 2002. The development of subtidal fouling assemblages on artificial structures in Keelung Harbor, Northern Taiwan. *Zoological Studies* 41:170-182. En: Guevara G., Reinoso G., y Villa F. 2006. Comunidad de invertebrados del perifiton del río Combeima (Tolima, Colombia). *Revista Tumbaga*, 1, 43-54. Sitio web: [http://utolima.ut.edu.co/Tumbaga/REVISTA\\_TUMBAGA/PDFS/TUMBAGA\\_GIOVANNY\\_GUEVARA.pdf](http://utolima.ut.edu.co/Tumbaga/REVISTA_TUMBAGA/PDFS/TUMBAGA_GIOVANNY_GUEVARA.pdf).

LO C.F., C.H. Ho, C.H. Chen, F.K. Liu, Y.L. Chiu, P.Y. Yen, S.E. Peng, H.C. Hsu, H.C. Liu, C.F. Chang, M.S. Su, C.H. Wang, and G.H. Kou. (1997). Detection and tissue distribution of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Diseases of Aquatic Organisms* 30, 53-72.

MARTÍNEZ, L., A. Campaña y M. Martínez. 2004. Manejo de la productividad natural en el cultivo del langostino. En: Cruz-Suárez, L. E., Rique Marie, D., Nieto López, M. G., Villarreal, D., Scholz, U. y González,

- M. 2004. Avances en Nutrición Acuícola VII. Hermosillo, Sonora, México: Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre, 2004.
- MILLER, M.W., Falace, A., 2000. Evaluation methods for trophic resource factors-nutrients, primary production, and associated assemblages. In: Seaman, W. (Ed.), Artificial Reef Evaluation with Application to Natural Marine Habitats, CRC Press, pp. 95– 126.
- MONTOYA. Yimy M.1 & John J. Ramírez R.2007. Variación estructural de la comunidad perifítica colonizadora de sustratos artificiales en la zona de ritral del río Medellín, Colombia. Departamento de Biología, Universidad de Antioquia. Apartado 1226, Medellín, Cra 31 N° 28-11, Colombia. Fax: 57-4-233 01 20, yimmymontoya3@hotmail.com 2 jjram@matematicas.udea.edu.co
- MOREIRA, J.A. 1988. Productividad primaria do periphyton em viveiros destinados a piscicultura. Disertação do Mestrado, Univ. Federal de Bahia,Bahía, Brasil. 250 p.
- MOSS, K. R. K. and S. M. Moss. 2004. Effects of artificial substrate and stocking density on the nursery production of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of the World Aquaculture Society 35:536–542.
- OTOSHI, C. A., A. D. Montgomery, E. M. Matsuda and S. M. Moss. 2006. Effects of artificial substrate and water source on grow of juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of the World Aquaculture Society. 37(2):210-213.
- PHILLIPS, P., Russell, A., Bender, J. and Muñoz, R. (1994) Management plan for utilization of a floating microbial mat with its associated detrital

gelatinous layer as a complete tilapia *Oreochromis niloticus* feed system. *Bioresour. Technol.* 47, 239–245.

PIERA Seirra. Gloria. 2002 – 2003. Estudio del Biofilm: Formación y Consecuencia.

RANGEL -Ortiz. Liliana, Gustavo Acosta-Zamora, Mario de Jesús Casimiro-Reyes, María Enriqueta Santamaría-Islas, Sergio Salvador Ramírez-Alcantar y María Teresa Núñez-Cardona. ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS HETERÓTROFAS AISLADAS A PARTIR DE MUESTRAS DE AGUA DE UNO DE LOS CANALES DE XOCHIMILCO .Laboratorio de Ecología Microbiana, Departamento el Hombre y su Ambiente. Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, C. P. 04960. mtnunez@correo.xoc.uam.mx

RIQUELME. Carlos & Avendaño. 2003. Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. I Laboratorio de Ecología Microbiana, Departamento de Acuicultura, Universidad de Antofagasta. Casilla 170, Antofagasta, Chile; e-mail: criquelme@uantof.cl

ROLDAN G. 1992. Fundamentos de Limnología Neotropical. Medellín, Colombia: Editorial Universidad de Antioquia, pág 529. En: Arcos M., Ávila S., Estupiñán S., y Gómez A. 2005. Indicadores Microbiológicos de Contaminación de las Fuentes de Agua. NOVA. Publicación científica issn:1794-2470

RUANGPAN, L. y Kitao, T. (1992). Minimal inhibitory concentration of 19 chemotherapeutants against *Vibrio* bacteria of shrimp, *Penaeus monodon*. In: Proceedings of the First Symposium on Diseases in Asian

Aquaculture. 26-29 November 1990, Bali, Indonesia. Fish Health Section. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. p. 135-142.

SALDARRIAGA, D. 2008. Efecto del perifitón adherido a substratos artificiales sobre el cultivo semi-intensivo de *Penaeus vannamei*. Tumbes – Peru

SALDARRIAGA, D. 1995. Acondicionamiento y manejo de estanques de langostino. Separata instructiva. Tumbes, Perú: Universidad Nacional de Tumbes. Facultad de Ingeniería Pesquera. Departamento Académico de Acuicultura.

S. P. Anthony y R. Philip. 2006 Bioremediación en los sistemas de cultivo de camarón. NAGA, WorldFish Center Quarterly Vol. 29 No. 3 & 4  
rose@cusat.ac.in

SERGEY Dobretsov, Hans-Uwe Dahms & peri-Yuan Qian. 2006. Inhibition of biofouling by marine microorganisms and their metabolites. Taylor & Francis Group. Biofouling 22(1) 43 -54.

SONNENHOLZNER, S., J. Rodríguez, F. Pérez, I. Betancourt, F. Echeverría, and J. Calderón. (2002). Supervivencia y respuesta immune de camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* desafiados por vía oral a WSSV a diferentes temperatures. Boletín El Mundo Acuícola 8(1), 50-56.

SOTOMAYOR María Auxiliadora, José Luis Balcázar. 2003. Inhibición de vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas. Revista AquaTIC, nº 19, pp. 9-15. Año 2003

TACON A.G.J. 2002. Thematic Review of Feeds and Feed Management Practices in Shrimp Aquaculture. Report prepared under the World Bank, NACA,

WWF and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. Work in Progress for Public Discussion. Published by the Consortium. 69 pages.

TAKASHI Asaeda, Duong Hong Son. (2000) Spatial structure and populations of periphyton community: a model and verification. *Ecological Modelling* 133 195 – 207.

THOMPSON, F.L., Abreu, P.C., Wasielesky Jr., W., 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture* 203, 263–278.

TIDWELL, J.H., Coyle, S.D. and Schulmeister, G. (1998) Effects of added substrate on the production and population characteristics of freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* in ponds. *World Aquacult. Soc.* 29, 17–22.

TOBEY, J., J. Clay & P. Vergne. 1998. *Manteniendo un Balance: Impactos Económicos, Ambientales y Sociales del Cultivo de Camarón en Latinoamérica*. Reporte de Manejo Costero No 2202. Proyecto de Manejo Costero II. USAID – Centro de Recursos Costeros de la Universidad de Rhode Island. 68 p.

VANDam,A.A; Beveridge, M.C.M, Azim,M.E, Verdegem.M.C.J. 2002. The potencial of fish production base don periphyton. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 12: 1–31,

VERDEGEM Marc. *AquaFlow Technical Leaflets*. Artículo 363. El potencial de los sistemas de producción basados en el perifiton.

Yoo Kyung Lee, Kae-Kyung Kwon, Kyeong Hee Cho, Hyo Won Kim, Jae Hyun Park, and Hong Kum. Lee\*.2003. Culture and Identification of Bacteria from Marine Biofilms. Microbiology Laboratory, Korea Ocean Research & Development Institute, Ansan, P.O. Box 29, 425-600, Korea. (Received May 17, 2003 / Accepted June 19, 2003.

# ANEXOS

## **Anexo #1.**

### **Detalle del análisis de secuencias de las cepas para determinar su identificación a nivel molecular.**

La secuencia a continuación ilustra el resultado de secuenciación de la cepa 15G en forma de texto:

>080821-03\_A12\_15G-RL71A.ab1 573 0 573 ABI

```
NNNGGAAGAGGGTTATGCATGAGAGCCAGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTC
GGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAAGGGGTGTAGTTAATATCTGCA
TTCTTTGACGTTAGCTACAGAAGAAGCACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGC
GTGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTCGGAA
TTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGAAGAGGAGGGTAGAATTTTCAT
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCG
GCCCCCTGGACTGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGA
GGGCTTGAGCCCTGGCTTGCTGAGCTAACCCGTAAAGTAAACCCCCGGGGA
GGACGGTCCGCAGATTAATAACTCCAAGAAATTGACGGGANNNNNNNNNNNNN
NNN
```

La siguiente cuadro corresponde a los resultados de la comparación entre la secuencia de la cepa 15G y las secuencias que codifica al ARN ribosomal 16S que están registradas en el Gen Bank.

| Accession                  | Description   | Max score           | Total score | Query coverage | E value | Max ident |
|----------------------------|---|---------------------|-------------|----------------|---------|-----------|
| <a href="#">EU155523.1</a> | Vibrio alginolyticus isolate Va412 16S ribosomal RNA (rrs) gene, pa | <a href="#">837</a> | 837         | 96%            | 0.0     | 94%       |
| <a href="#">EU155488.1</a> | Vibrio alginolyticus strain ATCC 17749 16S ribosomal RNA (rrs) qen  | <a href="#">837</a> | 837         | 96%            | 0.0     | 94%       |
| <a href="#">FJ868602.1</a> | Vibrio sp. RAS33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence           | <a href="#">837</a> | 837         | 96%            | 0.0     | 94%       |
| <a href="#">FJ161297.1</a> | Vibrio harveyi strain D6005 16S ribosomal RNA gene, partial sequen  | <a href="#">837</a> | 837         | 96%            | 0.0     | 94%       |
| <a href="#">GQ175919.1</a> | Vibrio rotiferianus strain HDC57 16S ribosomal RNA gene, partial se | <a href="#">837</a> | 837         | 96%            | 0.0     | 94%       |
| <a href="#">FJ984929.1</a> | Vibrio sp. HDP8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence            | <a href="#">837</a> | 837         | 96%            | 0.0     | 94%       |

Secuencia de la cepa 17G en forma de texto:

>080821-03\_I12\_17G-RL71A.ab1 569 0 569 ABI

```

NNNNGGGAGTAGGGCCAGCCTGAGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGC
CTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGGGGCGTCGTTAATAGC
AGCGTCCTTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
GCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTC
GGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATT
TCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAG
GCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGG
TTGAGGCCTTGAGCCCTGGCTTCTGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGG
GGAGTACGGACGCAAGATTAATAACTCAAGAAATTTGACGGGANNNNNNN

```

Los datos que corresponden a los resultados de la comparación entre la secuencia de la cepa 17G y las secuencias que codifica al ARN ribosomal 16S que están registradas en el Gen Bank para el *Vibrio alginolyticus*

| Accession                  | Description   | Max score           | Total score | Query coverage | E value | Max ident |
|----------------------------|---|---------------------|-------------|----------------|---------|-----------|
| <a href="#">EU155489.1</a> | Vibrio alginolyticus isolate Va010 16S ribosomal RNA (rrs) gene, pa | <a href="#">926</a> | 926         | 95%            | 0.0     | 98%       |
| <a href="#">CP001805.1</a> | Vibrio sp. Ex25 chromosome 1, complete sequence                     | <a href="#">926</a> | 9024        | 95%            | 0.0     | 98%       |
| <a href="#">FJ161305.1</a> | Vibrio sp. D6032 16S ribosomal RNA gene, partial sequence           | <a href="#">926</a> | 926         | 95%            | 0.0     | 98%       |
| <a href="#">EU268277.1</a> | Marine bacterium 46hu9(4) 16S ribosomal RNA gene, partial sequer    | <a href="#">926</a> | 926         | 95%            | 0.0     | 98%       |
| <a href="#">EU268251.1</a> | Marine bacterium 20hu4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence     | <a href="#">926</a> | 926         | 95%            | 0.0     | 98%       |
| <a href="#">EU581714.1</a> | Vibrio sp. c52-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence           | <a href="#">926</a> | 926         | 95%            | 0.0     | 98%       |

Secuencia de la cepa 32G en forma textual:

>080718-01\_C21\_32-FC27.ab1 975 0 975 ABI

NNNNGGGCGAGCGCAGCTACCTGCAGTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCT  
TCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGA  
AATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGAAACGATGGCTAATACCGCATG  
ATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTCGCGTCAGGATATGC  
CTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCC  
CTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGACACGGTCCAG  
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGA  
TGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCA  
GTCGTGAGGAAGGCGGCGTCGTTAATAGCGGCGTTGTTTGACGTTAGCGACA  
GAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGC  
GAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAG  
TCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAG  
ACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGT  
AGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTG  
ACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT  
CCACGCCGTANACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTC  
GGAGCTAACCGGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTA  
CTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT  
CGATGNCACGCGAAGAACCTACCCTACTCTGACATCAGA

Los datos que corresponden a los resultados de la comparación entre la secuencia de la cepa 32G y las secuencias que codifica al ARN ribosomal 16S que están registradas en el Gen Bank para el *Vibrio sp.*

| Accession                  | Description   | Max score   | Total score | Query coverage | E value | Max ident |
|----------------------------|---|-------------|-------------|----------------|---------|-----------|
| <a href="#">AB498798.1</a> | Vibrio sp. 8-1 gene for 16S rRNA, partial sequence        | <u>1685</u> | 1685        | 98%            | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">FM878645.1</a> | Uncultured Vibrio sp. partial 16S rRNA gene, clone HG103  | <u>1685</u> | 1685        | 98%            | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">DQ530291.1</a> | Vibrio sp. LAR2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  | <u>1685</u> | 1685        | 98%            | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">AY332398.1</a> | Vibrio sp. LAR1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence | <u>1685</u> | 1685        | 98%            | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">DQ513193.1</a> | Vibrio sp. SI9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence   | <u>1685</u> | 1685        | 98%            | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">AF064637.1</a> | Vibrio sp. NAP-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | <u>1685</u> | 1685        | 98%            | 0.0     | 99%       |

La secuencia a continuación ilustra el resultado de secuenciación de la cepa 76G en forma texto:

```

NNNNGGGACATCGCGGCTATCTGCAGTCGAGCGGACGGATGGGAGCTTGCTC
CCTGAAGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAG
ACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATGCATAACCTCT
CATGAGGTTATGCTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGC
GGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAG
CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA
GCAACGCCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTCAG
GGAAGAACAAGTGCCGGAGTAACTGCCGGCACCTTGACGGTACCTGACCAGA
AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC
GTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTCTTAAGTCTG
ATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTT
GAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
GATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACGC
TGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTANACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCA
GCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCCAGGCTGAAACTC

```

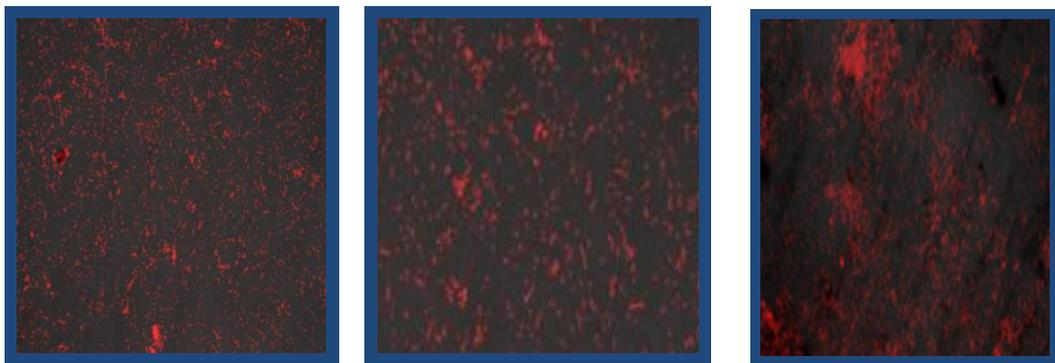
AAAGGAATTTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA  
AGCAACGCGAAGAACCTTTACAGGGTCTGACATCTCCTGACAACCC

Los datos que corresponden a los resultados de la comparación entre la secuencia de la cepa 76G y las secuencias que codifica al ARN ribosomal 16S que están registradas en el Gen Bank para *Bacillus* sp.

| Accession                  | Description   | Max score            | Total score | Query coverage | E value | Max ident |
|----------------------------|---|----------------------|-------------|----------------|---------|-----------|
| <a href="#">FJ791172.1</a> | Bacillus sp. enrichment culture clone O5 16S ribosomal RNA gene, p  | <a href="#">1744</a> | 1744        | 99%            | 0.0     | 98%       |
| <a href="#">GQ249102.1</a> | Bacillus sp. 64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence            | <a href="#">1716</a> | 1716        | 98%            | 0.0     | 98%       |
| <a href="#">AY904032.1</a> | Bacillus infantis strain SMC 4352-1 16S ribosomal RNA gene, partial | <a href="#">1712</a> | 1712        | 97%            | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">GU272368.1</a> | Bacillus sp. TP1MF 16S ribosomal RNA gene, partial sequence         | <a href="#">1711</a> | 1711        | 98%            | 0.0     | 98%       |
| <a href="#">GQ503322.1</a> | Bacillus sp. Ask15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence         | <a href="#">1711</a> | 1711        | 98%            | 0.0     | 98%       |
| <a href="#">DQ448753.1</a> | Bacillus sp. CNJ905 PL04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence   | <a href="#">1711</a> | 1711        | 98%            | 0.0     | 98%       |

## Anexo 2.

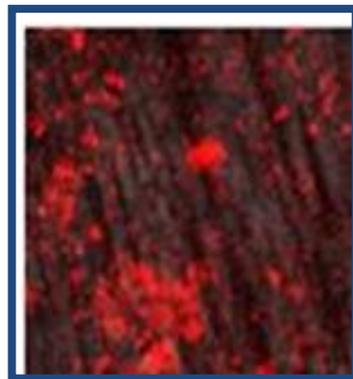
Imágenes de colonización bacteriana en los geotextiles por microscopía confocal: a) Cepa 32 G b) Cepa 76G c) Cepa 17G d) Cepa 6G e) Cepa 15G f) colonización de geotextiles con bacterias 76G después de 0, 6, 12 y 24 horas de someter a prueba ; g) Colonización de bacteria 76G en geotextiles h) Postlarva PL10 donde se observa colonizado parte de tracto digestivo por bacterias



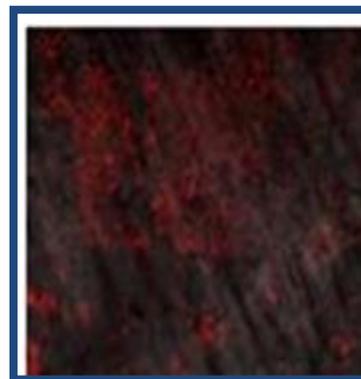
a) Cepa bacteriana 32 G

b) Cepa bacteriana 76 G

c) Cepa bacteriana 17 G



d) Cepa bacteriana 6 G



e) Cepa bacteriana 15 G



0 Horas



6 Horas

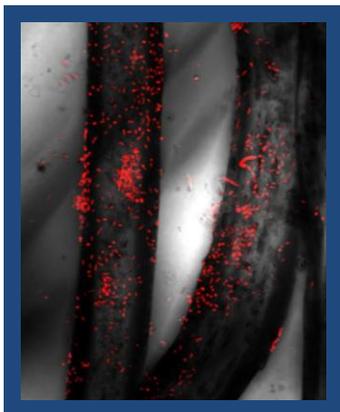


12 Horas



24 Hora

f) Colonización de la Cepa bacteriana 76G en geotextiles a diferentes tiempos de fijación. La coloración roja corresponden a las bacterias adheridas al geotextil



g) Geotextil colonizado con bacteria 76G



h) Intestino colonizado con bacteria 76G

### Anexo 3.

#### Datos de supervivencia peso e incremento semanal de los diferentes tratamientos.

| Tanques | Tratamientos                          | Siembra    | Pesos  | Promedios | Supervivencia | Promedio | Biomasa | Promedio |
|---------|---------------------------------------|------------|--------|-----------|---------------|----------|---------|----------|
| TQ: 7   | <b>T<sub>0</sub>: Control 1</b>       | <b>160</b> | 1,7795 | 1,7823    | 91            |          | 259,10  |          |
| TQ: 5   | <b>T<sub>0</sub>: Control 2</b>       | <b>160</b> | 1,7850 |           | 95            | 93       | 271,32  | 265,21   |
| TQ: 8   | <b>T<sub>1</sub>: Bacteria 32 G 1</b> | <b>160</b> | 2,1456 | 2,1427    | 97            |          | 333,00  |          |
| TQ: 2   | <b>T<sub>1</sub>: Bacteria 32 G 2</b> | <b>160</b> | 2,1398 |           | 100           | 99       | 342,37  | 337,69   |
| TQ: 1   | <b>T<sub>2</sub>: Bacteria 6G 1</b>   | <b>160</b> | 2,1065 | 2,1110    | 100           |          | 337,04  |          |
| TQ: 6   | <b>T<sub>2</sub>: Bacteria 6G 2</b>   | <b>160</b> | 2,1156 |           | 98            | 99       | 331,73  | 334,39   |
| TQ: 3   | <b>T<sub>3</sub>: Bacteria 17G 1</b>  | <b>160</b> | 2,2450 | 2,2502    | 97            |          | 348,42  |          |
| TQ: 9   | <b>T<sub>3</sub>: Bacteria 17G 2</b>  | <b>160</b> | 2,2553 |           | 89            | 93       | 321,15  | 334,79   |
| TQ: 11  | <b>T<sub>4</sub>: Bacteria 15G 1</b>  | <b>160</b> | 2,1759 | 2,1801    | 91            |          | 316,81  |          |
| TQ: 4   | <b>T<sub>4</sub>: Bacteria 15G 2</b>  | <b>160</b> | 2,1843 |           | 91            | 91       | 318,03  | 317,42   |
| TQ: 10  | <b>T<sub>5</sub>: Bacteria 76G 1</b>  | <b>160</b> | 2,2616 | 2,2622    | 98            |          | 354,62  |          |
| TQ: 12  | <b>T<sub>5</sub>: Bacteria 76G 2</b>  | <b>160</b> | 2,2628 |           | 100           | 99       | 362,05  | 358,34   |

