



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**  
**Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar**

**“Efecto de las cepas probióticas P62 (*Vibrio* sp.) y P64  
(*Bacillus* sp.) en un sistema de cultivo del camarón  
*Litopenaeus vannamei*.”**

**Tesis de Grado**

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

**MAGISTER EN CIENCIAS**

**Presentada por:**

**Francisca Aracelly Burgos Valverde**

**Guayaquil – Ecuador**

**2005**

**TESIS ELABORADA CON EL SOPORTE DE:**



**FUNDACIÓN CENAIM-ESPOL**



**COOPERACIÓN TÉCNICA BELGA**



**UNIVERSIDAD DE GANTE  
BÉLGICA**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE LOVAINA – BÉLGICA**

## VITA

Francisca Aracelly Burgos Valverde, hija del Ing. Jaime Francisco Burgos Mora y la Obst. Dolly Valverde Benavides, nació el 20 de Abril de 1977 en la ciudad de Guayaquil, Ecuador. En julio del 2001 se gradúa como Química y Farmacéutica en la Universidad Estatal de Guayaquil. En Agosto del 2003 se gradúa como Dra. en Química y Farmacia en la Universidad Estatal de Guayaquil. Su vida laboral empieza como Analista de Control de Calidad en la Empresa Farmacéutica "ROCNARF". En el 2002 continua como Asesora Técnica en el Departamento de Servicio al Cliente-División Química en la empresa Químico-Farmacéutica MERCK. C. A., continuando como Jefe de Control de Calidad en la empresa "OTELO S.A.", hasta su incorporación en septiembre del 2003 al Programa de Maestría en Ciencias, Especialización Acuicultura Marina de la Escuela Superior Politécnica del Litoral, financiado por la Cooperación Técnica Belga.

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.”

(Reglamento de Exámenes y Títulos Profesionales de la ESPOL).

---

**Francisca Aracelly Burgos Valverde**

## **TRIBUNAL DE TESIS**

---

**Presidente del Tribunal**

---

**Marcelo Muñoz, Ph. D.**

**Director de Tesis**

---

**Enrique Blacio, M. Sc.**

**Miembro del Tribunal**

---

**Ricardo Cedeño, M. Sc.**

**Co-Director de Tesis**

**Miembro del Tribunal**

---

**Bonny Bayot, M. Sc.**

**Miembro del Tribunal**

## **AGRADECIMIENTO**

Al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) y a su Director por haberme brindado la oportunidad de culminar una etapa de desarrollo profesional.

A la Administración General de Cooperación al Desarrollo-Bélgica quien brindó el financiamiento para que éste trabajo fuera posible.

Al Q. F. Walter Herrera, Decano de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Guayaquil y M.Sc. Elva Camba, docente de la misma; por haberme alentado, proporcionado la ayuda y el apoyo para poder desarrollarme como profesional e ingresar al programa de Maestría.

Al Ph.D Marcelo Muñoz por sus acertadas observaciones y colaboración para el desarrollo de mi tesis.

A M.Sc. Ricardo Cedeño por creer y confiar en mí para la realización de mi tesis, incentivar en mí la semilla de la paciencia y perseverancia, guiarme con entereza y constancia por el camino del conocimiento y enriquecerme no sólo como profesional sino como ser humano.

A una amiga que es mi hermana y una hermana que es mi amiga Mariuxi Sotomayor solo tengo una palabra para describirla "Luchadora", fiel creyente de sus convicciones con cualidades morales y humanas únicas, gracias por tu apoyo y siempre contarás con mi más sincera gratitud y amistad.

A la empresa Químico-Farmacéutica MERCK C.A. por la donación de reactivos y materiales de laboratorio para la realización de mi tesis, por intermedio del Q. F. Marcos Nuñez me han extendido una vez mas su apoyo, confianza para el

enriquecimiento y crecimiento profesional permitiéndome subir un escalón más dentro de mis objetivos personales.

A todo el Cuerpo docente del CENAIM, quienes compartieron conmigo sus conocimientos y experiencias, y de manera muy especial a la Ph.D. Laurence Massaut por su muy característica manera de estimularme a seguir y culminar con mis metas.

A todo el personal de Microbiología, Biología Molecular y Genética: Oc. Irma Betancourt, Ing. Ac. Jordan Vivanco, Rosa Malavé, César Gonzabay y Blga. Mariela Lucas por permitirme compartir unos minutos de su vida profesional y personal, apoyándome con la mejor dedicación e ímpetu para culminar este largo camino.

A mis compañeros de maestría: Wilo, Jorge, Orestes, Alejandra, Sulay, Karla y Hector, gracias por enseñarme que no existen diferencias entre los pueblos, culturas o religiones, al final todos compartimos el mismo sueño sólo con diferentes maneras y vías de realizarlos.

A todos mis amigos que desde afuera me estuvieron alentando y dándome apoyo, expresándome en todo momento su cariño y fé en lo que creo y quiero.

A mis compañeras de fórmula Martha, Yessenia y Claudia por estar siempre en los momentos que más necesité y brindarme todo el respaldo de una sincera amistad.

## **DEDICATORIA**

*A los pilares fundamentales de mi vida:*

*Mis dos soldaditos de dulce; Kimberly por enseñarme que no importa lo difícil que sean las pruebas en la vida, con constancia, mucho esfuerzo y voluntad por luchar y salir de las adversidades todo es posible y Christopher por demostrarme que el ser maduro no es cuestión de edad .....que niños más extraordinarios.*

*A mis Padres, por enseñarme a luchar por realizar mis sueños y metas sin desviarme de mis objetivos ni los caminos que los conducen, por muy cansados que estos sean.*

*A mis hermanos Alba y Johann, por que han sido mis compañeros y copilotos durante todo este viaje denominado vivir.*



## INDICE

INDICE DE FIGURAS	XII
INDICE DE TABLAS	XVI
ABREVIATURAS	XVII
RESUMEN	XX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. EL ROL DE LOS MICROORGANISMOS EN LOS SISTEMAS DE CULTIVO EN ACUICULTURA	5
2.1.1. Enfermedades bacterianas	5
2.1.2. Control de enfermedades	7
2.1.2.1 Manipulación de la microflora bacteriana en Acuicultura	9
2.1.3. Probióticos	10
2.1.3.1. Mecanismos de acción de los Probióticos	12
2.1.3.2. El uso de probióticos en Acuicultura	13
2.1.3.3. Género <i>Bacillus</i>	15
2.1.3.4. Género <i>Vibrio</i>	17
2.2. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA.	18
2.2.1. Metodología clásica	20
2.2.1.1. Limitaciones de la Metodología Tradicional	21
2.2.2. Técnicas moléculares	22
2.2.2.1. rRNA ribosómico para el estudio de la evolución microbiana	23
2.2.2.2. Técnicas de análisis de DNA-comunitario parcial	24
2.2.2.3. Aplicaciones de PCR-DGGE en ecología	25
2.2.2.4. Análisis de los patrones de DGGE	29

3. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1. AREA DE ESTUDIO Y UNIDADES EXPERIMENTALES	30
3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL	30
3.3. APLICACIÓN DE PROBIÓTICO EN EL ALIMENTO	31
3.4. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	32
3.4.1. Selección de sitios de muestreo	32
3.5. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	33
3.5.1. Conteo y caracterización morfológica de las colonias	34
3.5.2. Técnicas de identificación bacteriana	34
3.6. ANÁLISIS MOLÉCULAR	35
3.6.1. Extracción de ADN	35
3.6.2. Amplificación (PCR-16s rRNA) del ADN bacteriano	37
3.6.3. Electroforesis en geles de Poliacrilamida con Gradiente Desnaturalizante	39
3.6.4. Análisis de Imagen	40
3.7. PARÁMETROS ABIÓTICOS	40
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	41
4. RESULTADOS	44
4.1. SUPERVIVENCIA Y PESO PROMEDIO	44
4.2. COMUNIDAD BACTERIANA	44
4.3. CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS GRAM-POSITIVOS Y GRAM-NEGATIVOS	49
4.4. CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS EN BASE A CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS	50
4.5. ESTIMACIÓN DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA POR MEDIO DE DGGE	52
4.5.1. Índices de diversidad en muestras de estómago de camarón	52
4.5.2. Índices de diversidad en muestras de sedimento	55
4.5.3. Índices de diversidad en muestras de agua	57

4.6. GELES COMPUESTOS COMO HERRAMIENTA PARA ILUSTRAR SIMILARIDADES ENTRE TRATAMIENTOS	59
4.7. PERFILES DE BANDAS GENERADOS POR PCR-DGGE DE P62 Y P64	62
4.8. ANÁLISIS DE SIMILARIDAD DE LOS PATRONES DE DGGE	63
4.9. PARÁMETROS ABIÓTICOS	66
5. DISCUSIÓN	68
6. CONCLUSIONES	83
7. RECOMENDACIONES	85
8. BIBLIOGRAFÍA	86
ANEXO 1. EXTRACCION DE ADN BACTERIANO	106
ANEXO 2. PURIFICACIÓN DEL ADN BACTERIANO OBTENIDO DE MUESTRAS DE SEDIMENTO	106
ANEXO 3. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	107
ANEXO 4. GELES DE POLIACRILAMIDA CON GRADIENTE DENATURANTE	108
ANEXO 5. TINCIÓN DE PLATA (AgNO <sub>3</sub> )	108
ANEXO 6. Tabla resumen de las transformaciones realizadas sobre cada variable para cumplir con las asunciones de normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (prueba de Levene), durante los análisis de varianza (ANOVA) “Sin Transformación” indica que no hubo necesidad de transformación	109

## INDICE DE FIGURAS

Fig.1. Distribución geográfica del área de estudio. Tomado de: Quevedo, 2005 .....	30
Fig.2. Foto tomada de las piscinas correspondiente al tratamiento control y al tratamiento con Probiótico, Estación Experimental de CENAIM, Palmar.....	31
Fig.3. Gel de Agarosa de muestras de ADN bacteriano amplificado por 16S rRNA-PCR de muestras de estómago de camarón, sedimento y agua. M: Marcador, PS: Probiótico sedimento; CS: Control sedimento; PC: Probiótico camarón; CC: Control camarón; PA: Probiótico agua; CA: Control agua.....	39
Fig.4. Patrones de DGGE de genes de 16S rRNA de bacterias presentes en muestras de estómago de camarón, sedimento y agua. M: Marcador; PS: Probiótico sedimento; CS: Control sedimento; PC: Probiótico camarón; CC: Control camarón; PA: Probiótico agua; CA: Control agua.....	40
Fig.5. Número de UFC.g <sup>-1</sup> (Valores promedios ± desviación estándar) en muestras de estómago de camarón durante el período de adición de probiótico a) Agar Marino y b) Agar TCBS.....	45
Fig.6. Número de UFC.g <sup>-1</sup> (Valores promedios ± desviación estándar) en muestras de sedimento durante el período de adición de probiótico a) Agar Marino y b) Agar TCBS.....	46
Fig.7. Número de UFC.ml <sup>-1</sup> (Valores promedios ± desviación estándar) en muestras de agua durante el período de adición de probiótico. a) Agar Marino y b) Agar TCBS.....	47

- Fig 8. Porcentaje de aislados identificados como Gram-positivos y Gram-negativos en a) Muestras de camarón y b) Muestras de sedimento (Valores promedios  $\pm$  desviación estándar) .....50
- Fig 9. Porcentaje de los géneros *Vibrio*, *Aeromonas* y otros microorganismos Gram-negativos en muestras de estómago camarón. a) Tratamiento Control y b) Tratamiento con Probiótico. \* Otros: Microorganismos Gram-negativos no pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas* o *Vibrio* .....51
- Fig.10. Porcentaje de los géneros *Vibrio*, *Aeromonas* y otros microorganismos Gram-negativos en muestras de sedimento. Tratamiento Control y b) Tratamiento Probiótico. \* Otros: Microorganismos Gram-negativos no pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas* o *Vibrio*.....52
- Fig.11. Índices de diversidad de comunidades bacterianas, Riqueza(S), Shannon-Weaver (H) y Evenness (E) calculados a partir de patrones de bandas generadas por DGGE en muestras de camarón en un sistema de cultivo de *Litopenaeus vannamei*. Tratamiento Control: a, c y e; Tratamiento con Probiótico: b, d y f. (Valores promedios  $\pm$  desviación estándar, escala adimensional) .....54
- Fig.12. Índices de diversidad de comunidades bacterianas, Riqueza (S), Shannon-Weaver (H) y Evenness (E) calculados a partir de patrones de bandas generadas por DGGE en muestras de sedimento marino en un sistema de cultivo de *Litopenaeus vannamei*. Tratamiento Control: a, c y e; Tratamiento con Probiótico: b, d y f. (Valores promedios  $\pm$  desviación estándar, escala adimensional) .....56

- Fig.13. Índices de diversidad de comunidades bacterianas, Riqueza (S), Shannon-Weaver (H) y Evenness (E) calculados a partir de patrones de bandas generadas por DGGE en muestras de agua en un sistema de cultivo de *L. vannamei*. Tratamiento Control: a, c y e; Tratamiento con Probiótico: b, d y f. (Valores promedios  $\pm$  desviación estándar, escala adimensional) .....59
- Fig.14. Gel Compuesto de Muestra de estómago de camarón en Tratamiento Control: 9(1-5),13(1-5),14(1-5) y con Probiótico: 10(1-5),11(1-5),12(1-5) a partir de perfiles de genes de 16S rRNA obtenidos por DGGE durante tiempo de aplicación de probiótico sobre un ciclo de cultivo semi-intensivo de camarón *L.vannamei*.....60
- Fig.15. Gel Compuesto de Muestra de sedimento en Tratamiento Control: 9(1-5),13(1-5),14(1-5) y con Probiótico: 10(1-5),11(1-5),12(1-5) a partir de perfiles de genes de 16S rRNA obtenidos por DGGE durante tiempo de aplicación de probiótico sobre un ciclo de cultivo semi-intensivo de camarón *L.vannamei*.....61
- Fig.16. Gel Compuesto de Muestra de agua en Tratamiento Control: 9(1-5),13(1-5), 14(1-5) y Tratamiento con Probiótico: 10(1-5),11(1-5),12(1-5) a partir de perfiles de genes de 16S rRNA obtenidos por DGGE durante tiempo de aplicación de probiótico sobre un ciclo de cultivo semi-intensivo de camarón *L. vannamei*. Nota: Muestra P11-2 no registrada.....62
- Fig.17. Perfiles generados de secuencias de genes de 16S rRNA de aislados de P62: *Vibrios sp.* y P64:*Bacillus sp.*, M: Marcador; R: Réplica por medio del DGGE.....63

Fig.18. Dendrograma generado a partir de fragmentos de 16S rRNA obtenidos por PCR de muestras de estómago de camarón durante tiempo de aplicación de probiótico sobre un ciclo de cultivo semi-intensivo de camarón *L. vannamei*. Tratamiento control: 9(1-5),13(1-5),14(1-5); Tratamiento con Probiótico: 10 (1-5), (1-5), 12(1-5).....64

Fig.19. Dendrograma generados a partir de fragmentos de 16S rRNA obtenidos por PCR de muestras de sedimento durante tiempo de aplicación de probiótico sobre un ciclo de cultivo semi-intensivo de camarón *L. vannamei*. Tratamiento control: 9(1-5), 13(1-5), 14(1-5); Tratamiento con Probiótico:10(1-5), 11(1-5), 12(1-5).....65

Fig.20. Dendrograma generados a partir de fragmentos de 16S rRNA obtenidos por PCR de muestras de agua durante tiempo de aplicación de probiótico sobre un ciclo de cultivo semi-intensivo de camarón *L. vannamei*. Tratamiento control: 9(1-5), 13(1-5), 14(1-5); Tratamiento con Probiótico:10(1-5), 11(1-5), 12(1-5).....66

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: Condiciones de amplificación para PCR de las muestras de agua, sedimento y camarón.....	38
TABLA 2. Parámetros de producción de cultivo de camarón <i>Litopenaeus vannamei</i> en diferentes tratamientos. Valores son promedios $\pm$ desviación estándar (n=3 piscinas). <sup>a</sup> Datos en la misma fila con diferente superíndice son significativamente diferentes (p<0,05).....	44
TABLA 3. Número promedio Total de UFC ( $\pm$ desviación estándar) evaluadas durante el período experimental en piscinas de cultivo de camarones <i>L. vannamei</i> a través de ANOVA de una vía. Datos en una misma columna con diferente cantidad de superíndice son significativamente diferentes (p<0.05), n=3 piscinas. ....	48
TABLA 4. Valores promedios de parámetros ( $\pm$ desviación estándar) físicos y químicos registrados durante el período de cultivo en agua de las piscinas experimentales.....	67



**ABREVIATURAS**

AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de Plata
AM	Agar Marino
AN	Agar Nutritivo
ANOVA	Análisis de varianza
ARDRA	Análisis de restricción del DNA ribosomal amplificado
bp	Pares de bases
°C	Grados Centígrados
cm	Centímetros
CF	Cytophaga-Flavobacterium
CFB	Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides
CTAB	Cetyl trimethyl ammonium bromide
DGGE	Electroforesis en geles con gradiente denaturante
DNA	Acido desoxirribonucleico
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FISH	Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia
g	Gramo
Ha	Hectárea
KOH	Hidróxido de Potasio
LB	Caldo Luria Bertani
M	Molar
m <sup>2</sup>	Metro cuadrado
ml	mililitro

mg.ml <sup>-1</sup>	miligramos / mililitro
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de Sodio
Na OH	Hidróxido de sodio
Na CO <sub>3</sub>	Carbonato de sodio
NHP	Necrosis Hepatopancreática
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
OD	Oxígeno Disuelto
OF	Oxido – Fermentación
0/129	Agente vibriostático
‰	Salinidad
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction).
pH	Potencial de Hidrógeno
P62	<i>Vibrio</i> sp.
P64	<i>Bacillus</i> sp.
PL49	Post-larva 49
®	Marca registrada
RAPD	Amplificación al azar de fragmentos polimórficos de DNA
RISA	Análisis de los espacios intergénicos ribosomales
RDOM	Materia Orgánica Disuelta Riverina
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto

rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
“S”	Unidad Svedberg
TAE	Tampón tris acetato EDTA
TSA	Triptona Soya Caldo (Tryptic Soy Agar)
TCBS	Agar tiosulfato citrato sales biliares (Thiosulfate Citrate Bile Salts Agar)
TSB	Triptona Soja Caldo (Tryptic Soy Broth)
TGGE	Electroforesis en geles con gradiente de temperatura
T – RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminales
UFC. g <sup>-1</sup>	Unidades Formadoras de Colonias por gramo
UFC. ml <sup>-1</sup>	Unidades Formadoras de Colonias por ml
UV	Ultravioleta
UPGMA	Análisis de Agrupamientos por ligamento promedio
VNC	Viables pero No Cultivables
5S rRNA	Subunidad 5S del RNA ribosómico
16S rRNA	Subunidad 16S del RNA ribosómico
18S rRNA	Subunidad 18S del RNA ribosómico
23S rRNA	Subunidad 23S del RNA ribosómico

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la combinación de las cepas probióticas P62 (*Vibrio* sp.) y P64 (*Bacillus* sp.) en un sistema de cultivo (engorde) de camarón *Litopenaeus vannamei*, así como el poder estudiar su efecto sobre las comunidades bacterianas presentes en muestras de estómago de camarón, sedimento y agua.

Se emplearon seis piscinas de 0.04 Ha, correspondientes a un tratamiento control (n=3) y un tratamiento con probiótico (n=3). Los animales de estadio PL 49 fueron sembrados a una densidad de 29 animales.m<sup>2</sup>, el alimento fue suministrado diariamente a todas las piscinas; con adición de probiótico (pasando un día) en el alimento para las piscinas tratamiento. La frecuencia de alimentación fue de dos veces al día para todas las piscinas. La suspensión de probióticos de concentración 1E+09 UFC.ml<sup>-1</sup> fue adicionada al alimento reportando como concentración final de 3.8E+06 UFC.g<sup>-1</sup> de alimento. Se suministró por un período de 70 días dentro de los 123 días pertenecientes al ciclo de cultivo. Quincenalmente se tomaron muestras de agua, sedimento y camarón para análisis bacteriológicos y moleculares. Los resultados de supervivencia (%) y producción (Kg.Ha<sup>-1</sup>) fue mejor en el tratamiento control, mientras que el Peso promedio corporal (g) y Tasa de crecimiento diario (g.día<sup>-1</sup>) fue mejor en el tratamiento con probiótico, sin embargo estas diferencias no mostraron ser estadísticamente significativas (p>0.05). El estudio de la comunidad bacteriana estimado de las densidades promedios de UFC obtenidas en agua, sedimento y camarón del tratamiento probiótico, mostraron que existió un incremento en el número de UFC en AM en muestras de camarón y una disminución del número de UFC de presuntos vibrios en

TCBS en todas las muestras; sin embargo no mostraron ser estadísticamente significativos. La caracterización de los aislados obtenidos en muestras de estómago de camarón y sedimento revelaron la presencia de microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos dentro de los tratamientos, con predominio de Gram-negativos. Dentro de los grupos aislados en las muestras de sedimento y estómago de camarón encontramos la presencia de los géneros *Vibrio* y *Aeromonas* en ambos tratamientos con una reducción del porcentaje de ambos géneros y un incremento del porcentaje de otros microorganismos Gram-negativos en el tratamiento con probiótico. No se reportó la presencia del género *Pseudomonas* en las muestras de estómago de camarón y sedimento en los tratamientos.

Los perfiles de 16S rRNA obtenidos por DGGE (Gel de electroforesis con gradiente denaturante) empleado para estimar los índices mostraron que la diversidad bacteriana fue diferente entre tratamientos en las muestras de sedimento y estómago de camarón en lo que se refiere a riqueza (R), número y abundancia de especies (H) y homogeneidad (E). El tratamiento con probiótico mostró que las especies bacterianas se distribuyeron en un mayor número de especies y las abundancias fueron más semejantes entre sí (más homogénea). Mientras que el tratamiento control mostró una tendencia de disminución de su diversidad que podría deberse a que algunas especies bacterianas presentaron dominancia, denotando abundancias menos semejantes entre sí (menos homogéneas). Los geles compuestos ilustraron el desplazamiento de especies dentro de la microflora de estómago de camarón que no fue reportada por los índices durante todo el periodo de muestreo

Los dendrogramas que grafican la similaridad entre los perfiles de 16S rRNA y representan la comunidad bacteriana en las muestras de estómago de camarón,

sedimento y agua en ambos tratamientos permitieron determinar que la estructura de la comunidad entre los tratamientos cambió pero la diversidad no fue reducida durante la aplicación del probiótico, observándose las comunidades bacterianas más similares dentro de los tratamientos en las muestras de estómago de camarón. Mientras que en las muestras de sedimento el cambio de la estructura de las comunidades bacterianas es menor comparada con la de estómago de camarón, siendo más similares las comunidades entre tratamientos, mientras que las comunidades en muestras de agua presentan estructuras más similares entre tratamientos, posiblemente por poseer especies filogenéticamente más relacionadas.

La presencia de las cepas probióticas P62-P64 no pudo ser evidenciada dentro del cultivo, debido a que ambas especies generaron más de dos bandas en los perfiles 16S rRNA, requiriéndose para demostrar su presencia de una secuenciación de las bandas obtenidas por el DGGE.

## **1. INTRODUCCIÓN**

Los microorganismos cumplen un rol importante en las piscinas de cultivo, particularmente con respecto a la productividad, ciclo de nutrientes, nutrición de animales cultivados, calidad de agua, control de enfermedades e impacto ambiental sobre los efluentes (Moriarty,1997).

El control de patógenos es un problema en acuicultura, que causa grandes pérdidas de producción a nivel de criaderos y piscinas de engorde, especialmente en sistemas intensivos. Recientes reportes de la FAO citan a las enfermedades como uno de las mayores limitantes en la producción acuícola alrededor del mundo (Nash,1990). Debido a su importancia económica, el manejo de enfermedades en invertebrados acuáticos, es una parte inherente del sistema de producción intensiva de animales, y particularmente en camarones han sido bien descritos (Bachère, 2000; Rodríguez & Le Moullac, 2000).

La modificación y control de comunidades bacterianas podría contribuir a mejorar la supervivencia larvaria y la salud de animales de cultivo en criaderos, incrementando la productividad en engorde y disminuyendo el riesgo de contaminar poblaciones naturales con bacterias resistentes a antibióticos. En acuicultura se ha reportado que la composición bacteriana en tanques, criaderos o grandes piscinas puede ser cambiada por adición de especies seleccionadas que desplazan a las bacterias normalmente presentes (Verschuere *et al.*, 2000).

El uso de probióticos surge como una herramienta de manejo que depende de conocer más acerca de la naturaleza de competición entre especies de bacterias presentes en

ambientes naturales. El éxito en el uso de microorganismos depende de definir los procesos y prácticas ecológicas de manejo a ser cambiadas, de los tipos de especies perjudiciales que son dominantes y especies alternativas deseables de bacterias que podrían ser adicionadas. La exclusión competitiva es uno de los procesos ecológicos que permite la modificación de la composición de especies bacterianas en el agua, sedimento y animales de cultivo (Moriarty, 1999).

En particular, el uso de probióticos ha sido reportado ampliamente en vertebrados (Skjermo & Vadstein, 1999; Gatesoupe, 1999; Verschuere *et al.*, 2000) e invertebrados (Riquelme *et al.*, 1997; Araya *et al.*, 1999; Riquelme *et al.*, 2000).

Los principales grupos de microorganismos utilizados como probióticos en la acuicultura de camarones, ostras y peces han sido obtenidos a partir de aislamiento y selección de cepas de ambientes acuáticos. Entre estos destacan los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Bacillus* y levaduras (Moriarty, 1990; Gómez-Gil *et al.*, 2000).

El rol ecológico exacto de estos grupos en los sistemas de cultivo es desconocido en la actualidad (Gómez-Gil *et al.*, 1998, 2000, 2002). Así también, la influencia del uso de probióticos sobre la microbiota gastrointestinal permanece pobremente descrito (Raskin *et al.*, 1997; Wallner *et al.*, 1997; Hugenholtz *et al.*, 1998).

Los métodos tradicionales, a pesar de ser sencillos, económicos y relativamente rápidos, permiten estimar la diversidad en sistemas de cultivo, pero no ofrecen una visión



representativa de la diversidad microbiana debido a que los medios de cultivo no pueden satisfacer los requerimientos de todos los microorganismos (Ranjard *et al.*, 2000; Kirk *et al.*, 2004).

Ahora es posible estudiar la dinámica de población y factores que afectan el crecimiento tanto de patógenos, organismos deseables, especies dominantes en piscinas y mejorar las prácticas de manejo. Para eso son necesarias técnicas capaces de determinar cuáles especies bacterianas están creciendo a un tiempo dado y cómo la composición de estas especies cambia en un plazo corto como resultado de variaciones en factores controladores como temperatura y concentración de nutrientes.

Las nuevas técnicas en biología molecular hacen ahora posible determinar el crecimiento, la presencia y supervivencia de especies particulares de bacterias en su ambiente, aportando información complementaria a las técnicas clásicas. La electroforesis en geles de gradiente denaturante (DGGE) es una nueva herramienta molecular utilizada en estudios de ecología microbiana basada en el análisis de rRNA bacteriano sin el cultivo de los microorganismos. Esta técnica molecular separa los fragmentos de DNA de doble cadena (de longitudes idénticas) de acuerdo a las propiedades de fusión de cada fragmento.

La DGGE puede ser usada para el análisis de secuencias 16S rRNA amplificadas por PCR, obtenidas de extracciones de DNA de comunidades o mezclas de diferentes aislados bacterianos. Los patrones resultantes son analizados y comparados permitiendo una determinación directa de la diversidad genética bacteriana.

En el futuro, esta técnica puede ser desarrollada como un potencial dispositivo de monitoreo cualitativo de la calidad de agua en sistemas de acuicultura (Rombaut *et al*, 2001). Con el fin de validar el resultado de DGGE, las mismas muestras se deberán rastrear utilizando medios de cultivo convencionales o en medios de aislamiento selectivo (Muyzer & Smalla, 1998).

El objetivo del trabajo fue evaluar la aplicación de la combinación de los aislados probióticos P62 (*Vibrio* sp.) y P64 (*Bacillus* sp.) en la dieta del camarón *Litopenaeus vannamei* durante un ciclo de cultivo (engorde); al mismo tiempo el análisis de las comunidades bacterianas por medio de la técnica de DGGE para detectar la presencia de los probióticos y estudiar su efecto sobre la diversidad de la microbiota bacteriana asociada al sistema de cultivo.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 EL ROL DE LOS MICROORGANISMOS EN LOS SISTEMAS DE CULTIVO EN ACUICULTURA**

En los sistemas de cultivo acuáticos los microorganismos desempeñan múltiples e importantes funciones. Ejercen efectos directos sobre la productividad, nutrición de los animales cultivados, ciclo de nutrientes, calidad de agua, control de enfermedades, y sobre la calidad ambiental de los efluentes, que se encuentran influenciados por diversos factores tales como el sistema de cultivo, especies cultivadas, actividad económica. Este hecho sugiere que el manejo de la actividad de microorganismos sobre mantos alimenticios y ciclo de nutrientes son necesarios para optimizar la productividad (Moriarty, 1997).

Dentro del hábitat de cultivo existen diferentes grupos funcionales de bacterias, todas interactuando juntas (Blackburn,1987; Fry,1987), las cuales se pueden desplazar fácilmente entre habitantes y hospederos. Es recomendable una mejor comprensión de las interacciones microbio-hospederos y de sus defensas naturales para una producción exitosa de animales cultivados (Olafsen, 2001).

#### **2.1.1. Enfermedades bacterianas**

Entre las enfermedades bacterianas que han sido asociadas al cultivo de Litopenaeidos en el Ecuador, podemos mencionar el Síndrome de la Gaviota, Necrosis

Hepatopancreática (NHP), Micobacteriosis, el Síndrome de Bolitas y Síndrome de Zoea (Sotomayor, 2000).

El cultivo con altas densidades de animales en tanques de criaderos y piscinas es un medio propicio para la proliferación de microorganismos, provocando que los animales acuáticos cultivados se encuentran rodeados por un entorno que soporta patógenos oportunistas independientes del animal hospedero, pudiendo estos incrementarse alrededor del animal.

Normalmente, estos microorganismos se encuentran en el agua, sedimento y formando parte de la microflora intestinal de muchas especies acuáticas (Moriarty,1999). Es importante señalar que, los patógenos oportunistas asumen su rasgo patológico en determinadas condiciones ambientales o fisiológicas en que el hospedero se encuentra. De ahí que la microflora de invertebrados marinos y otras especies acuáticas podrían albergar bacterias que son patógenas a otros organismos. También cohabitantes invertebrados u organismos alimenticios en acuicultura podrían servir como vectores para la transferencia de patógenos en peces u otros animales. El contacto con estos agentes invariablemente resultará en una reducción de la capacidad inmunitaria de los animales, provocando así la incidencia de enfermedades (Johnson, 1989).

El establecimiento de patologías infecciosas y no infecciosas asociadas con enfermedades que afectan los cultivos de camarón son atribuidos a una variedad de agentes biológicos y otros como bacterias, hongos, protozoarios, virus, factores nutricionales y ambientales (Lightner, 1992).

Las patologías de origen infeccioso en el cultivo de Litopenaeidos son ocasionados por microorganismos clasificados como oportunistas y/o patógenos que pueden ser saprófitos naturales o heterótrofos en el agua y sedimento. Estos participan en la descomposición de la materia orgánica provocando que la densidad de la población bacteriana se incremente, como ocurre en las piscinas por la abundancia de materia orgánica disponible (Moriarty,1997).

Dentro de los microorganismos oportunistas presentes en los sistemas de cultivo, los vibrios han sido considerados como los principales oportunistas bacterianos para los camarones (Baticados *et al.*, 1990). Moriarty (1999), indica que la producción de camarones en muchos países se ha visto disminuida por enfermedades, particularmente causada por los Vibrios luminiscentes, en especial *Vibrio harveyi*.

Entre las especies de vibrios asociados con enfermedades en el cultivo de camarón, se mencionan entre otros: *Vibrio alginolyticus* (Lightner,1992), *Vibrio parahaemolyticus* (Mohny *et al.*, 1994), *Vibrio harveyi* (Morales,1992) y *Vibrio campbellii* (Hammed,1995)

### **2.1.2. Control de enfermedades**

Las enfermedades son un problema en acuicultura, causando pérdidas de producción cercanas al 100% en criaderos, piscinas de crecimiento y engorde, especialmente en sistema intensivos. Recientes reportes de la FAO, citan a las enfermedades como uno

de los principales limitantes para la producción acuícola alrededor del mundo (Nash, 1990; Moriarty, 1997).

Por el momento, las enfermedades son consideradas el factor limitante en el cultivo de camarón (Link, 1995). Los tratamientos convencionales, como el uso de desinfectantes, drogas antimicrobianas, han demostrado tener éxito limitado en la prevención o cura de enfermedades acuáticas (Subasinghe, 1997).

El énfasis en el manejo de enfermedades debe estar encaminado a la prevención, la cual es una mejor opción costo-efectiva que la cura. Además, una prevención adecuada permite disminuir el uso de químicos (antimicrobianos, desinfectantes, y pesticidas), los cuales largamente tratan los síntomas del problema y no la causa (Pianas & Cunha, 1999)

En acuicultura, incluso cuando la presencia de patógenos no es evidente, se utilizan grandes cantidades de desinfectantes y antibióticos para inhibir bacterias, ejerciendo presión sobre el ambiente microbiano, pudiendo incrementar la aparición natural de resistencia bacteriana con el riesgo de transferencia de patógenos resistentes en los humanos (Moriarty, 1999). Este hecho genera preocupación en ambientalistas, biólogos y gobiernos sobre el uso indiscriminado de antibióticos y otros compuestos químicos.

Así, el control de patógenos requiere de nuevas estrategias, que sean costo-efectivas y ambientalmente seguras. El uso de bacterias benéficas (probióticos) que desplacen los patógenos (por procesos de competición o por la liberación de sustancias inhibitorias)

está acaparando aceptación en la industria animal como una alternativa barata y efectiva para reemplazar a los antibióticos (Moriarty, 1997).

#### 2.1.2.1. Manipulación de la microflora bacteriana en Acuicultura

En los ecosistemas acuáticos, existe una íntima relación entre los microorganismos y los organismos cultivados. La microflora de los sistemas de cultivo difiere dramáticamente de la que se encuentra en el mar, y es influenciada por las técnicas de cultivo, nutrientes, técnicas de desinfección y uso de antibióticos. La manipulación de la población bacteriana y, en particular, la capacidad de controlar el número de patógenos, permitiría mejorar el estado de salud así como la supervivencia larvaria en criaderos. Aumentando la productividad en los sistemas de crecimiento, disminuyendo el riesgo de contaminar poblaciones naturales con bacterias resistentes a antibióticos (Moriarty, 1997).

Para ello conocer la relación precisa entre las bacterias de la columna de agua y aquellas que están creciendo sobre o dentro de los animales. Lo que es esencial para tomar decisiones en procedimientos operacionales y de manejo. Es necesario mayor investigación sobre la naturaleza de las poblaciones bacterianas asociadas con animales acuáticos, tanto en ambientes silvestres como de cultivo.

El uso de bacterias benéficas (probióticos) para desplazar microorganismos por procesos competitivos es una estrategia utilizada por la industria animal como una medida preventiva frente a la administración de antibióticos. Debido a que la mayoría de microbios son transitorios en animales acuáticos, la microbiota intestinal de animales

acuáticos podría cambiar rápidamente con la introducción de bacterias provenientes del agua y del alimento. Así mismo, la microflora bacteriana en los sistemas de cultivo puede también ser modificada por la adición de microorganismos (Moriarty, 1990). Esta particularidad se basa en el principio de exclusión competitiva que permite la modificación de la composición de especies bacterianas en el agua, sedimento e intestinos de animales. La "modificación de la población microbiana", implica el consumo continuo de microorganismos benéficos, puede impedir el establecimiento de microorganismos patógenos, lo que permite que se incrementen las condiciones generales de salud (Guzman, 1992).

Moriarty (1999) indica que la composición de especies microbianas en tanques de cría o grandes piscinas acuícolas puede ser cambiada por la adición de especies bacterianas seleccionadas para desplazar especies nocivas.

### **2.1.3. Probióticos**

El uso de probióticos data desde el siglo pasado, reportado en los trabajos de Metchnikoff en seres humanos, quien sostenía que la ingestión de microorganismos benéficos permitía el control de microorganismos patógenos (Aguirre, 1993).

En la actualidad el término "probiótico" ha sido definido de diversas maneras: Parker (1974), lo define como organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal. Fuller (1989) indica que son suplementos alimenticios microbianos vivos que afectan benéficamente al animal hospedero al mejorar el balance microbiano intestinal.



Según, Havenaar *et al.* (1992) menciona que además un probiótico está compuesto por uno ó una mezcla de microorganismos vivos que aplicados a los animales o al hombre, afectan benéficamente el huésped mejorando las propiedades de la microflora autóctona.

En acuicultura Gatesoupe (1999) considera a los probióticos como células microbianas que son administrados en una manera que les permite ingresar al tracto gastrointestinal y mantenerse vivos, con el objetivo de mejorar la salud, al tener la capacidad de mejorar la calidad del agua y sedimento (Douillet,1998; Gomez *et al.*,1998). Mientras que, Moriarty (1999) indica que la adición de microorganismos vivos a tanques y piscinas modifica la composición de agua y sedimento.

Para Guzmán & Valle (1999) el término probiótico describe a todos aquellos complementos alimenticios a base de microorganismos vivos. Dentro de estos se destacan los productos elaborados con levaduras, bacterias acidificantes, vibrios, microalgas o subproductos provenientes de éstos que pueden ser suministrados en las dietas, directo en el medio y/o al interior del organismo. Sin embargo, los estudios y experiencias que se han obtenido hasta el momento con probióticos, han demostrado que no existe una cepa que pueda cubrir todas las expectativas para solucionar todos los problemas de una especie. Las mezclas de microorganismos han demostrado ser más eficaces y tener mayor potencial comercial cuando son empleados como probióticos en el cultivo de animales (Austin *et al.*, 1995; Douillet & Langdon, 1994; Gatesoupe, 1993).

### 2.1.3.1. Mecanismos de acción de los Probióticos

Entre los diversos criterios que caracterizan los mecanismos de acción de los probióticos en los cultivos acuáticos se mencionan: producción de compuestos inhibitorios, competición por compuestos químicos o energía disponible, competición por sitios de adhesión, incremento de la respuesta inmune, mejora de la calidad del agua, interacción con fitoplancton; fuente de macro y micronutrientes; y contribución enzimática en la digestión.

Varios reportes del uso de probióticos en acuicultura indican que la salud de los animales es mejorada por la remoción o disminución de la densidad de población de patógenos, mejorando la calidad del agua a través de una degradación más rápida de la materia orgánica (Moriarty, 1999).

Irianto & Austin (2002) como también Fuller (1989) señalan que el uso de probióticos podría estimular el apetito, la respuesta inmune celular y/o humoral y mejorar la nutrición por producción de vitaminas, secreción de compuestos antimicrobianos, detoxificación de compuestos en la dieta o por degradación de compuestos indigeribles.

Gullian (2001) estudió el efecto inmunoestimulante de bacterias probióticas asociadas al cultivo de *L. vannamei*, encontrando un índice inmunitario (Rengpipat *et al.*, 2000) mayor en camarones inoculados con *Bacillus* cepa P64 y *V. alginolyticus* cepa III, respecto al tratamiento control.

### 2.1.3.2. El uso de probióticos en Acuicultura

#### ***EN CRUSTÁCEOS***

Entre las bacterias que han sido exitosamente utilizadas como probióticos hoy en día en crustáceos encontramos al género *Vibrio* (Griffith, 1995; Garriques & Arevalo, 1995), *Bacillus* spp. (Moriarty, 1998; Rengpipat *et al.*, 1998) y *Thalassobacter utilis* (Maeda & Liao, 1992). La mayoría de investigadores han aislado esta variedad de probióticos del agua de cultivo de camarón (Nogami & Maeda, 1992; Direkbusarakom *et al.*, 1997; Tanasomwang *et al.*, 1998), o del intestino de diferentes especies de penaeidos (Rengpipat *et al.*, 2000).

En el mismo sentido, Garriques & Arévalo (1995) probaron una cepa de *V. alginolyticus* aislado del agua de mar cerca de un criadero de larvas de *Litopenaeus vannamei* en una prueba de desafío de patogenicidad con *V. parahaemolyticus* por inmersión. Reportaron que no fueron observadas mortalidades en el tratamiento probiótico, mientras que se observó el 100% de mortalidad en el tratamiento control después de 96h de experimentación.

Moriarty (1998) notó un incremento de supervivencia de crustáceos en piscinas donde la variedad de *Bacillus* spp. fue introducida. Mientras que, Maeda & Liao (1992) reportaron que el uso de una bacteria del suelo, codificada como PM-4 promovió el crecimiento de larvas de *Penaeus monodon*, probablemente por actuar como fuente de alimento.

## ***EN PECES***

Austin *et al.* (1995) utilizaron una cepa de *V. alginolyticus* como probiótico en pruebas de desafío con *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* y *Vibrio ordalii* sobre salmón del Atlántico. El experimento reveló que la aplicación del probiótico al salmón Atlántico permitió la reducción en la mortalidad después de la exposición. Mientras que, Queiroz & Boyd (1998) reportaron que el inóculo comercial de *Bacillus* spp. incrementó la supervivencia del bagre de canal. Ambos investigadores prestaron mayor atención a los criterios de calidad de agua, los cuales se vieron pobremente afectados por el tratamiento.

Por otro lado, Robertson *et al.* (2000) aislaron cepas de *Carnobacterium* sp. del intestino de *Salmo salar* y evaluaron su uso como probiótico en el cultivo de salmónes. Estos autores determinaron que después de 14 días de administración se redujo la incidencia de bacterias patógenas como *Aeromona salmonicida*, *V. ordalii* y *Yersinia ruckeri*.

Recientes pruebas *in vitro* han demostrado el efecto antagónico en el cultivo de salmón de la bacteria probiótica *Pseudomonas fluorescens*, cepa AH2 contra *V. anguillarum* (Gram *et al.*, 1999) y *A. salmonicida* (Gram *et al.*, 2001).

Estudios realizados por DeSchrijver & Ollevier (2000) reportaron que la aplicación de *Vibrio proteolyticus* mejoró la digestión de proteínas en peces turbot juveniles cuando fueron administrado por vía oral. Mientras que, Irianto & Austin (2002) reportaron que

aislados de *Aeromona hydrophila* y *Vibrio fluvialis* fueron efectivos en controlar infecciones por *A. salmonicida* en truchas arcoiris.

### ***MOLUSCOS BIVALVOS***

El uso de *Arthrobacter* sp., cepa 77, ha sido reportado como método de control y prevención de infecciones provocadas por *Vibrio splendidus*, *V. alginolyticus* y *A. hydrophila*, en el cultivo de scallop *Argopecten purpuratus* (Riquelme *et al.*, 2000).

Riquelme *et al.*(1997) reportaron que en el cultivo de scallop *A. purpuratus*, la bacteria *Alteromona haloplanktis* y un *Vibrio* (cepa 11), produjeron inhibición del *V. anguillarum*, bacteria patógena asociada a infecciones de larvas de scallops.

#### **2.1.3.3. Género *Bacillus***

Bacterias gram-positivas que se caracterizan por su forma bacilar, dispuestos en forma par o de cadenas, con bordes terminales redondeados o ligeramente curvados. Estos microorganismos son mótils, poseen flagelos peritrichos y pueden ser aeróbicos o anaeróbicos facultativos. Poseen una amplia diversidad de habilidad fisiológica con respecto al calor, pH y salinidad (Bergey, 1994).

El género *Bacillus* se lo encuentra en un amplio rango de hábitats; comúnmente se encuentra en sedimentos marinos de donde es naturalmente ingerido por animales como los camarones que se alimentan dentro o sobre el sedimento. Existen reportes de aislamientos de variedades de *Bacillus* de peces (Hamied *et al.*, 1978; Strom & Olafsen,

1990; Nedoluha & Westhoff, 1995; Sadhukhan *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 1998; Sugita *et al.*, 1998), crustáceos (Austin & Allen, 1982; Sharmita *et al.*, 1996; Sugita *et al.*, 1996; Gomez-Gil *et al.*, 1998), y bivalvos (Sugita *et al.*, 1981).

Pocas especies del género *Bacillus* son patógenas de vertebrados e invertebrados. Tampoco han sido asociados con patologías de organismos acuáticos (Gullian, 2004). Degradan la materia orgánica, facilitan el reciclaje de nutrientes, compiten con otras bacterias, entre ellas las patógenas, por alimento y sustratos y secretan enzimas contra bacterias gram-negativas (Moriarty, 1997; Bergey, 1994).

La ventaja de utilizar la especie *Bacillus* como probiótico en acuicultura se debe principalmente a que no existen reportes de que aportan genes de resistencia antibiótica o virulencia a vibrios o bacterias gram-negativas relacionadas (Rabinowitz & Roberts, 1986). Además sus esporas son fáciles de introducir en alimento seco (Moriarty, 1998; Queiroz & Boyd, 1998; Kennedy *et al.*, 1998; Rengipat *et al.*, 1998; Sugita *et al.*, 1998).

Microorganismos de este género han sido utilizados en el mejoramiento de la calidad de agua por influir sobre la composición de la población bacteriana inicial transportada en el agua y por reducir el número de patógenos que pueden afectar las especies cultivadas (Wang *et al.*, 1999; Irianto & Austin, 2002). Igualmente extractos celulares de *Bacillus subtilis* BT23 demostraron tener un gran efecto inhibitorio contra el crecimiento de *V. harveyi* aislado de *Penaeus monodon*, en pruebas de antagonismo (Vaseeharan & Ramasamy, 2003).

#### 2.1.3.4. Género *Vibrio*

Son bacterias en forma de bacilos rectos o curvos, gram-negativos, mótils con uno o varios flagelos polares, los cuales están encerrados en una vaina continua con una membrana fuera de la pared celular. Son anaeróbicos facultativos, quimoorganotróficos teniendo metabolismo de tipo respiratorio y fermentativo. Su temperatura óptima varía considerablemente entre 20 °C y 30 °C. La mayoría de especies son sensibles al agente vibriestático O/129. Los iones de sodio estimulan el crecimiento de todas las especies y son un requerimiento absoluto de casi todas las especies. Se encuentran en ambientes acuáticos con un amplio rango de salinidades. Son comunes aislados de ambientes marinos y estuarinos, sedimento, plancton (Bergey, 1994).

Existe poco conocimiento acerca de cómo los *Vibrios* interactúan con los organismos acuáticos, sin embargo comúnmente ellos son los miembros mayormente aislados de la microflora "normal" de contenidos intestinales de animales marinos como crustáceos, peces, y otros organismos acuáticos (Colwell, 1984).

Los *Vibrios* forman parte de la microflora normal del camarón *L. vannamei* (Vandenberghe *et al.*, 1999). Moss *et al.* (2000) reportaron que los *Vibrio* y *Aeromonas* componen el 85% (cerca de  $10^9$  UFC.g<sup>-1</sup> de tejido intestinal) de la flora bacteriana en el intestino del camarón. Gomez-Gil *et al.* (1998) encontraron una alta abundancia de *Vibrio* ( $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> y  $10^4$  UFC.ml<sup>-1</sup>), en el hepatopáncreas y hemolinfa de *L. vannamei* saludables respectivamente.

Estudios realizados en flora intestinal de camarones cultivados en piscinas camaroneras en Filipinas reportaron que los tratamientos controles se encuentra usualmente dominados por especies de *Vibrio* sucrosa negativa (verde en agar TCBS), siendo algunos luminiscentes ante la presencia de antibióticos. Mientras que la variedad de *Vibrio* sucrosa positiva (colonias amarillas) fueron frecuentemente utilizados como probióticos en el cultivo (Moriarty, 1998).

Algunas especies son patógenas para los humanos y otras especies lo son para animales invertebrados y vertebrados marinos (Bergey, 1994). El uso de especies del género *Vibrio* es controversial debido a que dentro del género existen especies que han sido asociados a enfermedades del camarón. Sin embargo, en Ecuador el *V. alginolyticus* ha sido asociado con larvas y camarones juveniles saludables y enfermos (Vandenberghe *et al.*, 1999). La cepa Variedad ILI (*V. alginolyticus*) ha sido usado rutinariamente en los criaderos del CENAIM desde 1999, para prevenir enfermedades infecciosas relacionadas con el *V. harveyi* (Zherdmant *et al.*, 1997; Gullian, 2004).

## 2.2. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA.

Los estudios de diversidad bacteriana difieren entre ellos en el procedimiento de obtener los aislados, modos de caracterización, métodos de agrupamiento empleados para identificar niveles taxonómicos, el nivel de similitudes o distancias usadas para definir una especie o biotipo, y la medida de diversidad usada (Watve & Gangal, 1996). Los métodos clásicos de microbiología, especialmente el conteo de colonias bacterianas en agares ricos en nutrientes, fueron diseñados para aislar o contar bacterias



particularmente patógenas. Las estrategias cultivo-dependientes podrían subestimar la riqueza en las muestras, la cual es mejor estimada por métodos cultivo-independientes. En la actualidad se han producido avances en ecología microbiana con el desarrollo de nuevos métodos de análisis para estudiar microorganismos acuáticos y sus actividades. Este hecho permite demostrar que las bacterias son en cualquier ambiente acuático de 10 a 10000 veces más numerosas, en relación con lo que las técnicas microbiológicas tradicionales demuestran (Moriarty, 1997).

Los métodos independientes de cultivo suministran un cuadro más exacto de la riqueza de comunidades bacterianas en comparación con los métodos dependientes de cultivo. Estos métodos evitan la presión de selección impuesta por los requerimientos del último para el crecimiento en un sustrato sólido (Amann *et al.*, 1995; Brock, 1987; Staley & Konopka, 1985).

Varios estudios proveen información sobre la diversidad bacteriana, abundancia de especies y variación estacional en la composición de las comunidades bacterianas. Sin embargo, a pesar de que las técnicas moleculares dependientes del ADN evitan los errores implicados en el aislamiento de bacterias sobre medios de cultivo, los métodos independientes de cultivo no son capaces de detectar diferencias en actividad celular.

Moriarty (1997) enuncia que los métodos moléculares han permitido a los ecólogos microbianos estudiar las funciones de grupos de bacterias en su ambiente natural. Kisand & Wikner (2003) utilizaron la combinación de tres métodos para analizar la diversidad de la comunidad natural microbiana para maximizar un estimado de la

riqueza de bacterioplancton descomponedor de materia orgánica fluvial disuelta (RDOM). Estos autores evaluaron la habilidad de la cuantificación de la hibridación DNA-DNA cultivo dependiente, librería de genes clonados de 16S rRNA, y electroforesis de geles de gradiente denaturante (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis o DGGE) para detectar la taxa bacterial en la misma muestra. Ellos establecieron que los diferentes métodos utilizados mostraron similar distribución de la taxa a nivel genético. Sin embargo la competición a nivel de las especies entre los métodos fue pobre, y solo una especie fue identificada por los tres métodos.

### **2.2.1. Metodología clásica**

Kirk *et al.* (2004) indica que los métodos tradicionales son ventajosos en su manejo por ser sencillos y económicos, ya que permiten estimar la diversidad bacteriana en sistemas de cultivo mediante conteos directos o cultivo de bacterias viables en placas.

#### **Siembra y Aislamiento en placa**

Carrasco (2004) indica que para estudiar las bacterias es necesario que sean cultivadas en un medio ya sea líquido ó sólido. Los medios de cultivo contienen distintos nutrientes que van desde azúcares simples hasta sustancias complejas como la sangre o el extracto de caldo de carne. Para aislar o purificar una especie bacteriana a partir de una muestra formada por muchos tipos de bacterias, se siembra en un medio de cultivo sólido donde las células que se multiplican no cambian de localización. Tras muchos ciclos reproductivos, cada bacteria individual genera por fisión binaria una colonia macroscópica compuesta por millones de células similares a la original. Si esta colonia

individual se siembra en un nuevo medio crecerá como cultivo puro de un solo tipo de bacteria.

Muchas especies bacterianas son parecidas morfológicamente, por lo que es imposible diferenciarlas con el uso del microscópio; en este caso, para identificar cada tipo de bacteria, se estudian sus características bioquímicas sembrándolas en medios de cultivo especiales. Así, algunos medios contienen productos que inhiben el crecimiento de la mayoría de las especies bacterianas, pero no la del tipo en estudio. Entre los métodos primarios más comunes tenemos: la tinción de Gram, morfología, catalasa, oxidasa, OF (Oxido – Fermentación), crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis y motilidad. Entre los métodos secundarios y terciarios (a partir de la propiedad de secreción enzimática y de producción de metabolitos) tenemos: producción de pigmentos, producción de indol a partir de triptófano, producción de coagulasa, de fenilalanina, de amilasa, etc (Castro, 1989).

#### 2.2.1.1. Limitaciones de Metodología Tradicional

A pesar de que se sabe que un gran porcentaje del balance total de la biósfera depende de los microorganismos, sólo se conocía alrededor de un 1% del total (Roszak *et al.*, 1987; Torsvik *et al.*, 1990). Esto se debía a las deficiencias que propiciaban los estudios basados en métodos tradicionales que estudiaban los caracteres morfológicos, fisiológicos (necesidad de nutrientes) y estructurales (diferencia entre lípidos de membranas). Para todos ellos era pre-requisito esencial el cultivo, pero los medios

actuales no permitían aislar más que una mínima parte de los microorganismos existentes.

A partir de la identificación basada en cultivos en medios sólidos o líquidos, se obtiene información valiosa; sin embargo, la formación de colonias por microorganismos es dependiente de las condiciones disponibles para el crecimiento, como nutrientes y temperatura de incubación. Adicionalmente es conocido que algunos de los microorganismos acuáticos no pueden ser cultivados bajo condiciones convencionales. Estos organismos entran en un estado fisiológico alterado en el que son viables pero no cultivables (VNC) (Roszack & Colwell, 2002).

### 2.2.2. Técnicas moléculares

Actualmente la microbiología ambiental se encuentra en una nueva era, donde gran cantidad de información es generada con el uso de nuevos métodos en biología molecular para la caracterización de microorganismos. Hoy en día, las técnicas que emplean ADN nos ayudan a superar los problemas reportados con la metodología tradicional y clasificar a los organismos de un modo más adecuado, de acuerdo a su filogenia. Estos estudios podemos hacerlos conociendo la secuencia total de nucleótidos del genoma del microorganismo, o regiones parciales en estudios del rRNA 16S o 18S, debido a que son secuencias que se han mantenido bastante uniformes a lo largo de la evolución, ayudando a trazar la historia natural de los microorganismos, constituyendo la auténtica unidad en la que puede basarse la sistemática evolutiva bacteriana (Woese *et al.*, 1990; Pace, 1997).

### 2.2.2.1. rRNA Ribosómico para el estudio de la evolución microbiana

Los rRNA ribosómicos están entre las macromoléculas mejor conservadas desde el punto de vista evolutivo en todos los sistemas vivos. Los genes del RNA ribosómico en todos los organismos actuales comparten un ancestro común, y no parecen haber sido objeto de transferencia genética lateral entre especies (Rodicio & Mendoza, 2004).

Inicialmente se realizaron estudios de secuenciación del 16S rRNA. Posteriormente los estudios se extendieron al 23S rRNA. Continuando con la secuenciación completa del 5S rRNA que debido a su pequeño tamaño, es más rápida y económica que las anteriores (Rodicio & Mendoza, 2004).

Los rRNA 16S y 18S son unos excelentes cronómetros moleculares debido a que: (1) se encuentran universalmente en todos los organismos; (2) poseen grandes regiones muy conservadas, útiles para establecer relaciones filogenéticas lejanas; (3) presentan suficientes regiones variables para evaluar relaciones próximas; y (4) no son susceptibles de cambios de secuencia rápidos por selección, dada su función central en la expresión genética (Rodicio & Mendoza, 2004). Así, debido a lo necesario de sus funciones, se han conservado bien extensas regiones de los genes del rRNA y sus secuencias pueden utilizarse para medir distancias filogenéticas, incluso entre organismos que tienen poca relación entre sí.

#### 2.2.2.2. Técnicas de análisis de DNA-comunitario parcial

El análisis de DNA parcial de una comunidad usualmente se enfoca en secuencias del genoma que son marcados y amplificados por PCR, mientras que las técnica de DNA-comunitario total tratan de investigar toda la información genética en el DNA extraído.

#### Clonación y caracterización de fragmentos de PCR

Se utiliza para investigar la diversidad de comunidades bacterianas al producir una librería de clones de secuencias rrs (genes de 16S rDNA) obtenidas por PCR de extractos de DNA. El producto clonado se lo emplea para separar las secuencias pudiendo ser caracterizadas individualmente utilizando PCR/RFLP (Reacción en cadena de polimerasa / Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción).

#### Técnicas de huellas genéticas "fingerprintings"

Estas se basan en amplificaciones por PCR pero no requiere librería de clones. Su principio es fragmentar en partes la diversidad de secuencias amplificadas claramente por migración en geles de electroforesis o geles de poliacrilamida, separándolos en base a sus tamaños; entre ellos tenemos ARDRA (Análisis de restricción del DNA ribosomal amplificado), T-RFLP (Terminal-RFLP), RISA (Análisis de los espacios intergénicos ribosomales), RAPD (Amplificación al azar de fragmentos polimórficos del DNA) o secuencia (DGGE, TGGE) (Ranjard,et al.,2000).

### Separación electroforética usando gradiente desnaturizante

Este método es usado para separar fragmentos de DNA de un mismo tamaño pero diferentes secuencias (Muyzer *et al.*, 1993). Este involucra la separación del producto amplificado en geles de poliacrilamida conteniendo un gradiente lineal de agente desnaturizante. Este agente desnaturizante puede ser químico (urea o formamida), como es el caso del DGGE, o podría ser un factor físico como la temperatura, en cuyo caso la técnica se denomina TGGE (Muyzer *et al.*, 1993; Felske *et al.*, 1998). La ventaja de esta técnica es que permite la determinación directa de la diversidad genética de una población de bacterias presentes en una muestra ( Rombaut *et al.*, 2001; Casamayor *et al.*, 2000).

#### 2.2.2.3. Aplicaciones de PCR-DGGE en Ecología

##### Herramienta de monitoreo para evaluar calidad del agua

Con ayuda del DGGE se puede realizar controles de calidad en agua. Así, Kawai *et al.*, (2002) analizaron la comunidad bacteriana en agua depurada, utilizada en procesos de manufactura farmacéutica. Los patrones de banda PCR-DGGE fueron significativamente más bajos que los encontrados en ambientes acuáticos, siendo los *Bradyrhizobium* sp., *Xanthomonas* sp. y *Stenotrophomonas* sp., los géneros más frecuentes.

DeWettinck *et al.* (2001) con ayuda de PCR-DGGE compararon las huellas genéticas de muestras de agua mineral y de agua subterránea determinando la presencia de bacterias

viales pero no cultivables en estas aguas. El dendrograma de cluster obtenido indicó que cada tipo de agua fue caracterizado por un perfil específico, cada clase de agua formó un solo cluster.

Los fragmentos 16S rRNA obtenidos por PCR-DGGE han sido usados para estudiar poblaciones microbianas en diferentes clases de lagos de agua dulce (Casamayor *et al.*, 2000; Lindstrom, 1998; Zwart *et al.*, 1998) y en diferentes hábitat de aguas subterráneas (Kilb *et al.*, 1998). Riemann & Winding (2001) estudiaron la dinámica de una comunidad bacteriana por 19 días dentro de dos mesocosmos de agua dulce. Con ayuda del 16S rDNA amplificado por PCR, demostraron que casi todas las secuencias de bandas de bacterias presentes en el gel de DGGE fueron relacionados a grupos comúnmente encontrados en agua dulce:  $\alpha$ -Proteobacteria, CF (Cytophaga-Flavobacterium).

#### Herramienta en Ecología Microbiana Marina

El gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) es un método usado en ecología microbiana para evaluar la estructura de comunidades bacterianas en muestras ambientales, en particular agrupaciones bacterianas en ecosistemas marinos (Moeseneder *et al.*, 1999; Murray *et al.*, 1996; Riemann, *et al.*, 1999; Schauer, *et al.*, 2003; Muyzer & Smalla, 1998).

Ferrari & Hollibaugh (1999) realizaron un estudio para analizar la variación espacial en la diversidad del bacterioplancton de muestras de diferentes estaciones del Océano



Ártico. El resultado del análisis permitió la agrupación en cinco grupos mayores con un 80% de similaridad, por análisis de regresión de similaridades de la curva densitométrica derivada de los patrones de DGGE.

Rosello-Mora *et al.*(1999) investigaron la respuesta de la comunidad microbiana de sedimentos marinos con ayuda de FISH y DGGE. Los autores concluyeron que el grupo CFB (*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*) juega un importante rol en la descomposición de materia orgánica, y sugieren que este grupo es el posible responsable de la hidrólisis de macromoléculas y fermentación.

Rombaut *et al.* (2001) realizaron estudios de huellas genéticas con ayuda de gel de electroforesis de gradiente desnaturalizante (DGGE) de la microbiota en agua de cultivo de dos sistemas de cultivo de rotíferos (*Brachionus plicatilis*, lote versus recirculación). El perfil genético de la comunidad bacteriana presente en el agua de cultivo de lote cambió diariamente debido a cambios a nivel de dominancia de bandas; mientras que en el sistema de recirculación fue menos susceptible a variaciones relativas a la microbiota.

Castle & Kirchman (2004) compararon los resultados de dos técnicas de cultivo independientes como son el DGGE y FISH en estudios de composición de comunidades microbianas en aguas estuarinas de Delaware y en Bahía de Chesapeake (EEUU). Estos análisis demostraron que el 64% de todas las comparaciones identificaron los mismos grupos como dominantes, y ambos métodos revelaron

cambios sistemáticos en la estructura de comunidades bacterianas en gradientes estuarinos.

### Herramientas para el control en la producción de probióticos

Los análisis de la mayoría de productos probióticos aún están basados en métodos cultivo-dependientes que involucran el uso de medios específicos de aislamiento e identificación de un limitado número de aislados. Este hecho hace de esta una actividad muy laboriosa y consumidora de tiempo.

Pintado *et al.* (2003) emplearon el DGGE para cuantificar y perfilar mezclas de cultivo definido de bacterias ácido lácticas durante la producción de probióticos a partir de un complejo de polisacáridos. Temmerman *et al.*(2003) realizaron el estudio de 10 productos probióticos, incluyendo cuatro productos diarios, una bebida de frutas, y cinco productos secos congelados que fueron sujetos a análisis microbiológicos usando metodología cultivo-independiente. Los resultados fueron comparados con resultados de análisis convencionales cultivo-dependientes. El patrón de bandas de DGGE obtenido permitió la identificación directa de los productos amplificados, encontrándose una mayor sensibilidad para la detección de variedades microbianas en productos probióticos, siendo el proceso rápido, confiables y reproducible en relación con los resultados cultivo-dependientes.

#### 2.2.2.4. Análisis de los patrones de DGGE

Los sistemas de análisis de imagen modernos han mostrado ser de valor para los análisis de bandas de DGGE y sus patrones de asociación. Se puede extraer información como el número de bandas de ADN que representan especies o individuos presentes en una comunidad. La posición (ausencia o presencia de bandas particulares) e intensidad relativa de las bandas han facilitado el cálculo de coeficientes de similaridad para describir relaciones entre comunidades. Adicionalmente, el uso de índices de diversidad comunes como herramientas importantes para tratar de comprender la estructura de una comunidad, incorporan el número de bandas obtenidas en la electroforesis lo que suministra más información acerca de la composición de una comunidad estudiada (*fide Sigler et al.*, 2004).

Los indicadores de Simpson y los indicadores de Shannon (más utilizados por ecólogos de plantas y animales), suministran el suficiente peso para la abundancia relativa de acuerdo a la riqueza de especies pero fallan al considerar las distancias taxonómicas entre especies, individuos, o cualquier otra categoría dentro de una comunidad (género, familia, etc).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. AREA DE ESTUDIO Y UNIDADES EXPERIMENTALES: El trabajo de investigación se llevó a cabo en seis piscinas de cultivo semi-intensivo de 0.04 Ha ubicadas en el sector A de la Estación Experimental de CENAIM (Fig.1), localizada en la localidad de Palmar, Península de Santa Elena, Ecuador.

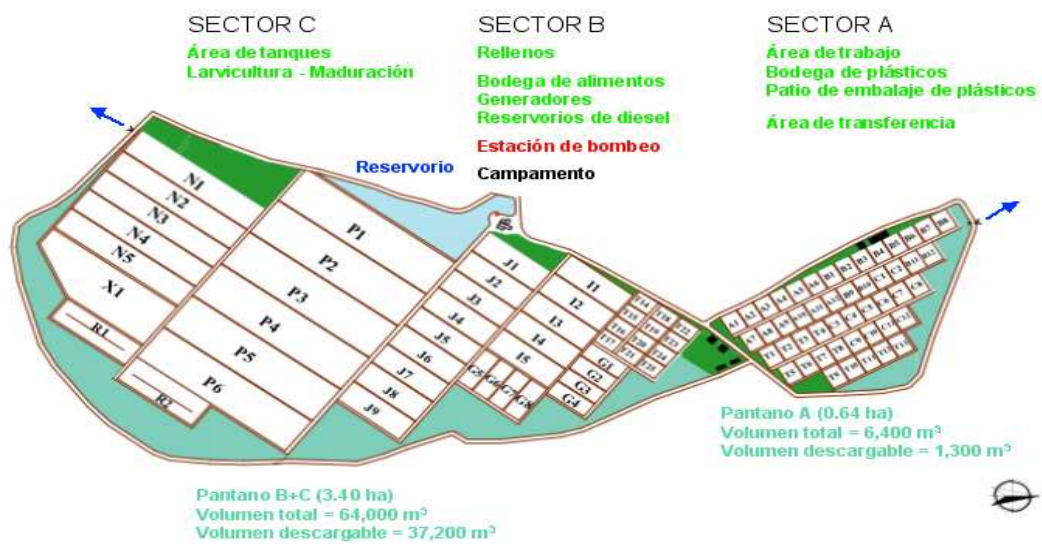


Fig.1. Distribución geográfica del área de estudio. Tomado de: Quevedo, 2005.

### 3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental fue completamente aleatorio. Correspondió a un tratamiento control correspondiente a las piscinas # 9, 13, 14 y un tratamiento con probiótico correspondiente a las piscinas # 10, 11, 12 (Fig.2). Durante un período de cuatro meses (un ciclo de cultivo, engorde) dentro del cual la adición de probiótico se realizó durante 70 días.

Los animales de estadio PL 49 fueron sembrados a una densidad de 29 animales/m<sup>2</sup>. El probiótico se proporcionó en el alimento en forma alternada (pasando un día) en las piscinas tratamiento. La adición del probiótico en el alimento se suspendió 15 días antes de la cosecha.

El alimento se distribuyó al voleo a cinco metros de las orillas de las piscinas dos veces al día (9H00 y 15H00 ). La tasa de alimentación se mantuvo en un rango de 3.5-2% sobre su biomasa durante todo el experimento, según el programa de alimentación establecido por el CENAIM .



Fig. 2. Foto tomada de las piscinas correspondientes al tratamiento Control y al tratamiento con Probiótico. Estación Experimental de CENAIM, Palmar.

### 3.3. APLICACIÓN DE PROBIÓTICOS EN ALIMENTO

Los recipientes que contenían las suspensiones bacterianas *Vibrio* P62 y *Bacillus* P64 a una concentración inicial de  $1 \times 10^9$  fueron descongelados 30 minutos previo a la adición en el alimento. Preparándose posteriormente 100 ml de solución que contenía

una relación de: 10 ml de P62, 10 ml P64 y 80 ml de agua de mar filtrada por cada Kilogramo de alimento, reportándose  $3.8 \times 10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> de alimento. Adicionalmente, se aplicó al alimento un recubrimiento de aceite de pescado (tratamiento y control), para ello se empleó 50 ml de aceite de pescado por cada Kilogramo de alimento.

### 3.4. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

#### 3.4.1. Selección de sitios de muestreo

Se establecieron cinco puntos representativos dentro de las piscinas control y probiótico, recolectándose quincenalmente 5 muestras por piscina, las cuales fueron homogeneizadas, resultando en una muestra por piscina por día de muestreo.

En cada punto para la recolección de muestras el procedimiento fue el siguiente:

**MUESTRA DE AGUA:** La muestra fue tomada a media columna de agua, utilizando frascos estériles de 500 ml y transportadas en frío hasta su procesamiento en el laboratorio.

**MUESTRA DE SEDIMENTO:** Para la toma de muestras de sedimento se utilizó un tubo de PVC (corer) estéril, el cual fue introducido a una profundidad de 5 cm del suelo de la piscina. Las muestras fueron colocadas en fundas plásticas y homogeneizadas dando origen a una muestra por piscina para luego ser transportadas en frío hasta el laboratorio para su procesamiento.

MUESTRA DE ANIMAL: Se tomó muestras a partir de animales de 1g de peso, cada muestra contenía de 15 animales por piscina. Los animales fueron recolectados en recipientes plásticos, provistos de agua de la piscina y transportados en frío hasta su posterior tratamiento en el laboratorio.

### 3.5. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Las siembras de muestras de sedimento, camarón y agua se realizaron siguiendo la metodología tradicional por el método directo (barrido) según Manual de Díaz *et al.* (2000).

Para las muestras de sedimento se pesó 10 g de muestra en un frasco estéril que contenía 90 ml de solución salina estéril (2%), empleando diluciones sucesivas en una relación 1:10 y sembrando 100 uL de estas diluciones en Agar Marino (AM) ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ) y Agar Thiosulfato Citrato Sales Biliares (TCBS) ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ).

Para las muestras de agua se realizó siembra directa y diluciones sucesivas ( $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ ) en una relación 1:10 en tubos de ensayo, y sembrando 100 uL de estas diluciones en AM y TCBS.

Para las muestras de camarón, se sembró una mezcla de 1 gramo de muestras de estómagos macerados de cada tratamiento por piscinas, en diluciones de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  para agar AM;  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  para agar TCBS.

Las placas fueron incubadas a 30 °C (Incubadora Controller, Model SI 450 Sibata Scientific Technology LTD) por 24 horas para las muestras de agua y camarón, 48 horas para las muestras de sedimento.

### **3.5.1. Conteo y caracterización morfológica de las colonias**

Con la ayuda del contador de colonias (IUCHI, Digital Colony Counter DC-3), se realizó el conteo total de UFC presentes en cada placa para muestras de agua, camarón y sedimento, respectivamente, siguiendo el criterio de Bonde (1977).

La identificación morfológica y el aislamiento de cepas bacterianas se realizó en base a características morfológicas presentadas en el Manual de Norrell & Mesley (1997). Las colonias seleccionadas fueron aisladas siguiendo el método de siembra por estrías, en placas de agar TSA (Agar Tripticasa Soya) al 1% de NaCl y en AM aquellas colonias que no crecieron en agar TSA.

Las cajas fueron incubadas a 30 °C por 24 horas. Para su preservación, los aislados fueron resuspendidos en Caldo Trípico de Soya (TSB) suplementado con 20% de glicerol antes de ser almacenadas a -80 °C.

### **3.5.2. Técnicas de identificación bacteriana**

Se aislaron un total de 350 cepas durante los cinco muestreos realizados en el período de 70 días de adición de probiótico, de las cuales 166 fueron provenientes de camarón y



184 de sedimento. La identificación de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas se realizó por el método de Ryuss, según el protocolo descrito en Castro (1989). Para aquellas colonias de difícil caracterización por este método se realizó la tinción de Gram, según el protocolo del manual práctico de Bacteriología Marina (Castro, 1989). Para la identificación de los aislados como *Vibrios* se utilizó desoxicolato de Sodio (0.5%), para la prueba del hilo mucoso o prueba de la hebra. Esta técnica los diferencia de otros bacilos gram-negativos particularmente de *Aeromonas* (Métodos de Laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio Cholerae*, OPS-CDC, 1994).

Para la identificación de los aislados como *Pseudomonas* y *Aeromonas* se usó los medios de cultivo Agar para *Pseudomonas* P y Agar Cetrimide (Manual de Microbiología de Merck C.A., 2000).

### 3.6. ANÁLISIS MOLÉCULAR

#### 3.6.1. Extracción de ADN

El ADN total bacteriano extraído de muestras de sedimento, agua y estómago de camarón fueron obtenidos siguiendo el método descrito por Smalla *et al.*, (1993); utilizando CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) al 20% – Fenol – Cloroformo para la extracción y purificación e Isopropanol para la precipitación. Las condiciones de extracción se muestran en el Anexo # 1.

Para la extracción del ácido nucleico del agua, fueron centrifugados 2000 ml de muestra a 1100 g. El residuo obtenido fue resuspendido con 2 ml de agua destilada doblemente

filtrada estéril y separados en microtubos de 1,5 ml a razón de 500  $\mu$ l de muestra en cada tubo y almacenado a - 20°C.

Las muestras fueron centrifugadas a 17000 g por 10 minutos. Se removió el sobrenadante, y se adicionó 500  $\mu$ l de tampón CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide), 4  $\mu$ l de Proteinasa K (Invitrogen®) (concentración final 20 mg. ml<sup>-1</sup>). Se agitó y se llevó a “baño maría” a 55°C por 2 horas. Posteriormente, se aplicó el mismo protocolo empleado para la extracción de sedimento y camarón, a partir de la adición de fenol – cloroformo cuyas condiciones se muestran en el Anexo # 1.

Para las muestras de sedimento se realizó en primer lugar una lisis mecánica. Para ello se colocó en microtubos estériles de 1.5 ml, 0,5-1 g de perlas de vidrio o perlas de cerámica Magna Lyser Green Beads (Roche®), agregando posteriormente 0,5-1 g. de suelo, 500  $\mu$ l de tampón CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) y 10 $\mu$ l de lizozima (concentración final 50 mg. ml<sup>-1</sup>). Se homogenizó por 2 minutos (para ayudar a la lisis celular) y se incubó en “baño maría” a 37 °C por 45 minutos. Se agregó 10  $\mu$ l de Proteinasa K (Invitrogen®) (concentración final 20 mg. ml<sup>-1</sup>) y se homogeneizó agitando mecánicamente por 1 minuto, incubado a 55-60°C por 1 hora ó a 37 °C durante 12 horas usando “baño maría”. Una vez enfriadas las muestras a temperatura ambiente, se centrifugaron a 17000 g por 10 minutos, separando posteriormente 1 ml de sobrenadante en microtubos de 1.5 ml estériles. Posteriormente, se siguió el mismo protocolo empleado para la extracción de agua y camarón, a partir de la adición de phenol – cloroformo, cuyas condiciones se muestra en el Anexo # 1.

El ADN bacteriano extraído del sedimento fue purificado siguiendo el método descrito por Smit *et al.*, (1997). Para obtener un ADN de mejor calidad y libre de impurezas, como ácidos húmicos que pueden inhibir la amplificación posterior, se utilizó un Sistema de Purificación basado en columnas (Wizard® PCR Preps DNA Purification System) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, ver Anexo # 2.

Para ADN bacteriano extraído del estómago de camarón, se colocaron 2 órganos en microtubos por piscina, se adicionó 500µl CTAB y 4 µl de Proteinasa k y se llevó a “baño maría” a 55-60°C por 1 hora, para posteriormente, macerarlos y dejarlos a 37 °C durante 12 horas. Una vez enfrías las muestras a temperatura ambiente, se centrifugaron a 17000 g por 10 minutos, separando posteriormente 1 ml de sobrenadante en microtubos de 1.5 ml estériles autoclavados y secos. Posteriormente, se siguió el mismo protocolo empleado para la extracción de agua y sedimento, a partir de la adición de fenol – cloroformo cuyas condiciones se muestran en el Anexo # 1.

La concentración de ácidos nucleicos fue determinada mediante espectrofotometría a una absorbancia de 260 nm, utilizando para ello un equipo Bio Photometer Eppendorf®. Una vez determinada la concentración del ADN, este fué almacenado a - 20°C hasta su uso posterior

### **3.6.2. Amplificación (PCR-16S rRNA) del ADN bacteriano**

Las amplificaciones por PCR–16 S rRNA fueron realizadas por el método descrito por Schaefer & Muyzer, (2001). Las muestras de ADN bacteriano extraídos a partir de las

muestras de agua, suelo y estómago del camarón fueron amplificadas por PCR- DGGE utilizando 2 ul de ADN (60 ng.uL<sup>-1</sup>), 0.375 μM de los iniciadores PRBA-338-F-GC (5'CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') y 518R-1(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') complementarios de la región conservada 16S rDNA, 2.1 mM de Mg Cl<sub>2</sub>, 0.2 mM de fosfato de desoxinucleotidos, 2.5 ul de buffer-PCR 10X Taq polimerasa (Promega®), 0.75 U de taq polimerasa (Promega®) en volumen final de mezcla por muestra de 25 μl. La amplificación por PCR (Tabla # 1) se realizó en un equipo PTC-200 MJ Research®, con 30 ciclos térmicos.

Tabla 1. Condiciones de amplificación para PCR de las muestras de agua, sedimento y camarón.

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

<sup>(1)</sup>Sólo último ciclo; <sup>(2)</sup> Al completar 30 ciclos; <sup>(3)</sup> Se repite 29 veces

Los productos de la reacción de PCR fueron visualizados preliminarmente en geles de agarosa al 2% con adición de 5 μl de bromuro de etidio (10 mg.mL<sup>-1</sup>), registrándose por fotografía con una cámara (Kodak Digital DC 120 Zoom) y un transiluminador (TFX-35M Gibco BRL UV), y visualizados utilizando el programa “Kodak Digital Science IQ Image Analysis Software” (Versión 3.0, Mac; Fig. 3). La elaboración de geles de agarosa se muestra en el Anexo # 3.

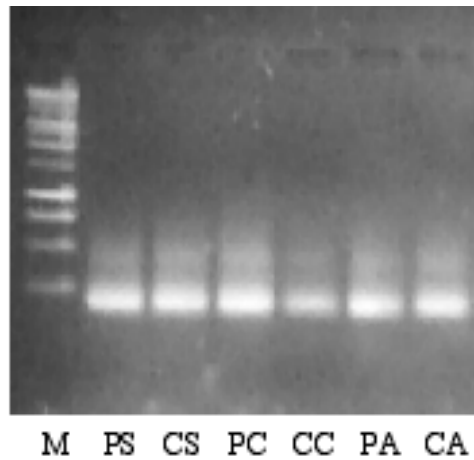


Fig. 3: Gel de Agarosa de muestras de ADN bacteriano amplificado por 16S rRNA-PCR de muestras de estómago de camarón, sedimento y agua. M: Marcador; PS: Probiótico sedimento; CS: Control sedimento; PC: Probiótico camarón; CC: Control camarón; PA: Probiótico agua; CA: Control agua.

### **3.6.3. Electroforesis en geles de Poliacrilamida con Gradiente Desnaturalizante**

Se utilizó un equipo para geles de gradiente desnaturalizante (C.B.S Scientific. Co DGGE – 2001-Rev. B). Se siguió el protocolo descrito por Muyzer *et al.* (1993) para la electroforesis en geles de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante con algunas modificaciones.

Se empleó la tinción de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) siguiendo el protocolo descrito por Dinesh *et al.* (1995) con algunas modificaciones ( Ver Anexo # 4 y # 5). El gel teñido, se fotografió con una cámara digital OLYMPUS C- 5000 (5 Megapíxeles: incremento óptico 3x de 38 mm – 14 mm), sobre una caja de luz blanca (Fig. 4).

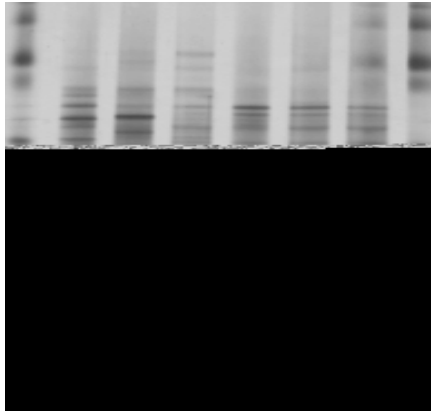


Fig. 4: Patrones de DGGGE de genes de 16S rRNA de bacterias presentes en muestras de estómago de camarón, sedimento y agua. M: Marcador; PS: Probiótico sedimento; CS: Control sedimento; PC: Probiótico camarón; CC: Control camarón; PA: Probiótico agua; CA: Control agua.

#### **3.6.4. Análisis de Imagen**

Las imágenes de los geles fueron guardadas como archivos en formato TIFF y fueron procesadas usando el programa “Adobe Photo Shop” (versión 7.0, Mac.) y “Gene Profiler” (versión 4.05). Con ayuda de este programa se determinó la presencia o ausencia de bandas, así como la intensidad de las mismas. Para que una banda sea considerada en el análisis se determinó que como mínimo tuviera un 5% de intensidad total en la línea analizada.

### **3.7. PARÁMETROS ABIÓTICOS**

Diariamente se realizaron lecturas de temperatura (°C) y oxígeno disuelto ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) con ayuda de un equipo YSI – 85 provisto de sensor de temperatura. Para las lecturas de pH, se empleó un equipo de mano pH testr2 “double junction” (OAKTON® Instruments).

Para salinidad ( ‰ ) se utilizó el refractómetro de mano marca ATAGO, Modelo 5/Mill.

### 3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados finales promedios de todos los muestreos de supervivencia, peso promedio, comunidad bacteriana y aislados bacterianos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía a un nivel de confianza del 95%, con ayuda del programa estadístico Data Desk 6.1. Para cumplir con las asunciones de normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (prueba de Levene) se empleó el programa estadístico STATISTICA® 4.1 (1994-2000, StatSoft, Oklahoma, EE.UU.); algunas variables fueron transformadas (ver Anexo 6). Cuando se declaró significancia, la prueba de Scheffé fue utilizada para la comparación múltiple de medias a un nivel de significancia  $\alpha$ : 0,05.

Con ayuda del software Gene Profiler (Version 4.05) se realizó un análisis de la estructura microbiana partir de las bandas generadas por la electroforesis usando índices de diversidad (quincenales) que fueron calculados a partir de las siguientes fórmulas:

- *Riqueza de especies (S)*:

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

Se calculó con la siguiente ecuación:

S= # de bandas detectadas

- *Indice de Shannon–Weaver:*

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

Se calculó con la siguiente ecuación:

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

Donde:

Pi es la intensidad relativa de las bandas en un perfil.

- *Igualdad u homogeneidad (Evenness)*

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

Se calculó con la siguiente ecuación:

$$E = H' / \log(S) \text{ (para cualquier base)}$$

Se generó una matriz binaria (presencia o ausencia de bandas) individuales en todas las líneas que fueron transformadas a una matriz de distancia utilizando la distancia genética (Link et al, 1995) en el software Treecon (Version 1.3b) para construir dendogramas usando el método de análisis multivariado Cluster UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Averages, siglas en inglés).



La distancia genética fue calculada a partir de la siguiente fórmula:

$$GD_{XY} = \frac{N_X + N_Y}{N_X + N_Y + N_{XY}}$$

Donde:

$N_X$ : Número de bandas en la línea X y no en la línea Y.

$N_Y$ : Número de bandas en la línea Y y no en la línea X.

$N_{XY}$ : Número de bandas compartidas en líneas X y Y.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. SUPERVIVENCIA Y PESO PROMEDIO

Los resultados mostraron que el tratamiento control reportó una mejor tasa de supervivencia y producción comparados con el tratamiento probiótico. Sin embargo estas diferencias no mostrarán ser estadísticamente significativas (Tabla 2;  $P > 0.05$ ). A pesar que el tratamiento con probiótico presentó un mejor peso promedio por animal y tasa de crecimiento por día, no demostraron diferencias significativas (Tabla 2;  $P > 0.05$ ) con respecto al tratamiento control.

Tabla 2. Parámetros de producción de cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei* en diferentes tratamientos. Valores son promedios  $\pm$  desviación estándar (n=3 piscinas)

Parámetros de producción	Tratamiento	
	Control	Probiótico
Tasa de supervivencia (%)	15.93 $\pm$ 2.77 <sup>a</sup>	14.40 $\pm$ 2.71 <sup>a</sup>
Peso medio corporal (g)	11 $\pm$ 0.64 <sup>a</sup>	11.72 $\pm$ 0.63 <sup>a</sup>
Crecimiento diario (g.día <sup>-1</sup> )	0.089 $\pm$ 0.005 <sup>a</sup>	0.095 $\pm$ 0.005 <sup>a</sup>
Producción (Kg.ha <sup>-1</sup> )	555.83 $\pm$ 114.84 <sup>a</sup>	471.67 $\pm$ 35.38 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Datos en la misma fila con diferente superíndice son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

### 4.2. COMUNIDAD BACTERIANA

#### ***ESTOMAGO DE CAMARÓN***

El número promedio total de UFC. g<sup>-1</sup> recuperadas en AM fue mayor en el tratamiento con adición de probióticos comparado con las muestras del tratamiento control (Tabla 3). Sin embargo el incremento no mostró ser estadísticamente significativo

( $P=0.06$ ). El tratamiento control reportó un valor mínimo de  $1.78E+06$  UFC.  $g^{-1}$  en el quinto muestreo y el valor máximo de conteo de  $2.04E+07$  UFC.  $g^{-1}$  en el cuarto muestreo; en tanto que para el tratamiento con probiótico el valor máximo registrado fue de  $1.34E+08$  UFC.  $g^{-1}$  en el tercer muestreo y un mínimo de  $4.04E+06$  UFC.  $g^{-1}$  en el quinto muestreo (Fig.5a).

A pesar que el número promedio total de UFC. $g^{-1}$  de vibrios presuntivos aislados en agar TCBS en el tratamiento control fue ligeramente superior al tratamiento con probiótico (Tabla 3), no evidenció ser estadísticamente significativo ( $P=0.877$ ).

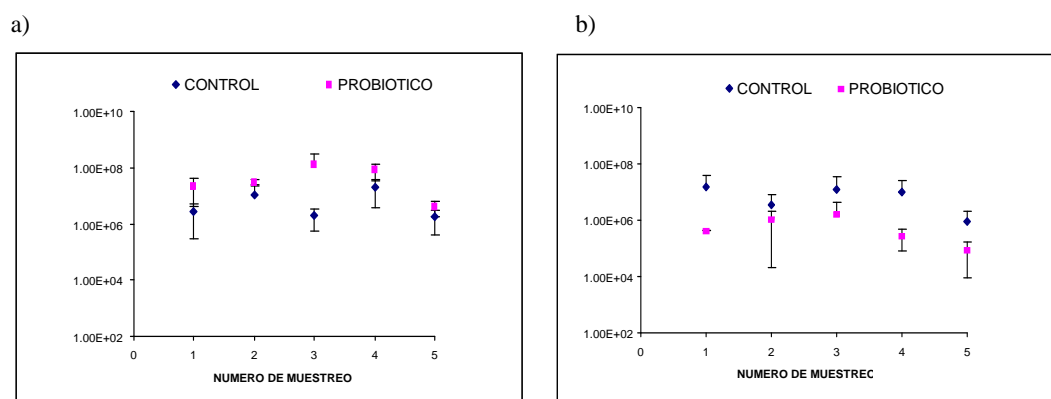


Fig. 5. Número de UFC.  $g^{-1}$  (Valores promedio  $\pm$  desviación estándar) en muestras de estómago de camarón durante el período de adición de probiótico a) Agar Marino y b) Agar TCBS.

Durante el tiempo de muestreo los valores máximos de vibrios presuntivos reportados para el tratamiento control fue de  $1.57E+07$  UFC.  $g^{-1}$  en el primer muestreo y un mínimo de  $8.74E+05$  UFC.  $g^{-1}$  en el quinto muestreo. En tanto que para el tratamiento con probióticos el valor máximo reportado fue de  $1.75E+06$  UFC.  $g^{-1}$  en el tercer muestreo y el valor mínimo fue de  $8.77E+04$  UFC.  $g^{-1}$  en el quinto muestreo (Fig.5b).

### ***SEDIMENTO***

El número promedio total de UFC.  $g^{-1}$  recuperadas en AM en el tratamiento control fue ligeramente mayor que el tratamiento con probiótico (Tabla 3). Sin embargo no mostró ser estadísticamente significativo ( $P=0.12$ ). Se reportó  $8.83E+06$  UFC.  $g^{-1}$  del cuarto muestreo como valor máximo de UFC.  $g^{-1}$  en el tratamiento control, mientras el valor mínimo de UFC.  $g^{-1}$  registrado fue de  $6.07E+05$  UFC.  $g^{-1}$  en el quinto muestreo. El valor máximo de UFC.  $g^{-1}$  registrado para el tratamiento con probiótico fue de  $1.49E+06$  UFC.  $g^{-1}$  en el tercer muestreo, mientras que el valor mínimo registrado fue de  $4.92E+05$  UFC.  $g^{-1}$  en el segundo muestreo (Fig.6a).

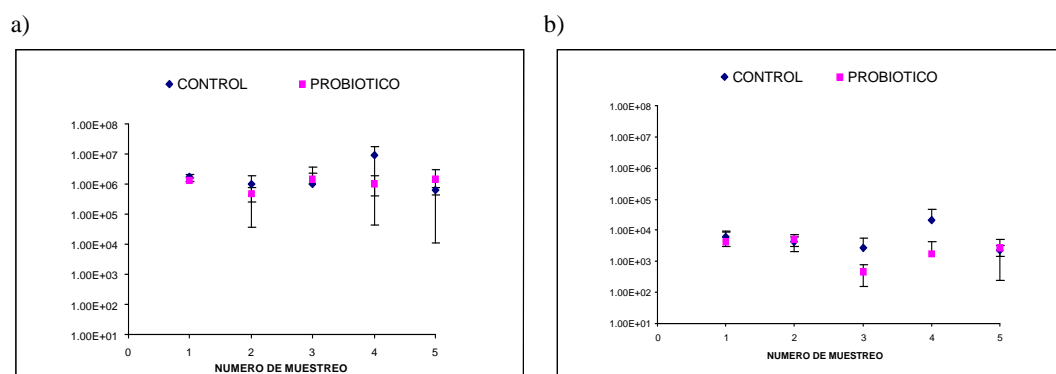


Fig.6. Número de UFC.  $g^{-1}$  (Valores promedio  $\pm$  desviación estándar) en muestras de sedimento durante el período de adición de probiótico. a) Agar Marino y b) Agar TCBS.

A pesar de que el número promedio total de UFC.  $g^{-1}$  de vibrios presuntivos recuperados en TCBS en el tratamiento control fue mayor que el tratamiento con probiótico (Tabla 3), este incremento no demostró diferencias significativas ( $P=0.17$ ). El valor máximo de UFC.  $g^{-1}$  presentado durante el muestreo en el tratamiento control fue de  $2.15E+04$  en el cuarto muestreo, mientras que el valor mínimo registrado fue de  $2.33E+03$  UFC.  $g^{-1}$  en el quinto muestreo. El valor máximo registrado para el

tratamiento con probiótico fue de  $5.00E+03$  UFC.  $g^{-1}$  en el segundo muestreo, mientras que el valor mínimo registrado fue de  $4.67E+02$  UFC.  $g^{-1}$  en el tercer muestreo (Fig.6b).

### AGUA

El número promedio total de UFC. $ml^{-1}$  recuperadas en AM a pesar de ser mayor en el tratamiento con probiótico comparado con el control, no muestra diferencias estadísticamente significativas (Tabla 3;  $P=0.87$ ). Se observa una tendencia al decrecimiento en el número total de UFC.  $ml^{-1}$  en el tratamiento con probiótico, siendo  $2.56E+04$  UFC.  $ml^{-1}$  el valor máximo reportado en el primer muestreo, mientras que el valor mínimo registrado fue de  $1.01E+03$  UFC.  $ml^{-1}$  en el tercer muestreo.

Un comportamiento contrario se observa en el tratamiento control que presenta una tendencia al incremento en el número total de UFC.  $ml^{-1}$ , reportando el valor máximo de  $5.6E+03$  UFC.  $ml^{-1}$  en el cuarto muestreo, mientras que el valor mínimo registrado fue de  $2.17E+03$  UFC.  $ml^{-1}$  en el tercer muestreo (Fig.7a).

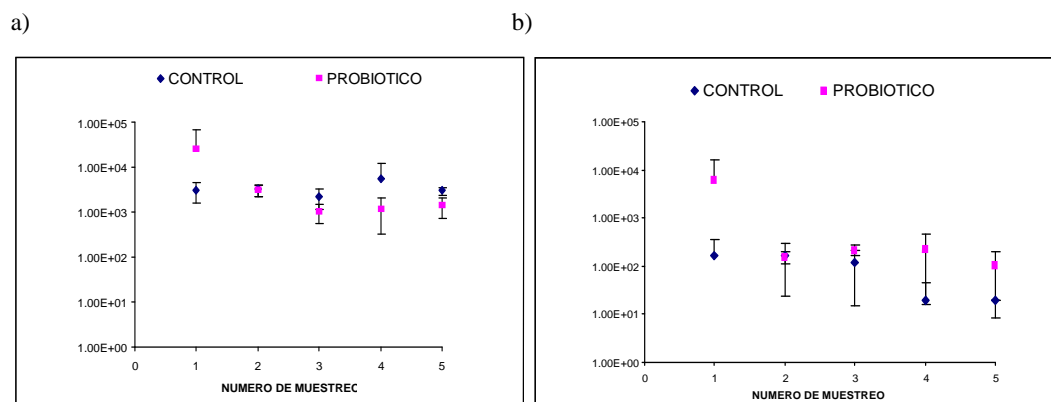


Fig.7. Número de UFC.  $ml^{-1}$  (Valores promedio  $\pm$  desviación estándar) en muestras de agua durante el período de adición de probiótico. a) Agar Marino y b) Agar TCBS

A pesar de que se reportó un mayor número promedio total de UFC. ml<sup>-1</sup> de vibrios presuntivos en TCBS en el tratamiento con probiótico comparado con el tratamiento control (Tabla 3), no evidenció ser estadísticamente significativo (P=0.19). Para el tratamiento con probiótico se determinó un valor máximo de 6.27E+03 UFC. ml<sup>-1</sup> de de vibrios presuntivos en el primer muestreo, mientras el valor mínimo de 1.03E+02 UFC. ml<sup>-1</sup> en el quinto muestreo. En el tratamiento control, el valor máximo fue de 1.65E+02 UFC. ml<sup>-1</sup> en el primer muestreo y 2.00E+01 UFC. ml<sup>-1</sup> como valor mínimo en el quinto muestreo (Fig. 7b).

Tabla 3. Número promedio total de UFC ( $\pm$  desviación estándar) evaluadas durante el período experimental en piscinas de cultivo de camarones *L. vannamei* a través de ANOVA de una vía.

TRATAMIENTO	MEDIO DE CULTIVO	
	AM	TCBS
<b><i>Camarón (UFC. g<sup>-1</sup>)</i></b>		
Probiótico (P62-P64)	4.61E+07 <sup>a</sup> (7.94E+07)	6.34 E+05 <sup>a</sup> (1.25E+06)
Control	6.26 E+06 <sup>a</sup> (1.01E+07)	6.80E+06 <sup>a</sup> (1.30E+07)
<b><i>Sedimento (UFC. g<sup>-1</sup>)</i></b>		
Probiótico (P62-P64)	1.15E+06 <sup>a</sup> (1.10E+06)	2.82E+03 <sup>a</sup> (2.88E+03)
Control	2.61E+06 <sup>a</sup> (4.59E+06)	7.36E+03 <sup>a</sup> (1.29E+04)
<b><i>Agua (UFC. ml<sup>-1</sup>)</i></b>		
Probiótico (P62-P64)	6.45E+03 <sup>a</sup> (1.82E+04)	1.58 x 10 <sup>3a</sup> (4.91 x 10 <sup>3</sup> )
Control	3.40E+03 <sup>a</sup> (2.96E+03)	1.04E+02 <sup>a</sup> (1.14E+02)

<sup>a</sup> Datos en una misma columna con diferente superíndice son significativamente diferentes (p<0.05), n=3 piscinas.

#### 4.3. CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS GRAM-POSITIVOS Y GRAM-NEGATIVOS

Las muestras de camarón y sedimento presentaron un predominio de bacterias Gram-negativas (Fig.8a y 8b). Adicionalmente se observó que las muestras de sedimento presentan mayor contenido de bacterias Gram-positivos comparados con las muestras de camarón.

En muestras de estómago de camarón no existieron diferencias significativas ( $P=0.304$ ) en el contenido de microorganismos Gram-negativos entre ambos tratamientos, reportando  $96.98 \pm 2.87\%$  en el tratamiento control y  $88.33 \pm 2.88 \%$  en el tratamiento probiótico. Existe un mayor porcentaje de microorganismos gram-positivos en el tratamiento con probiótico ( $11.66 \pm 2.88\%$ ) comparado con el tratamiento control ( $3.01 \pm 2.87 \%$ ). Sin embargo la diferencia de contenido no mostró ser estadísticamente significativo (Fig.8a;  $P=0.101$ ).

Aunque en las muestras de sedimento se observó que existe un mayor porcentaje de microorganismos Gram-positivos ( $40.01 \pm 13.83 \%$ ) en el tratamiento con probiótico comparado con el tratamiento control ( $28.74 \pm 9.78\%$ ), no demostró ser estadísticamente significativo ( $P=0.41$ ). En tanto que el tratamiento control presenta mayor contenido de microorganismos Gram-negativos ( $71.25 \pm 9.78\%$ ) que el tratamiento con probióticos ( $59.98 \pm 13.83\%$ ), sin embargo la diferencia no mostró ser estadísticamente significativa (Fig.8b;  $P=0.41$ ).

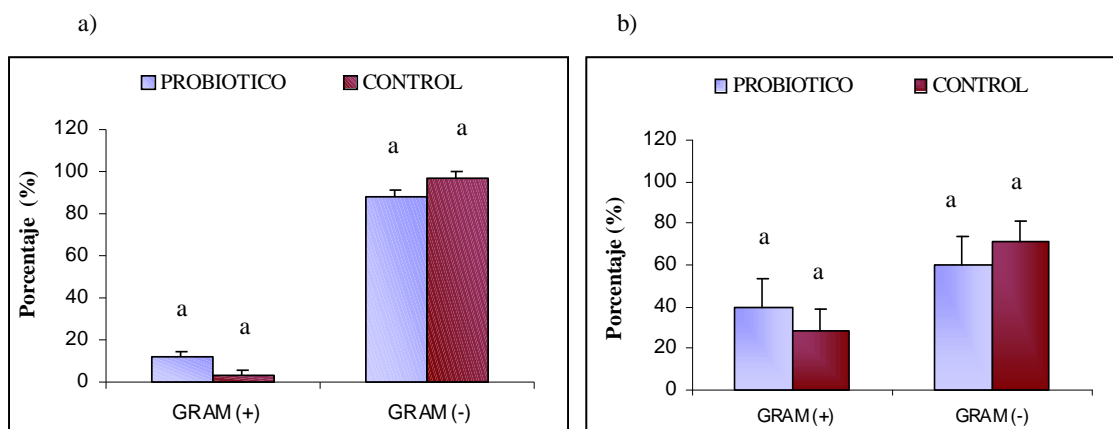


Fig 8. Porcentaje de aislados identificados como Gram-positivos y Gram-negativos en a) Muestras de camarón y b) Muestras de sedimento. (Valores Promedios  $\pm$  desviación estándar)

#### 4.4. CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS EN BASE A CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS

Todas las cepas aisladas presentaron morfologías similares; colonias no pigmentadas en TSA, colonias pigmentadas en AM, mientras que en TCBS formaban colonias fermentadoras (amarillas) y no fermentadoras (verde). La identificación bacteriana se realizó en base a algunas características morfológicas y metabólicas, alcanzando el nivel taxonómico de género.

Dentro de los microorganismos Gram-negativos aislados de muestras de estómago de camarón se determinó que el tratamiento control presentó un mayor contenido de los géneros *Vibrio* y *Aeromonas* comparados con el tratamiento probióticos, cuya diferencia no reportó ser estadísticamente significativa ( $P=0.69$  y  $P=0.42$  respectivamente; Fig. 9a y 9b).



El tratamiento con probiótico presentó una elevada presencia de otros microorganismos Gram-negativos comparado con el tratamiento control. En ambos tratamientos dentro de los aislados caracterizados no se determinó la presencia del género *Pseudomonas* durante el estudio.

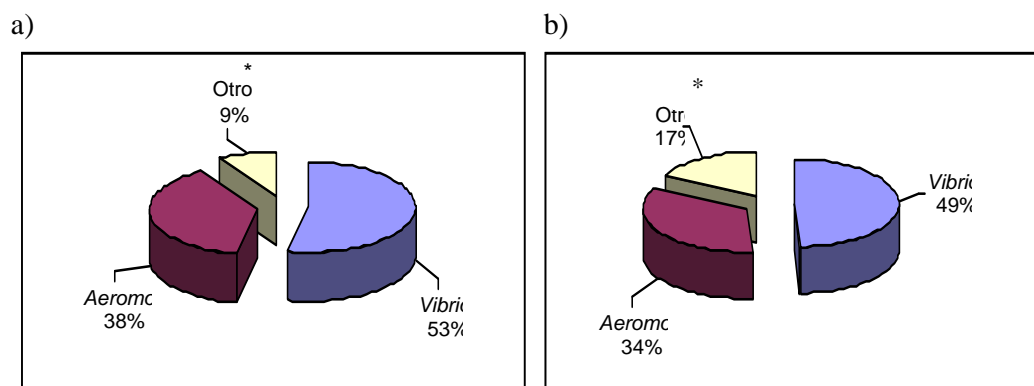


Fig 9. Porcentaje de los géneros *Vibrio*, *Aeromonas* y otros microorganismos Gram-negativos en muestras de estómago camaron. a) Tratamiento Control y b) Tratamiento Probiótico. \* Otros: Microorganismos Gram-negativos no pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas* o *Vibrio*.

Para los aislados obtenidos de las muestras de sedimento, el porcentaje de vibrios en el tratamiento control fue mayor comparado con el tratamiento con probiótico, sin embargo no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P=0.67$ ; no obstante no se determinaron diferencias significativas ( $P=0.82$ ) en el contenido de *Aeromonas* en ambos tratamientos, mientras que el contenido de otros microorganismos Gram-negativos fue superior en el tratamiento con probióticos (Fig 10a y 10b). Durante el estudio, no se determinó la presencia del género *Pseudomonas* en ambos tratamientos.

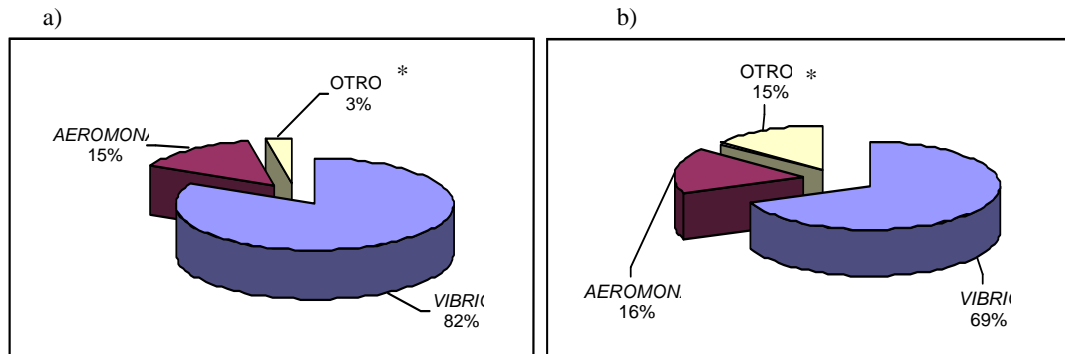


Fig.10. Porcentaje de los géneros *Vibrio*, *Aeromonas* y otros microorganismos Gram-negativos en muestras de sedimento. a) Tratamiento Control y b) Tratamiento Probiótico \* Otros: Microorganismos Gram-negativos no pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas* o *Vibrio*.

#### 4.5. ESTIMACIÓN DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA POR MEDIO DEL DGGE

Se calculó la riqueza y la abundancia relativa de las especies bacterianas (promedio quincenal) a partir del número e intensidad de bandas de 16S rRNA bacteriano obtenidos con el DGGE. A partir de los perfiles generados se calcularon varios índices para estimar la diversidad bacteriana, riqueza y homogeneidad de las comunidades bacterianas presentes en ambos tratamientos.

##### 4.5.1. Índices de diversidad en muestras de estómago de camarón

Durante el tiempo de muestreo, el tratamiento control mostro una ligera tendencia a disminuir su riqueza de especies durante los cuatro muestreos seguidos de una recuperación hacia el quinto muestreo, reportándose para el tratamiento control un valor máximo de 11 en el primer muestreo y un valor mínimo de 9 en el cuarto muestreo (Fig. 11a). El tratamiento con probiótico mostró ligeros cambios en su riqueza de

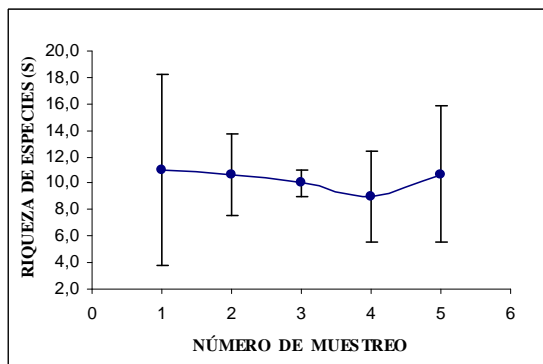
especies durante el período de muestreo, reportando 10.3 como valor máximo en el tercer muestreo y 8.0 como valor mínimo en el primer muestreo (Fig.11b).

Durante el período de muestreo, el índice de Shannon-Weaver en el tratamiento control reflejó una tendencia a la disminución del número y abundancia de especies presentes en las comunidades bacterianas, reportando un valor máximo de 1.97 en el segundo muestreo y un valor mínimo de 1.52 en el quinto muestreo (Fig.11c). El tratamiento con probiótico por el contrario muestra una tendencia a cambios en el número y abundancia de especies dentro de las poblaciones bacterianas a lo largo del muestreo, reportando su valor máximo de 1.90 en el quinto muestreo y un valor mínimo de 1.66 en el cuarto muestreo (Fig.11d).

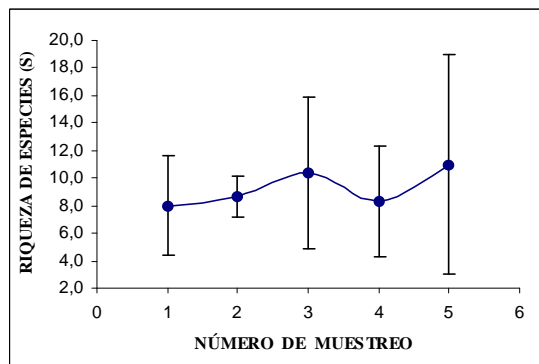
El índice de Evenness demuestra que el tratamiento con probiótico mantuvo muy homogénea su comunidad bacteriana durante los tres primeros muestreos, con una disminución hacia el cuarto muestreo que se determinó como valor mínimo de 0.67 seguido de la recuperación de la homogeneidad en el quinto muestreo. El valor máximo de 0.84 fue establecido en el segundo muestreo (Fig.11f). En lo que concierne al control, existió una tendencia a la disminución de la homogeneidad de las especies que conforman las comunidades bacterianas durante el tiempo de muestreo siendo la proporción de individuos en cada especie menos homogénea al término del muestreo, reportando como valor máximo 0.85 en el primer muestreo y un valor mínimo de 0.63 en el quinto muestreo (Fig.11e).

## Índice de Riqueza (S)

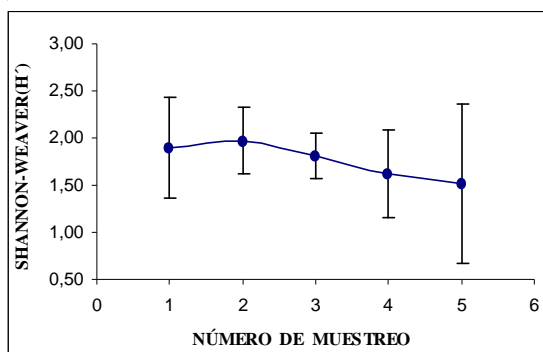
a)



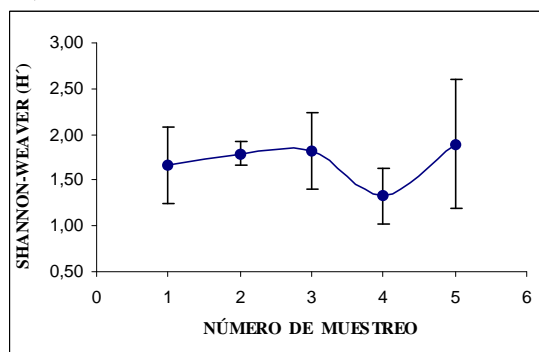
b)

Shannon-Weaver ( $H'$ )

c)

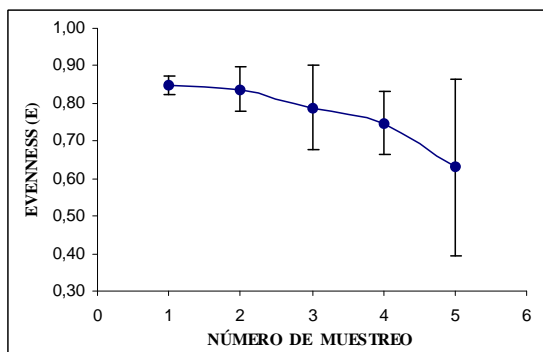


d)



## Evenness (E)

e)



f)

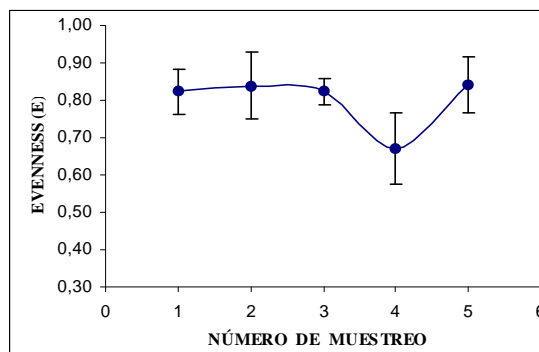


Fig.11. Índices de diversidad de comunidades bacterianas, Riqueza (S), Shannon-Weaver ( $H'$ ) y Evenness (E) calculados a partir de patrones de bandas generadas por DGGE de muestras de camarón en un sistema de cultivo de *Litopenaeus vannamei*. Tratamiento Control: a, c y e; Tratamiento con Probiótico: b, d y f. (Valores promedios  $\pm$  desviación estándar; escala adimensional).

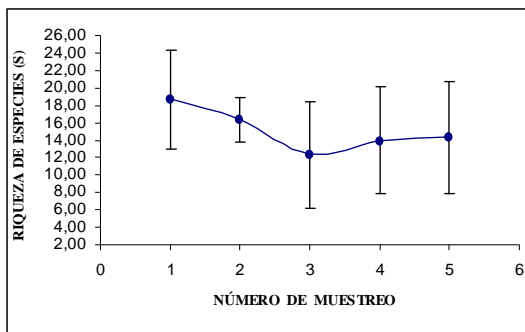
#### **4.5.2. Índices de diversidad en muestras de sedimento**

El tratamiento control presentó una tendencia al descenso de su riqueza durante el período de muestreo, reportándose como valor máximo de índice de riqueza (S) 18.67 en el primer muestreo y un valor mínimo de 12.33 en el tercer muestreo (Fig.12a). Por el contrario el tratamiento con probiótico mostró ligeros cambios durante el muestreo reportando 17 como valor máximo en el cuarto muestreo, manteniéndose estable el número de especies presentes, siendo 15.33 el valor mínimo observado en el tercer muestreo (Fig.12b). Un muestreo previo a la adición de probiótico en el tratamiento con probiótico reveló un valor en su riqueza de 17 que cambió hacia 16.67 durante el primer muestreo.

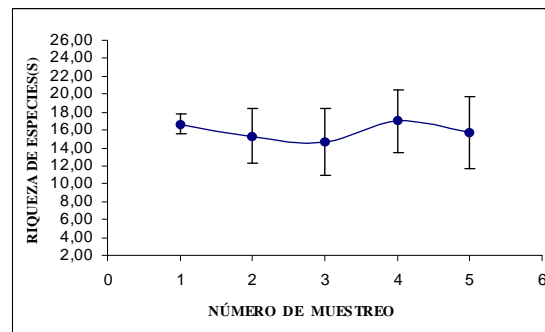
Los índices de Shannon-Weaver quincenales no reportaron cambios en el número de especies y su abundancia dentro de las comunidades bacterianas en el tratamiento con probiótico durante el período de muestreo. Mientras que el tratamiento control mostró ligeras fluctuaciones durante el período de muestreo. El tratamiento control reportó un valor máximo de 3.05 en el cuarto muestreo, siendo 2.05 el valor mínimo en el segundo muestreo (Fig.12c). El tratamiento con probiótico mantuvo constante el número de sus especies bacterianas y su abundancia a lo largo del cultivo observado a partir de un muestreo previo a la adición de probiótico que reportó un valor de 2.42 que cambió hacia 2.45 obtenido en el primer muestreo (posterior a adición de probiótico) que demostró ser el valor máximo y 2.21 como valor mínimo de en el tercer muestreo (Fig.12d).

Riqueza (S)

a)

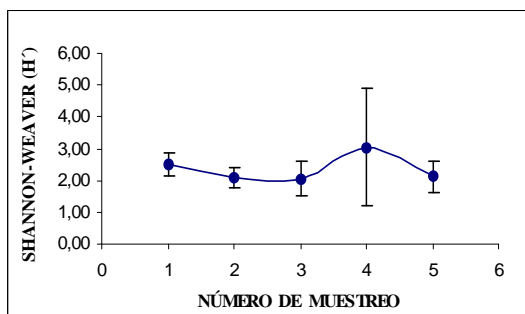


b)

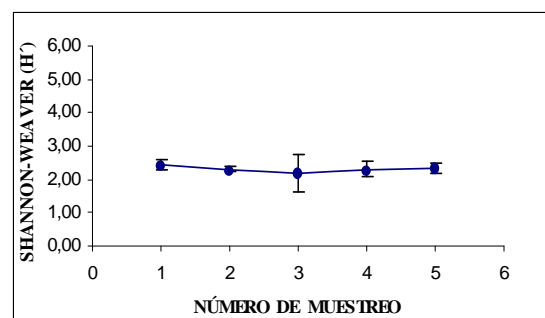


Shannon-Weaver (H')

c)

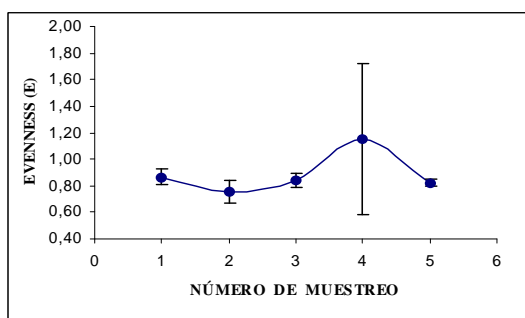


d)



Evenness (E)

e)



f)

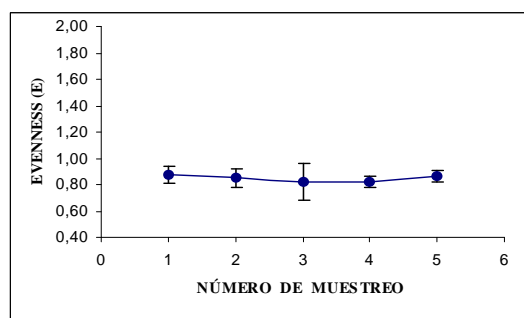


Fig.12. Índices de diversidad de comunidades bacterianas, Riqueza (S), Shannon-Weaver (H') y Evenness (E) calculados a partir de patrones de bandas generadas por DGGE de muestras de sedimento marino en un sistema de cultivo de *Litopenaeus vannamei*. Tratamiento Control: a, c y e; Tratamiento con Probiótico: b, d y f. (Valores promedios  $\pm$  desviación estándar; escala adimensional).

Los índices de Evenness (E) quincenales para el tratamiento control no presentan cambios en la proporción de sus comunidades bacterianas durante los primeros

muestreos produciéndose un incremento hacia el cuarto muestreo y un descenso hacia el quinto muestreo. El tratamiento con probiótico no presentó variaciones durante los muestreos, manteniéndose las comunidades bacterianas homogéneas (Fig 12e y 12f).

#### **4.5.3. Índices de diversidad en muestras de agua**

La riqueza de especies quincenales en la microflora de agua mostró ligeras variaciones durante el tiempo de muestreo en el tratamiento control. Mientras la riqueza del tratamiento con probiótico se mostró similar durante el período de muestreo. El tratamiento control reportó un valor máximo de 16.3 en el segundo muestreo y un valor mínimo de 10.5 en el quinto muestreo (Fig.13a), mientras que en el tratamiento con probiótico se observó un valor máximo de 17 en el segundo muestreo y un valor mínimo de 13 en el cuarto muestreo (Fig.13b). Un muestreo previo a la adición de probiótico en el tratamiento con probiótico reveló un valor en su riqueza de 10 que cambió hacia 15.7 durante el primer muestreo.

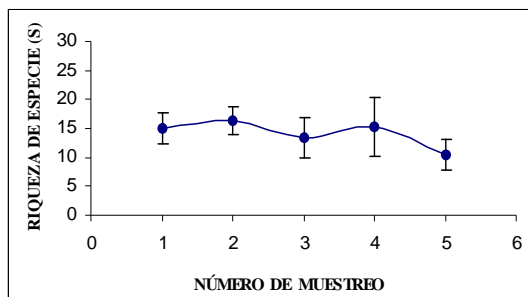
El número y abundancia de especies bacterianas reportadas por los índices de Shannon-Weaver ( $H'$ ) quincenales durante los muestreos fueron muy similares en ambos tratamientos, siendo el valor máximo registrado para el tratamiento control de 2.3 en el segundo muestreo, y el valor mínimo de 1.9 en el primer muestreo (Fig.13c). El tratamiento con probiótico reportó 2.37 como valor máximo en el segundo muestreo y 2.06 como mínimo en el cuarto muestreo (Fig.13d). Un muestreo previo a la adición de probiótico reveló un cambio en la distribución del número y abundancia de especies

que conforman las comunidades pasando desde 1.70 a 2.11 valor registrado en el primer muestreo.

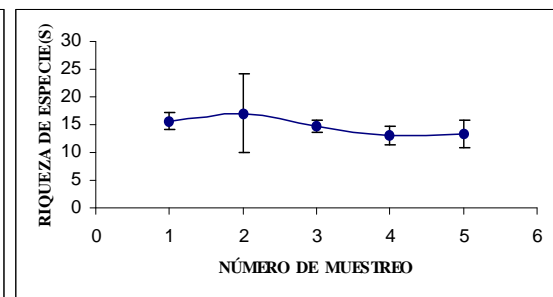
Los valores de los índices de Evennes (E) quincenales obtenidos durante los muestreos no presentaron cambios, mostrando comunidades muy similares en homogeneidad en ambos tratamientos, registrando un valor máximo de 0.81 en el segundo muestreo y un mínimo de 0.73 en el primer muestreo para el tratamiento control (Fig.13e). Para el tratamiento con probiótico el valor máximo registrado fue de 0.89 el quinto muestreo y el valor mínimo de 0.77 en el primer muestreo. Un muestreo previo a la adición de probiotico reveló que la homogeneidad de las comunidades en el tratamiento con probiótico no fue alterada al adicionar el probiótico, cuyo valor de 0.77 se mantuvo antes y después de la adición del mismo registrado en el primer muestreo (Fig 13f).

### Riqueza (S)

a)

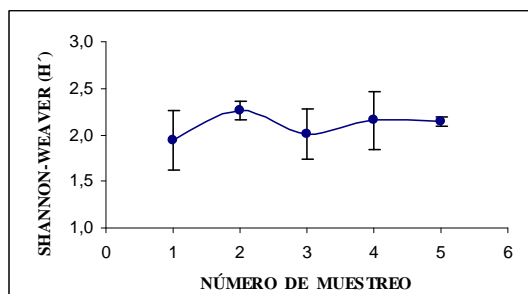


b)

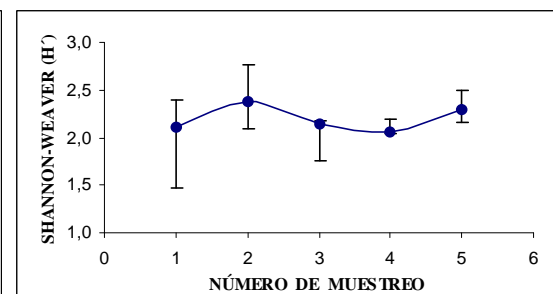


### Shannon-Weaver (H')

c)



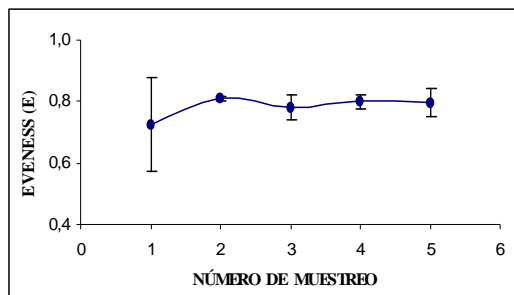
d)





Evenness (E)

e)



f)

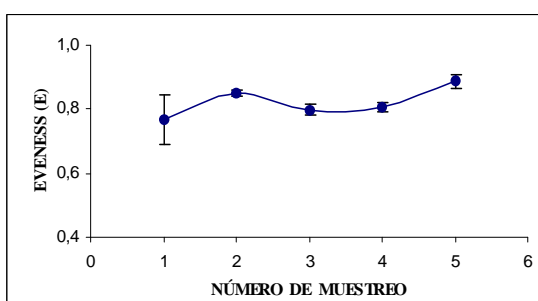


Fig.13. Índices de diversidad de comunidades bacterianas, Riqueza (S), Shannon-Weaver ( $H'$ ) y Evenness (E) calculados a partir de patrones de bandas generadas por DGGE de muestras de agua en un sistema de cultivo de *Litopenaeus vannamei*. Tratamiento Control: a,c y e; Tratamiento con Probiótico: b, d y f. (Valores promedios  $\pm$  desviación estándar; escala adimensional).

#### 4.6. GELES COMPUESTOS COMO HERRAMIENTA PARA ILUSTRAR SIMILARIDADES ENTRE TRATAMIENTOS

El programa Gene Profiler permitió crear una representación diagramática de los perfiles de bandas de 16S rRNA bacteriano. Esto permitió ilustrar las similitudes entre los patrones de bandas de las muestras analizadas de camarón, sedimento y agua durante el período de muestreo correspondiente a la adición de probiótico dentro del ciclo de cultivo de camarón *L. vannamei*.

El diagrama en muestras de camarón (Fig.14) permitió observar una diferencia en las especies presentes en las comunidades bacterianas en el tratamiento con probiótico en comparación con el tratamiento control.

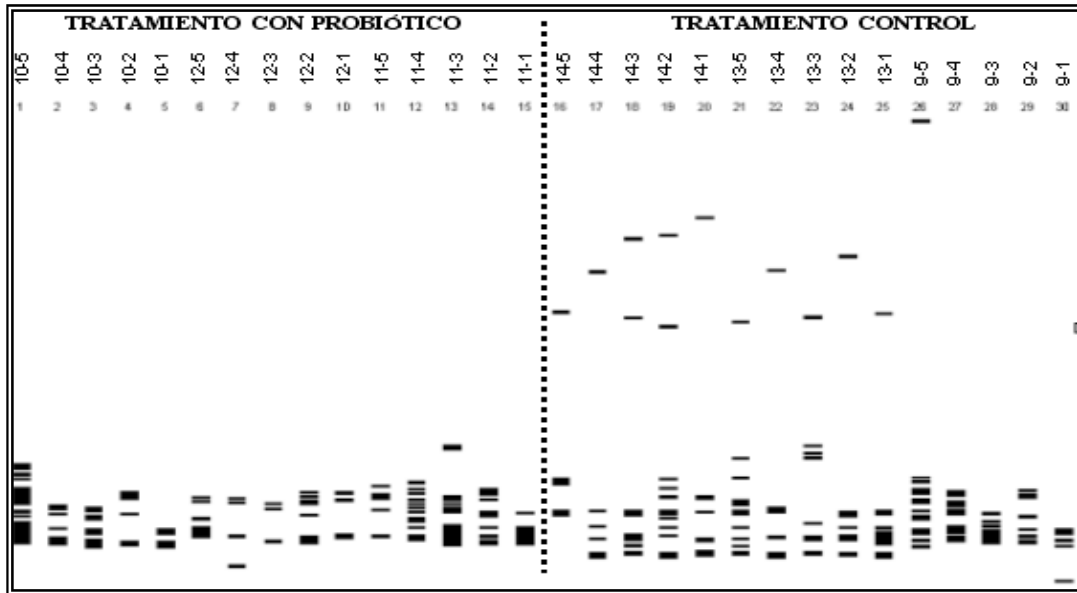


Fig.14. Gel Compuesto de muestras de estómago de camarón en Tratamiento Control: 9 (1-5), 13 (1-5), 14 (1-5) y con Probiótico: 10 (1-5), 11 (1-5), 12 (1-5) a partir de perfiles de genes de 16S rRNA obtenidos por DGGE durante tiempo de aplicación de probiótico sobre un ciclo de cultivo semi-intensivo de camarón *L. vannamei*.

Esta variación no fue percibida por los índices de diversidad, ya que la riqueza y la homogeneidad se mantuvieron aproximadamente igual en ambos tratamientos durante los muestreos.

Además se observó que en ambos tratamientos existen comunidades bacterianas similares que están presentes continuamente dentro de los muestreos, que no se encuentran fijas durante el tiempo de muestreo, mostrando fluctuaciones de su presencia durante el ciclo de cultivo.

En las muestras de sedimento, la información obtenida refleja una comunidad muy diversa en ambos tratamientos durante los diferentes muestreos (Fig.15), observándose una mayor riqueza de especies durante el tiempo de muestreo en el tratamiento con probiótico comparadas con el tratamiento control. Ambos tratamientos comparten la presencia de ciertas especies similares que conforman la comunidad bacteriana filogenéticamente común en ambos medios, cuyas presencias fluctúan a lo largo del período de muestreo. Se aprecian comunidades que se mantienen presentes a lo largo del muestreo.

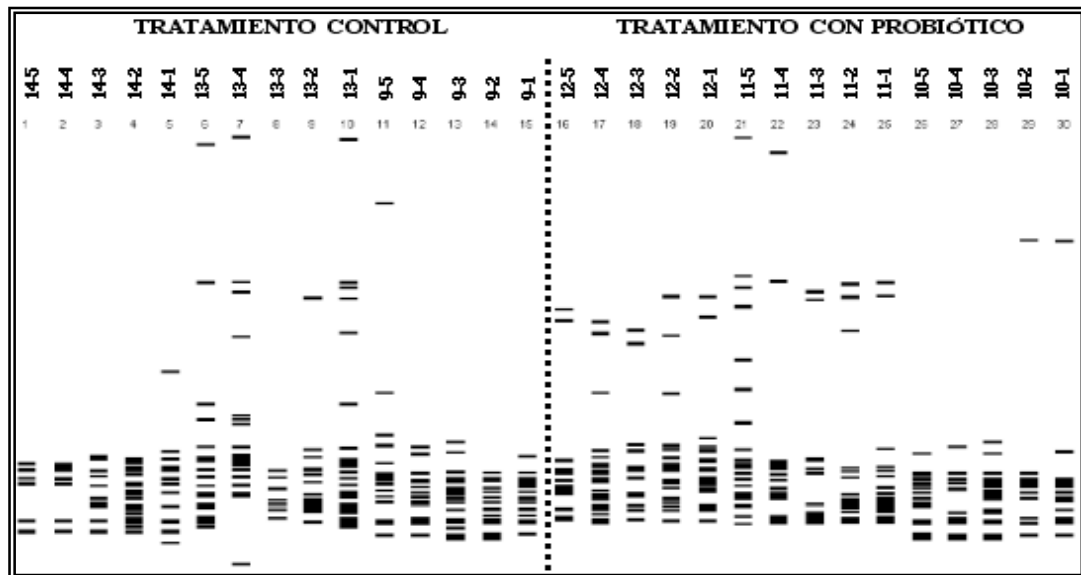


Fig.15. Gel Compuesto de Muestras de sedimento en Tratamiento Control: 9 (1-5), 13 (1-5), 14 (1-5) y con Probiótico: 10 (1-5), 11 (1-5), 12 (1-5) a partir de perfiles de genes de 16S rRNA obtenidos por DGGE durante tiempo de aplicación de probiótico sobre un ciclo de cultivo semi-intensivo de camarón *L. vannamei*.

En muestras de agua se observó la presencia de dos grupos de especies filogenéticamente no relacionadas que conforman las comunidades bacterianas detectadas a lo largo del período de muestreo, tanto para el tratamiento control como para el tratamiento con probiótico (Fig.16). No se observaron cambios en la

composición bacteriana entre los tratamientos, cuya diversidad manifiesta ligeras fluctuaciones durante el período de muestreo.

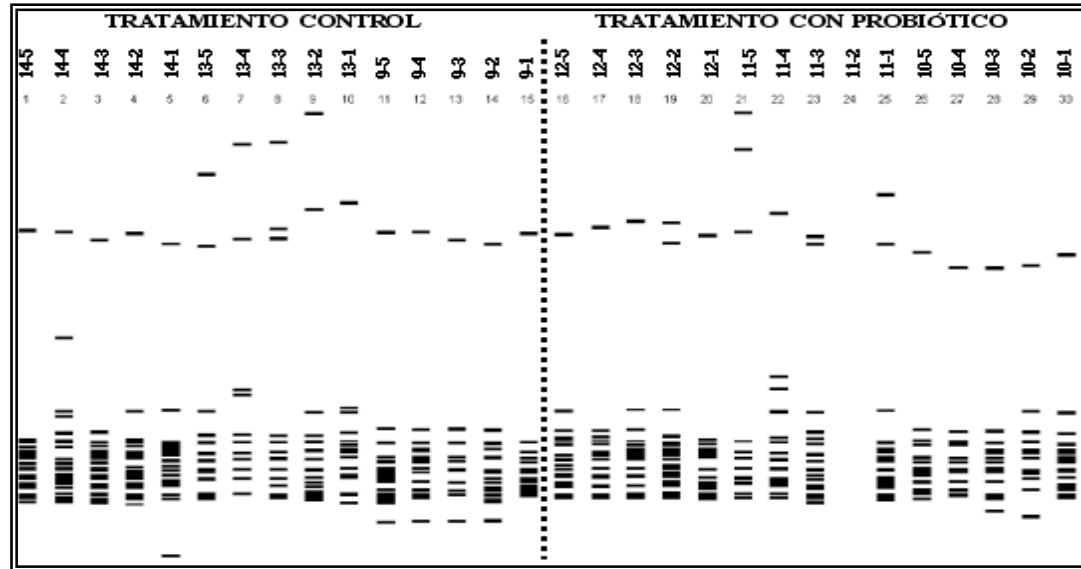


Fig.16. Gel Compuesto de Muestras de agua en Tratamiento Control: 9 (1-5),13 (1-5),14 (1-5) y Tratamiento con Probiótico: 10 (1-5),11 (1-5),12 (1-5) a partir de perfiles de genes de 16S rRNA obtenidos por DGGE durante tiempo de aplicación de probiótico sobre un ciclo de cultivo semi-intensivo de camarón *L. vannamei*. Nota: Muestra P11-2 no registrada.

#### 4.7. PERFILES DE BANDAS GENERADOS POR PCR-DGGE DE P62 Y P64.

El análisis de los perfiles de bandas generados a partir de extracciones de ADN directamente de las bacterias P62 (*Vibrio* sp) y P64 (*Bacillus* sp) reportaron más de una banda en DGGE debido a que poseen más de una copia de genes que codifican 16S rRNA en ambas bacterias (Fig.17), lo que dificultó su detección dentro de las comunidades bacterianas de camarón, sedimento y agua.

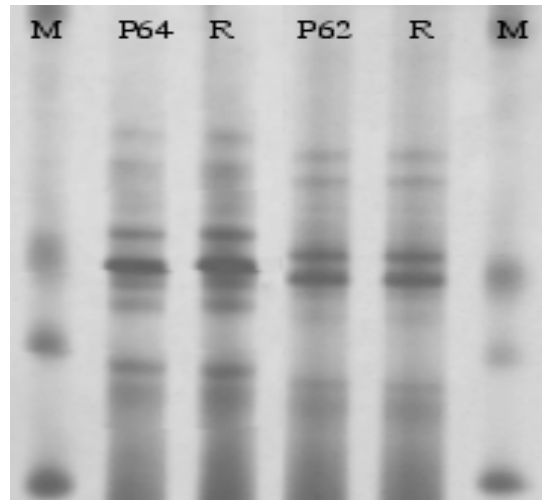


Fig.17. Perfiles generados de secuencias de genes de 16S rRNA de aislados de P62: *Vibrios* sp. y P64: *Bacillus* sp., M: Marcador; R: Réplica por medio del DGGE.

#### 4.8. ANÁLISIS DE SIMILARIDAD DE LOS PATRONES DE DGGE.

El análisis de Conglomerados a partir de los perfiles de bandas de ADN bacteriano obtenido por PCR-DGGE reportó cambios durante el curso del experimento representados en los dendrogramas, los cuales revelarán similitudes entre las especies bacterianas que conforman la estructura de las comunidades presentes en los tratamientos control y probiótico.

#### ***CAMARÓN***

El dendrograma resultante del agrupamiento de las especies que conforman la microflora de estómago de camarón (Fig.18) reportó una tendencia a asociarse en grupos naturales que poseen especies filogenéticamente relacionadas en común dentro de las comunidades bacterianas presentes en el tratamiento control (P9, P13, P14) y el tratamiento con probiótico (P10, P11, P12).

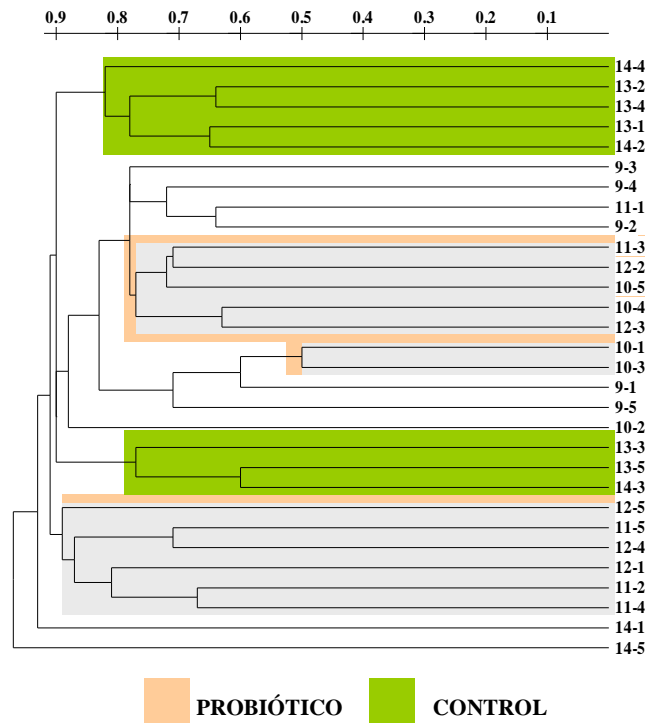


Fig.18. Dendrograma generado a partir de fragmentos de 16S rRNA obtenidos por PCR de muestras de estómago de camarón durante tiempo de aplicación de probiótico sobre un ciclo de cultivo semi-intensivo de camarón *L. vannamei*. Tratamiento control: 9 (1-5), 13 (1-5), 14 (1-5); Tratamiento con Probiótico:10 (1-5), 11 (1-5), 12 (1-5).

El bajo porcentaje de asociación (10% de similaridad) entre tratamientos nos da una visión de un efecto más claro de la acción del probiótico sobre la microflora presente en el estómago de camarón, cuyos patrones de abundancia de especies presentan estructuras muy similares dentro de cada tratamiento durante el período de muestreo. Esto no implica que los grupos no posean especies en común, pero sus patrones de abundancia son encontrados consistentemente diferentes entre los grupos de ambos tratamientos.

### ***SEDIMENTO***

El porcentaje de asociación a partir de un 20% de similaridad (Fig.19) entre ambos tratamientos reportó grupos ligeramente más similares entre las comunidades que conforman ambos tratamientos. Se pudo apreciar que entre ambos poseen un mayor número de especies en común, disminuyendo la similaridad de comunidades dentro de cada tratamiento.

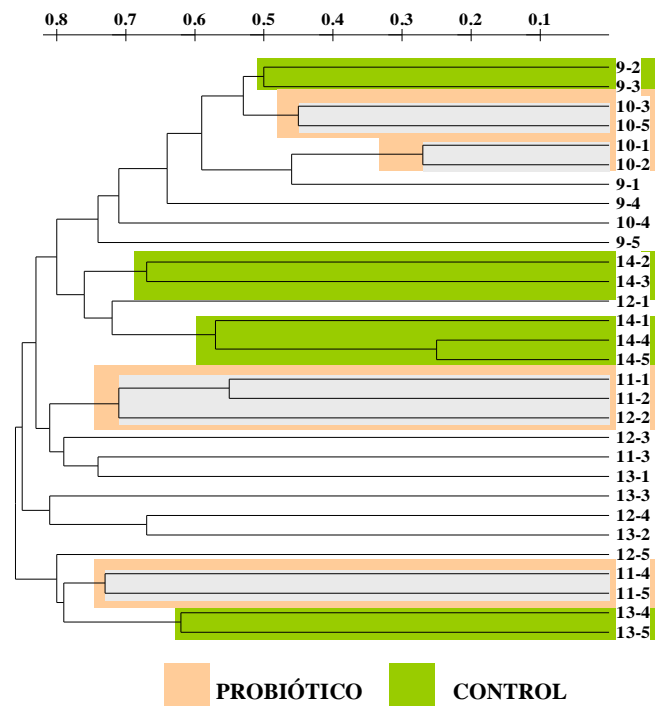


Fig.19. Dendrograma generados a partir de fragmentos de 16S rRNA obtenidos por PCR de muestras de sedimento durante tiempo de aplicación de probiótico sobre un ciclo de cultivo semi-intensivo de camarón *L. vannamei*. Tratamiento control: 9 (1-5), 13 (1-5), 14 (1-5); Tratamiento con Probiótico:10 (1-5), 11 (1-5), 12 (1-5).

### ***AGUA***

El porcentaje de asociación a partir de un 30% de similaridad (Fig.20) en ambos tratamientos reportan grupos más similares entre las comunidades que conforman los tratamientos, se pudo apreciar que entre ambos poseen un mayor número de especies en

común superior a camarón y sedimento disminuyendo la similaridad de comunidades dentro de cada tratamiento.

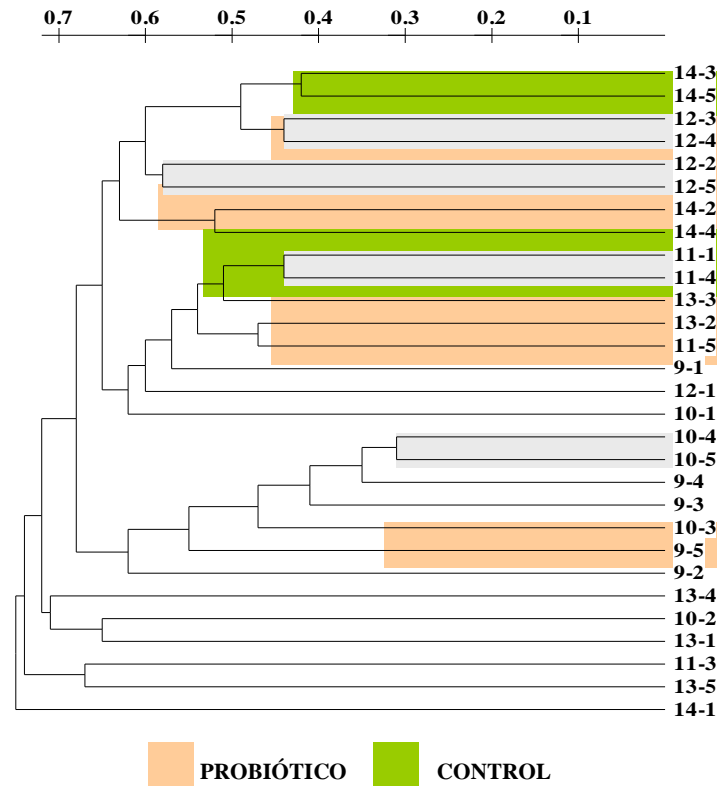


Fig.20. Dendrograma generados a partir de fragmentos de 16S rRNA obtenidos por PCR de muestras de agua durante tiempo de aplicación de probiótico sobre un ciclo de cultivo semi-intensivo de camarón *L. vannamei*. Tratamiento control: 9 (1-5), 13 (1-5), 14 (1-5); Tratamiento con Probiótico: 10 (1-5), 11 (1-5), 12 (1-5).

#### 4.9. PARÁMETROS ABIÓTICOS

Durante el ciclo de cultivo el valor promedio en los dos tratamientos de Oxígeno disuelto ( $\text{mg.l}^{-1}$ ) reportado fue de  $4.84 \pm 1.20$ , mientras que la temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) registrada fue de  $28.65 \pm 1.16$ . El valor de pH ( $\text{H}^+$ ) registrado fue de  $8.82 \pm 0.15$ , mientras que la salinidad ( $\text{‰}$ ) reportada fue de  $42.50 \pm 2.19$ . Los promedios por tratamiento se observan en la Tabla 4.



Tabla 4: Valores promedios de parámetros ( $\pm$  desviación estándar) físicos y químicos registrados durante el período de cultivo en agua de las piscinas experimentales.

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>OD (mg.l<sup>-1</sup>)</b>	<b>T (°C)</b>	<b>PH (H<sup>+</sup>)</b>	<b>S (‰)</b>
Control	4.89 $\pm$ 0.65	28.53 $\pm$ 0.55	8.83 $\pm$ 0.16	42.64 $\pm$ 2.20
Probiótico	4.98 $\pm$ 0.50	28.62 $\pm$ 0.53	8.83 $\pm$ 0.15	42.37 $\pm$ 2.17

## **5. DISCUSIÓN**

El uso de bacterias benéficas (probióticos) que desplacen patógenos asociados con enfermedades está ganando aceptación como herramienta de manejo en el control de patógenos; como una práctica preventiva que, administrado en lugar de los antibióticos promueve además la salud animal (Gatesoupe, 1999; Gómez-Gil *et al.*, 2000).

El empleo del género *Bacillus* ha sido ampliamente reportado en acuicultura por su actividad microbicida contra vibrios luminiscentes; ya sea adicionado solo (Rengpipat *et al.*, 1998; Moriarty 1999) o en combinación con otras bacterias (Queiroz & Boyd, 1998). Mientras que el uso de vibrios como probiótico es controversial debido a que algunas especies pertenecientes a este género están asociados con enfermedades (*V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* y otros vibrios luminiscentes). Sin embargo, desde 1995 en la industria camaronera en Ecuador se ha reportado que especies caracterizadas como *V. alginolyticus* son ampliamente utilizados para el control de la alta incidencia de enfermedades en larvicultura.

Estudios realizados por Douillet (2000) demostraron que el uso de mezclas probióticas son más efectivas que las cepas independientes en el control de patógenos, debido a la mejor posibilidad de establecer poblaciones probióticas a pesar que las variaciones medio ambientales son mayores.

La efectividad de los probióticos depende largamente del modo de aplicación. Existen varios métodos para suministrar las preparaciones microbianas: biofilm, inmersión

(Stone,1998), alimento (Rengipat et al, 1998) y aplicación directa en tanques (Garriques & Arevalo, 1995; Moriarty, 1998). La aplicación en el alimento tiene varias ventajas sobre las otras técnicas: es aplicable para acuicultura extensiva e intensiva, y no requiere ninguna operación adicional del trabajo. La mayoría de los alimentos artificiales son fabricados bajo condiciones estériles, minimizando la potencial contaminación con un inóculo proveniente de esta fuente (Jones, 1998).

La supervivencia durante nuestro experimento se vio mermada por un brote de mancha blanca a la mitad del ciclo de cultivo, el cual afectó a todo el cultivo. Estudios preliminares (Balcazar 2002) del efecto de la mezcla de probióticos P62-P64 frente al virus de la Mancha Blanca (WSV), indicaron que existiría un efecto protector contra enfermedades, cuando el grado de infección es moderado. Esto podría ser atribuido al efecto inmunoestimulante de las cepas probióticas utilizadas. En estudios realizados por Gulliam (2001) se reportó que la cepa P64 mantiene el sistema inmunitario de los camarones más activo. Los estudios histopatológicos a los camarones de nuestro cultivo reportaron que el grado de infección fue severo durante la aparición del evento (datos no publicados), por lo que no podemos atribuir este efecto sobre nuestro experimento.

Nuestro estudio no reportó diferencias significativas en la tasa de supervivencia y producción final, que coinciden con los resultados obtenidos por Shariff *et al.* (2001) y Devaraja *et al.* (2002) en cultivos de *P. monodon* al emplear productos microbianos comerciales que contenían *Bacillus* spp. como parte de su composición.

Además, estudios realizados *in vivo* por Balcázar (2002) con la combinación de las cepas P62-P64 no reportaron diferencias estadísticamente significativas en supervivencia entre tratamiento control y probiótico, pero si en incremento de peso y peso promedio del animal. Similares resultados fueron obtenidos por Gullian (2001) en juveniles de *L. vannamei* con cepas *Bacillus* P64, *Vibrio* P62 y *V. alginolyticus* (cepa Ili) como probióticos, reportando diferencias significativas en crecimiento ( $P < 0.05$ ) respecto al control después de 20 días de ensayo.

De acuerdo con Conway (1990); Roques & Dussert (1991), cuando se ha suministrado probióticos en animales de cultivo, el incremento de peso observado puede estar relacionado de manera directa si son utilizados como fuente de alimento o indirectamente por producción de enzimas y/o vitaminas, asimilación de nutrientes, mejorando de esta manera el rango de crecimiento, supervivencia y tasa de conversión alimenticia (Douillet & Langdon, 1994; Garriques & Arevalo, 1995). Este hecho sugiere que a pesar de no ser estadísticamente significativo, el tratamiento probiótico reportó mejores peso promedio por animal y tasa de crecimiento por día comparado con el control; sin embargo el mecanismo de acción del probiótico en el experimento no fue definido. Por otro lado no podemos descartar el posible efecto relacionado con la densidad de animales presente en el tratamiento probiótico, debido a que ésta fue menor comparada con el tratamiento control. Esto permitiría un mejor aprovechamiento del alimento suministrado por los animales del cultivo.

*Caracterización de comunidades en estómago de camarón, sedimento y agua por metodología cultivo-dependiente*

El número promedio total de UFC de la flora bacteriana estimada en el camarón, agua y sedimento no mostró diferencias significativas entre los tratamientos probiótico y control. Sin embargo, el mayor valor promedio total de UFC. g<sup>-1</sup> y UFC. ml<sup>-1</sup> en muestras de estómago de camarón y agua de piscinas tratadas con probiótico comparado con el tratamiento control podría posiblemente estar asociado a la adición regular de probiótico (Shariff *et al.*, 2001). Similares resultados fueron obtenidos por Shariff *et al.* (2001) y Dalmin *et al.* (2001) en cultivo de *P. monodon* con productos comerciales microbianos que contenían *Bacillus* sp. entre sus componentes. Por otro lado Devaraja *et al.* (2002) reportó un incremento significativo (P<0.05) en el número promedio total de UFC en muestras de sedimento en cultivo de *P. monodon* a partir del uso de productos comerciales conteniendo el género *Bacillus* sp. entre sus componentes.

Nuestro experimento mostró en las piscinas control un valor relativamente alto de vibrios en las muestras de estómago de camarón y sedimento comparados con las piscinas con probiótico, sugiriendo un efecto inhibitor que podría ser provocado por la producción de sustancias microbicidas o un mecanismo de sustitución competitiva de los probióticos sobre estas bacterias *fide* Gullian (2001). Este hecho concuerda con estudios realizados por Shariff *et al.* (2001); Devaraja *et al.* (2002) y Dalmin *et al.* (2001) quienes evidenciaron un efecto de reducción de vibrios no significativo en piscinas tratadas con probióticos en cultivos de *P. monodon*.

De acuerdo con Brisou *et al.* (1975); Siavichay (1997); Vandenberghe *et al.* (1998); Conejero & Hedreyda (2003) las bacterias Gram-negativas son las que predominan en los ambientes marinos, constituyendo la mayor parte de la flora intestinal de crustáceos y de su entorno. Mientras que Hisbi *et al.* (2000) indica que las bacterias Gram-negativas forman parte de la flora normal de Litopenaeidos. Este hecho coincide con nuestros resultados, en los cuales, se determinó que existe un predominio de bacterias gram-negativas en muestras de estómago de camarón y sedimento en ambos tratamientos; pero con un incremento del contenido de bacterias Gram-positivas en muestras de estómago de camarón en el tratamiento con probiótico.

Alvarez *et al.* (2000) reportó que las bacterias Gram-negativas son las que predominan en el sedimento de los sistemas extensivos, constituyendo cerca de un 80% de la población. Mientras que Moriarty & Hayward (1982) indicaron que las bacterias Gram-positivas constituyen aproximadamente un 20% de la microbiota total presente en sedimento. Por otro lado, un estudio realizado por Pozo (2005, Datos no publicados) sobre la caracterización de poblaciones microbianas en sistemas de cultivo semi-intensivo de *L. vannamei* en piscinas camaroneras ubicadas en el sector de Palmar (Península de Santa Elena), reportó que la mayoría de microorganismos aislados en muestras de sedimento fueron Gram-negativos con porcentajes de 66 % y 67.8%, mientras que para Gram-positivos fueron de 32.2 % y 34 %.

Nuestro experimento, a pesar de no encontrarse diferencias significativas se obtuvieron resultados similares al reportar un predominio de bacterias gram-negativas en ambos tratamientos en las piscinas de la estación experimental del CENAIM. Se observó

mayor predominio del tratamiento control con 71.25 % y menor predominio del tratamiento con probiótico con 59.98 %, mientras que para microorganismos Gram-positivos el tratamiento con probiótico reportó un valor superior de 40.01 % y el control reportó valores de 28.74 % inferiores al reportado anteriormente por Pozo (2005, datos no publicados).

Posiblemente los resultados obtenidos en el tratamiento probiótico en nuestro experimento sugieran que una vez adicionadas las cepas P62-P64, éstas influyen sobre la diversidad bacteriana, posiblemente provocando inhibición de algunos grupos bacterianos, o bien ejerciendo algún mecanismo de sustitución competitiva, dejando libre nichos biológicos ocupados anteriormente por bacterias autóctonas que podrían haber sido ocupados por microorganismos Gram-positivos. Esto podría sugerir que la incorporación de altas concentraciones bacterianas es eficiente en la sustitución y modificación de la flora natural (Gullian, 2001).

De acuerdo con Sung *et al.* (1999) las especies de bacterias dominantes en piscinas camaroneras son microorganismos Gram-negativos del género *Vibrio*, tales como: *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus*, y los géneros *Aeromonas* y *Pseudomonas*. Estos géneros se encuentran en el agua, suelo del medio marino o estuarios y conformando parte de la flora intestinal de los camarones Litopenaeidos (Gomez-Gil *et al.*,1998; Moss *et al.*,1996; Álvarez 1983 *fide* Simoes; 2002; Yasuda & Kitao1980; Vandenberghe *et al.*, 1999). Los resultados en nuestro experimento reportaron dentro de los microorganismos Gram-negativos aislados, la presencia de los géneros *Vibrio* y *Aeromonas* pero no del género *Pseudomonas* formando parte de la

flora de estómago de camarón y sedimento en ambos tratamientos. La ausencia de este género podría ser atribuido a las condiciones de salinidad de los sistemas de cultivo, para las cuales este género no se encuentra adaptado.

El contenido bacteriano de *Vibrio* y *Aeromonas* del tratamiento con probiótico en muestras de estómago de camarón en nuestro experimento es inferior al reportado por Leño *et al.* (1998) en hepatopáncreas de *P. monodon*, en estómago de animales sanos de *L. vannamei* reportado por Gomez-Gil *et al.* (1998) y en la flora bacteriana en las branquias de *L. vannamei* reportado por Moss *et al.* (2000).

Cabe mencionar que nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Gullian (2001) y Balcazar (2002) quienes evaluaron *in vivo* las variedades P62 (*Vibrio* sp.) y P64 (*Bacillus* sp.) como probióticos mostrando que ejercen un efecto antagonista reduciendo la entrada de *V. harveyi*, reemplazando la microflora autóctona en *L. vannamei*, lo que podría afirmar que su adición altera paulatinamente la composición bacteriana, permitiendo el acceso a ciertos nichos por otras especies bacterianas .

Aunque los resultados de este trabajo no explica la naturaleza de la presencia de una abundancia relativa de otros grupos bacterianos en relación con los vibrios luego de la adición de probiótico, existe en la bibliografía información relevante que nos permite proponer ciertos criterios que pueden ayudar a esclarecer este fenómeno. Así, a pesar de no ser estadísticamente significativo, la disminución de los *Vibrio* spp. reportado en el tratamiento probiótico de muestras de sedimento y estómago de camarón pudo deberse al efecto inhibitor del *Bacillus* sp., y de *Vibrio* sp. posiblemente por producción de



sustancias microbicidas (Williams & Vickers,1986), bacteriocinas (Browdy,1998), sideróforos, lisozimas, proteasas, peróxido de hidrógeno o alteración de pH por la producción de ácidos orgánicos (Sugita *et al.*,1997). Además, tampoco se puede excluir una competencia por nutrientes en el medio que permita que ciertos microorganismos mejor adaptados ocupen nichos biológicos. Tampoco podemos descartar la posible incidencia de la flora exógena del medio circundante proveniente de las sucesivas reposiciones de agua, lo que permitiría una mayor riqueza y mejor abundancia relativa de diferentes grupos taxonómicos.

#### *Estimación de la diversidad bacteriana por medio de DGGE*

Douillet & Langdon (1993); Douillet & Langdon (1994); Riquelme *et al.* (2001) sugieren que el mantenimiento de una comunidad bacteriana natural y equilibrada puede beneficiar los cultivos larvarios de camarones *Penaeidos* (Alabi *et al.*, 1997). Sin embargo, no está claro qué nivel de diversidad es necesario para mantener la estabilidad de la comunidad. De acuerdo a Nogami & Maeda (1992); Garriques & Arévalo (1995) existe modificación de la flora bacteriana mediante el uso de probióticos, pero aun no se encuentran claramente definidos los cambios que se producen a nivel de la comunidad microbiana.

Se conoce relativamente muy poco acerca de los cambios producidos en la composición, estructura de las comunidades y poblaciones microbianas existentes en los sistemas de cultivo de camarones donde se emplea probióticos y cómo éste actúa sobre la diversidad microbiana. La literatura existente sobre diversidad, composición y

estructura de comunidades microbianas son estudios de tipo descriptivos que han sido dominantes junto con reportes de estudios de dinámica espacio-temporal de la biodiversidad microbiana en ecosistemas acuáticos (océanos, ríos, lagos) y terrestres (Morris *et al.*, 2002). No se dispone de información sobre la diversidad microbiana en los sistemas de cultivo de camarone en los cuales se ha aplicado probiótico.

La respuesta de la comunidad microbiana ante la presencia de los probióticos en los sistemas de cultivo de camarones es considerada desconocida debido a que el conocimiento de los microorganismos presentes en los sistemas de cultivos quedaba limitado a aquellos que podían obtenerse a partir de cultivo de laboratorio. En la actualidad esto podría cambiar con la aplicación de técnicas moléculares (entre las que se encuentra el método de DGGE) que permiten estudiar y comparar comunidades microbianas en diferentes ecosistemas acuáticos y terrestres (*vide* Nakatsu *et al.*, 2000). Sin embargo no había sido empleado como herramienta de estudio de diversidad microbiana en sistemas de cultivo de camarones. Es entonces su aplicación una herramienta innovadora y pionera en nuestro experimento para estimar la diversidad bacteriana y la estructura de las comunidades microbianas presentes en la microflora de estomago de camarón, sedimento y agua de cultivo. El uso de esta técnica permite aportar nueva información que podría ayudar a una mejor comprensión de la diversidad microbiana, composición y dinámica bacteriana presentes en piscinas de cultivo de camarón.

En nuestro estudio, los perfiles derivados de la aplicación de DGGE obtenidos a partir de secuencias de 16S rRNA bacteriano para las diferentes muestras de estómago de

camarón, sedimento y agua fueron utilizados como un medio para estimar la diversidad bacteriana y su intensidad relativa representó la dominancia de especies particulares dentro del sistema semi-intensivo (Calvo-Bado *et al.*, 2003). Siendo la obtención de los índices de diversidad de nuestro experimento es un punto de partida importante en el estudio de diversidad microbiana, estableciendo el escenario para futuros estudios, fundamentalmente con respecto a la dinámica de la comunidad bacteriana.

Al comparar los índices de diversidad por tipo de muestra en ambos tratamientos podemos observar que los índices obtenidos a partir de muestras de sedimento presentan en general los índices de diversidad más altos. Seguidos de las muestras de agua y por último las muestras de estómago de camarón, cuyos resultados difieren a lo reportado por Borbor, (2005, datos no publicados) en un estudio en cultivo semi-intensivo de *L. vannamei* con ayuda de técnicas moleculares basadas en análisis de 16S rRNA bacteriano, quien reportó índices superiores de riqueza, número y abundancia en muestras de agua comparados con muestras de sedimento, con excepción de la homogeneidad, donde indica que las muestras de sedimentos se encuentran distribuidas mas uniformemente.

Casamayor *et al.* (2000) citan que los ecosistemas pueden ser ricos en especies, pero la homogeneidad es muchas veces baja. En nuestro experimento el tratamiento con probiótico presentó una mejor distribución del número y abundancia de especies ( $H'$ ) en las muestras de sedimento y camarón, mientras que su homogeneidad (E) no se vió disminuida. Las muestras de agua del tratamiento con probiótico presentaron una distribución del número y abundancia de especies ( $H'$ ) y homogeneidad (E) similar con

el tratamiento control. Esto podría deberse a que los microorganismos presentes en el sedimento y en estómago de camarón habitan en un medio menos cambiante que el agua de cultivo.

Dado que la riqueza de especies presentes en cada muestreo de ambos tratamientos en muestras de estómago de camarón y sedimento es similar, las variaciones en los resultados ocurren únicamente con base en el número, abundancia y proporciones de sus especies. La variación del índice de Shannon-Weaver en nuestro estudio es el reflejo de que a medida que se realizaba el cultivo una o pocas especies dominaron durante el ciclo del cultivo en el tratamiento probiótico; mostrando que las especies bacterianas se distribuyeron en un mayor número de especies y las abundancias fueron más semejantes entre sí (más homogénea). Mientras que el tratamiento control mostró una tendencia de disminución de su diversidad hacia el término del cultivo, lo que podría deberse a que algunas especies bacterianas presentaron dominancia, denotando abundancias menos semejantes entre sí. Cabe mencionar que estos valores están relacionados directamente con la riqueza de especies, es decir que cuando la riqueza de especies fue alta, los valores de Shannon-Weaver fueron altos y esto a su vez se vio reflejado en la homogeneidad de especies (Evenness).

Estos resultados coinciden con las afirmaciones de Casamayor *et al.* (2000); Schauer, *et al.* (2003) quienes comentan que los cambios en la intensidad relativa de las bandas individuales de los perfiles generados por DGGE reflejan el incremento y disminución de la población bacteriana. Sin embargo cabe indicar que la homogeneidad puede estar influenciada por las condiciones presentes durante el ciclo del cultivo, parámetros

físicos y químicos como temperatura, salinidad, pH, oxígeno disuelto, SST, MOA y MOS.

Es importante mencionar que ninguna población es esencial en una comunidad con una diversidad alta; por eso, aunque se elimine una población, la estructura del conjunto no se altera pudiendo ocurrir modificaciones que pasen desapercibidas por los índices de diversidad.

Atlas & Bartha (2002) afirman que algunas interrelaciones en las que intervienen poblaciones microbianas son asociaciones débiles en las que una población microbiana puede desplazar a otra; otras con asociaciones fuertes en las que una población no puede desplazar a ninguna, lo que podría explicar lo observado en las imágenes de los geles compuestos de todos los muestreos en estómagos de camarón de ambos tratamientos. La sucesión poblacional podría ser la causa por la cual ciertas especies mejor adaptadas se acomodaron paulatinamente, reemplazando a aquellas especies pioneras en la colonización de los substratos libres que fueron inhibidas por el probiótico, ocasionando que no se observaran cambios en la diversidad bacteriana estimada por los índices.

Posiblemente el efecto de inhibición puede estar relacionado con la actividad antagónica de la combinación P62-P64 frente a ciertos *Vibrios* (Gullian, 2001; Balcazar, 2002). De igual manera, este efecto podría atribuirse a la acción de bactericinas que son activas contra otros microorganismos a concentraciones bajas. Se ha reportado que son producidas por microorganismos Gram-negativos (James *et al.*, 1992) y Gram-positivas

(Jack *et al*, 1995), lo que les conferiría ventaja competitiva sobre otras cepas que compiten por el mismo nicho ecológico y que de no ser por esta arma química, eliminarían competitivamente al organismo productor de bacteriocinas.

Sin embargo, no conocemos las especies que fueron desplazadas ni los mecanismos de acción por los que el probiótico modificó el hábitat favoreciendo el ingreso bacteriano o permitiendo el desarrollo de nuevas poblaciones, ni tampoco cuáles fueron las especies que ocuparon esos nichos.

La comparación de conglomerados obtenidos en el tiempo reveló diferencias en la composición filogenética de comunidades bacterianas presentes en el tratamiento control y probiótico. Estas diferencias podrían haber sido invisibles frente a los índices estándar de diversidad (i.e. índice de Shannon-Weaver) debido a que estos son sensibles cuando existen cambios en el número de especies y abundancia presente dentro de las comunidades (Martin, 2002).

A partir del diagrama de conglomerados de las muestras de estómago de camarón podemos determinar que la composición de la comunidad entre los tratamientos ha cambiado pero la diversidad no fue reducida durante la aplicación del probiótico y las comunidades bacterianas fueron más similares dentro de los tratamientos.

En las muestras de sedimento el cambio de la estructura de las comunidades bacterianas es menor comparada con la de estómago de camarón, resultando más similares las comunidades entre tratamientos. De igual manera las comunidades en

muestras de agua presentaron composición más similar entre tratamientos, posiblemente por poseer especies filogenéticamente más relacionadas. No podemos concluir respecto a si otras variables relacionadas al cultivo como el pH, oxígeno disuelto, salinidad, temperatura influyeron directamente sobre el comportamiento bacteriano ya que no presentaron diferencias entre los tratamientos.

La presencia dentro del sistema de cultivo de las cepas probióticas P62-P64, no pudo ser evidenciada debido a que ambas especies reportaron más de una banda en DGGE al poseer más de una copia de genes que codifican 16S rRNA, resultando similares a lo obtenido por Janse *et al.* (2003) en el caso de *Serratia entomophila*, una bacteria muy común en suelos de Nueva Zelanda, que tiene dos variantes de genes 16S resultando en bandas migratorias similares en el DGGE, detectándose dos o más bandas (Callaghan *et al.*, 2003).

Esto no implica que ambas especies no hayan podido adaptarse a las nuevas condiciones a las que fueron sometidas, utilizar los recursos disponibles y establecerse en algunos hábitats o mucho menos que no hayan cumplido con un rol dentro del sistema de cultivo. Se requiere realizar secuenciación de los aislados de ADN bacterianos obtenidos que aportaría información relevante para definir taxonómicamente la comunidad bacteriana dentro de los sistemas de cultivo.

En nuestro experimento el usar la combinación de amplificación de segmentos de 16S rDNA por PCR y la electroforesis por DGGE nos permitió distinguir diferencias en la composición de las comunidades microbianas en las muestras de estómago de camarón,

sedimento y agua presentes en el tratamiento control y probiótico. El método de DGGE fue particularmente útil por constituirse en un método rápido, y eficaz de identificación bacteriana. Su aplicación fue un paso inicial en el estudio ecológico de comunidades microbianas en sistemas de cultivo de camarón. Sin embargo no podemos descartar la información complementaria obtenida a partir de los métodos cultivo dependiente.

Cabe destacar que la combinación de los métodos cultivo dependiente y cultivo independiente permitieron estudiar la respuesta del medio bacteriano que conforma la microflora en el sistema de cultivo semi-intensivo de *L. vannamei*. Destacando el uso de probióticos como una manera segura de modificar la presencia de ciertos microorganismos en el ecosistema. Sin embargo, se requiere de mayores estudios complementados con la secuenciación para conocer sobre cuáles microorganismos están ejerciendo su efecto así como otras variables directa o indirectamente relacionadas con el cultivo que puedan afectar su acción y finalmente estudios para conocer los mecanismos que emplean para adaptarse dentro del medio.

De cualquier manera, aún existen importantes preguntas que resolver en cuanto a la composición y estructura de las comunidades microbianas, los cambios que se producen en dichas comunidades en respuesta a la presencia de probióticos y otros factores relacionados con el cultivo, y finalmente el papel funcional de los diferentes tipos de microorganismos que integran la comunidad.



## **6. CONCLUSIONES**

1. El empleo de las metodologías cultivo-dependientes suministró información complementaria a la metodología cultivo independiente.
2. La técnica de cultivo en placa mostró una reducción en la presencia de *Vibrio* en las muestras de camarón y sedimento, pero no se encontró diferencias en número total bacteriano entre ambos tratamientos.
3. A pesar de evidenciarse una reducción de *Vibrio* en el animal en el tratamiento probiótico, los índices de diversidad no mostraron diferencias con respecto al tratamiento control.
4. En muestras de estómago de camarón y sedimento los microorganismos Gram-negativos fueron predominantes.
5. Los géneros *Vibrio* y *Aeromonas* fueron dominantes en ambos tratamientos. No se evidenció la presencia del género *Pseudomonas*.
6. La aplicación innovadora de DGGE para estimar la diversidad bacteriana permitió un avance en el conocimiento de la estructura, composición y dinámica bacteriana presente en piscinas de cultivo de camarones.
7. El método de DGGE fue particularmente útil por constituirse en un método rápido y eficaz de identificación bacteriana. Su aplicación fue un paso inicial en el estudio ecológico de comunidades microbianas en sistemas de cultivo de camarón.
8. La combinación de amplificación de segmentos de 16S rDNA por PCR y DGGE mostró diferencias en la composición, dinámica y estructura de las comunidades microbianas en las muestras de estómago de camarón, sedimento y agua presentes en el tratamiento control y probiótico.

9. Los índices de diversidad mostraron que las muestras de sedimento presentan una diversidad mayor que las muestras de agua y las muestras de estómago de camarón.
10. Los geles compuestos permitieron observar cambios en la estructura bacteriana presente en el estómago de camarón
11. El diagrama de cluster de los diferentes muestreos permitió determinar que la estructura de las comunidades bacterianas entre los tratamientos cambió a pesar de que la diversidad no fue reducida durante la aplicación del probiótico.
12. No pudo ser determinada con certeza la presencia de las cepas bacterianas P62 y P64 debido a su característica de contener más de un operon para genes 16S rRNA, lo que generó varias bandas en los geles.

## **7. RECOMENDACIONES**

1. Purificar y secuenciar las bandas dominantes de 16S rRNA bacteriano obtenidos por DGGE para identificar las diferentes especies bacterianas dominantes presentes en el cultivo.
2. Evaluar los mecanismos de acción de los probióticos sobre los parámetros de calidad de agua y determinar si podrían mejorar las condiciones de cultivo actuando como agentes biorremediadores.
3. Evaluar formas alternativas para la introducción del probiótico en el alimento, que permitan mejorar la viabilidad y estabilidad de la preparación.
4. Estudiar el efecto de la combinación P62-P64 sobre otras especies acuícolas cultivadas en piscinas.
5. Incrementar la frecuencia de medición de los parámetros abióticos y bióticos para conseguir establecer correlaciones con los niveles bacterianos observados en una vez aplicado el probiótico en los sistemas de cultivo a través del tiempo.
6. Realizar un estudio sobre el efecto del probiótico durante dos ciclos de cultivo: uno en la estación de invierno y el otro en la estación de verano en piscinas de engorde, para observar la diferencia estacional de la diversidad microbiana y cómo ésta puede ser afectada por los factores ambientales propios de cada época para obtener una mejor idea del comportamiento microbiano.
7. Evaluar otras cepas bacterianas que presentan potencial para ser empleados como probióticos en piscinas de engorde.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, G.1993. Aplicación de probióticos en la Acuicultura . En.Cruz, L. Ricque, D & Mendoza, R., (ed.). Avances en Nutrición Acuícola. Memorias del Primer Symposium Internacional de Nutrición y Tecnologías de alimentos para Acuicultura. Nuevo León, México
- Alabi, A. O., Yudatu, E., Jones.D.A. 1997. Bacterial Levels in *Penaeid* Larval Cultures. Manila: Asian Fisheries Society.
- Alvarez, J., R. Austin, Alvarez, A. & Agurto, C. 2000. Especies de *Vibrios* y *Aeromonas* aislados del intestino de camarones marinos silvestres y cultivados en Venezuela. Veterinaria Tropical. 1, 5-27.
- Amann, R. I, Ludwig W. & Schleifer K., H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol.Rev. 59,143-169.
- Araya, R. A., Jorquera, M. A. & Riquelme C. E. 1999. Association of bacteria to the life cycle of *Argopecten purpuratus*. Revista Chilena de Historia Natural. 72 ,261-271.
- Atlas, M. R. & Bartha R. 2002. Evolución microbiana y biodiversidad. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. Addison Wesley. Pearson Educación, S. A., Madrid. Cuarta Edición. 37 p.
- Austin B., Stuckey L.F., Robertson P.A.W., Effendi I. & Griffith D.R.W. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalli*. Journal of Fish Diseases. 8,93-96.

- Austin B. & Allen, D.A. 1982. Microbiology of laboratory-hatched brine shrimp (*Artemia*). *Aquaculture*. 26,369-383.
- Bachère, E. 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*. 191, 3-11.
- Balcazar, J. 2002. Evaluación de Mezcla de cepas probióticas en juveniles de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Grado. Universidad de Machala. Facultad de Ciencias de Agropecuaria Escuela de Acuicultura.
- Baticados, M. C. L, Lavilla-Pitogo, C. R., Cruz-Lacierda, E. R, de la Pena, L. D. L. Sunaz, N. A. 1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Dis. Aquat. Org.* 9,133-139.
- Bergey, 1994. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Noel. R. Krieg (ed.). Editorial Williams & Wilkins. Baltimore. London.
- Blackburn, T. H. 1987. Role and impact anaerobic microbial processes in aquatic systems. In: D.J.W Moriarty and R.S.V. Pullin, (ed.). *Detritus and Microbial Ecology in Aquaculture, ICLARM Conference Proceeding 13: International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines*, 32-53.
- Bonde, G. J. 1977. Bacterial indication of water pollution. M. R. Drop & H. W. Jannasch (ed.). *Advances in aquatic Microbiology*. Vol.1. Academic Press, London, England, 303-306.
- Brisou, J. C., C. Tysset & Rautlin de la Roy and R. Curcier. 1975. Marine bacteria especially micrococcaceae. *J. Gen. Microbiol.*, 41: 23.
- Brock, T. 1987. The study of microorganisms *in situ*: Progress and Problems. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 41,1-17.

- Browdy, C. 1998. Recent developments in penaeid broodstock and seed production technologies: improving the outlook for superior captive stocks. *Aquaculture* 164, 3-21.
- Callaghan M. O., Gerard, E. M., Heilig G. H. J., Zhang H., Jackson T. A., & Glare, T. R. 2003. Denaturing gradient gel electrophoresis a tool for plant protection research. *New Zealand Plant Protection*. 56,143-150.
- Calvo – Bado, L. A., Pettitt T. R., Parsons N., Petch G. M., Morgan J. A. & Whipps J. M.. 2003. Spatial and Temporal Analysis of the Microbial Community in Slow Sand Filters Used for Treating Horticultural Irrigation Water. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 2116 – 2125.
- Carrasco, L. L. 2004. Métodos de estudio de los cambios estructurales en ecosistemas microbianos edáficos y su aplicación ambiental. *Ciencia al Día Internacional*. 5, 1 – 24.
- Casamayor, E. O., Schaefer H., Bañeras L., Pedrós – Alió C. & Muyzer G. 2000. Identification of and Spatio – Temporal Differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: Comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 499 – 508.
- Castle, D. & Kirchman, L. D. 2004. Composition of estuarine bacterial communities assessed by denaturing gradient gel electrophoresis and fluorescence *in situ* hybridization. *Limnology and Oceanography: Methods*. 2, 303-314.
- Castro, C. F. 1989. Manual Práctico de Bacteriología Marina, Laboratorio de larvas de camarón. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar ESPOL. Guayaquil – Ecuador.

- Colwell, R. R., 1984. *Vibrio* in the Environment. Wiley, New York.
- Conejero, M. J. U., Hedreyda, C. T. 2003. Isolation of partial toxrgene of *Vibrio harveyi* and design of toxr - targeted PCR primers for species detection. J. Appl. Microbiol. 95, 602 – 611.
- Conway, P.1990. Effect of probiotic administration and dietary composition on gastrointestinal microflora of turbot. Annual report 1990/91, University of Goteborg, Sweden. p. 1-8.
- Dalmin G, Kathiresan K, Purushothaman A. 2001. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. Indian Journal of Experimental Biology. 39, 939-942.
- DeSchrijver, R. & Ollivier, F. 2000. Protein digestión in juvenile turbot(*Scophthalmus maximus*) and effects of dietary administrations of *Vibrio proteolyticus*. Aquaculture.186, 107-116.
- Devaraja T. N., Yusoff F.M., Shariff M.,2002. Changes in bacterial populations and shrimp production in ponds treated with comercial microbial products.Aquaculture 206,245-256.
- DeWettinck, T., Hulsborsch, W., VanHege, K., Top, E. M., Verstraete, W. 2001. Molecular fingerprinting of bacerial populations in groundwater and bottled mineral water. Appl. Microbial. Biotechnol. 57,412-418.
- Díaz, R., Gamaza, C., López-Goñi, I. Masson. 2000. Manual Práctico de Microbiología.Segunda Edición. Barcelona-España.
- Dinesh, K., Chan W., Lim T. & Phang V. 1995. RAPD markers in fishes: an evaluation of resolution and reproducibility. Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology . 3, 112-118.

- Direkbusarakom, S., Yoshimizu, M., Ezura, Y., Ruangpan, L., Danayadal, Y. 1998. *Vibrio spp.* the dominant flora in shrimp hatchery against some fish pathogenic viruses. *J.Mar.Biotechnol.* 6,266-267.
- Douillet, P.2000. Bacterial additivars that consistently enhance rotifer growth under synxenic culture conditions 2. Use of single and multiple bacterial probiotics. *Aquaculture.* 182, 241-248.
- Douillet, P. 1998. Aplicación de la biotecnología en el control de la calidad de agua. En *Memorias del II Simposium Internacional de Acuicultura.* Mazatjan, Sinaloa, México.
- Douillet, P. A. & Langdon, C. J. 1994. Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture.* 119,25-40.
- Felske, A., Wolterink, A., Van Lis, R., Akkermans, A. D. L. Phylogeny of the main bacterial 16 S rRNA sequences in Drentse A grassland soils (The Netherlands). . *Applied and Environmental Microbiology.* 64:871-879
- Ferrari, V, C & Hollibaugh, J. T. 1999. Distribution of microbial assemblages in the central Artic ocean basin studied by PCR/DGGE: analisis of a large data set. *Hidrobiology.* 401,55-68.
- Fry, J.C.1987.Functional roles of the mayor groups of bacteria associated with detritus. In: D. J. W.Moriarty and R.S.V. Pullin (Editors). *Detritus and Microbial Ecology in Aquaculture, ICLARM Conference Proceeding 13.* International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines, pp.83-122.
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals-a review. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.



- Garrigues, D., Arévalo G. 1995. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. In: Browdy, C.L., Hopkins, J.S. (ed.), Swimming Through Troubled Water. Proceedings of the special session on shrimp farming, Aquaculture '95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, 53-59.
- Gatesoupe, F. J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*. 180, 147-165
- Gatesoupe, F. J. 1993. Elevage Larvaire du Turbot: Les Probiotiques la Rescousse. *Aqua.Reveu*. 48, 25-28.
- Gómez-Gil, B., Roque, A & Velasco-Blanco, G. 2002. Culture of *Vibrio alginolyticus* C7b, a potential probiotic bacterium, with the microalga *Chaetoceros muelleri*. *Aquaculture*. 211, 43-48.
- Gómez-Gil B., Roque A., Turnbull J. F. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*. 191, 259-270.
- Gómez, G. B, L. T. Mayen, A. Roque, JF. Turnbull, V. Inglis, A. L. Guerra. 1998. Species of vibrios isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 163, 1 - 9.
- Gram, L., Lovold, T., Melchiorson, J., Spanggaard, B. 2001. In vitro antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. *Aquaculture*. 199, 1-11.
- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen. T. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 969-973.
- Griffith, D. R. W. 1995. Microbiology and the role of Probiotics in Ecuadorian shrimp hatcheries. In: P. Lavens, E. Jaspers, I. Roclants (ed.). Larvi'95-Fish and Shellfish

- Larvicultura Symposium European Aquaculture Society, Special Publication Gent, Belgium.
- Gulliam, M., Thompson, F., Rodriguez J. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 233, 1-14.
- Gulliam, K. M. 2001. Estudio del efecto inmuno estimulante de bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Penaeus vannamei*. Tesis de Magíster en Ciencias, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.
- Guzmán G. A. & Valle A. F. 1999. Probióticos. Una Herramienta alternativa para los Acuacultores. Enfoque Acuícola. pp-1-6.
- Guzmán G. A. 1992. Aplicación de probióticos en la Acuicultura. Avances en Nutrición Acuícola I. Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, 11 al 13 de noviembre de 1992. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México., 332-337.
- Hamied, A., Sakata, T., Kakimoto, D. 1978. Microflora in the alimentary tract of grey mullet: 2. A comparison of the mullet intestinal microflora in fresh and sea water. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 44, 53-57.
- Hammed, A. S. 1995. Suscetibility of three *Penaeus* species to a *Vibrio campbellii*-like Bacterium. *Journal of the World Aquaculture Society.* 26, 310-315.
- Havenaar, R., Ten, Brink, B., Huis in't Veld, J H J. 1992. Selection of strains for probiotic use. In: R. Fuller (ed), *Probiotics: the scientific basis*, Chapman and Hall, London, 209-224.

- Hisbi, D., J. Vandenberghe, R. Robles, L. Verdonck, J. Swings & P. Sorgeloos. 2000. Characterisation of *Vibrio* and related bacteria associated with shrimp *Penaeus monodon* larvae in Indonesia. *Asia Fisheries Science*.13: 57 - 64.
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M. & Pace, N. R. 1998. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.*180, 4765-4774.
- Irianto A. & Austin B. 2002. Probiotics in Aquaculture. *Journal of Fish Diseases*. 25,633-642.
- Jack, R.W., Tagg, J.R, & Ray, B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*. 59, 171-200.
- James, R., Lazdunski, C. & Pattus, F. (eds.)1992. Bacteriocins, Microcins, and Lantibiotics. Springer-Verlag, Nueva York.
- Janse, I., Meima, Kardinaal M., W. E. A, Zwart G., 2003. High- Resolution Differentiation of Cyanobacteria by using rRNA-Internal Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 6634-6643.
- Jones, D.A. 1998. Crustacean Larval microparticulate diets. *Reviews in Fisheries and a Science*. 6,41-54.
- Jonson, S. 1989. Handbook of Shrimp Diseases. Aquaculture. Department of Wild Life and Fisheries Science. Texas ASLM University.
- Kawai, M, M., Matsutera, E., Kanda, H., Yamaguchi, N., Tani, K & Nasu, M. 2002. 16 S Ribosomal DNA. Based Analysis of Bacterial Diversity in Purified Water Used in Pharmaceutical Manufacturing Processes by PCT and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 699-704.

- Kennedy, S.B., Tucker, J. W., Neidig, C. L., Vermeer, G. K., Cooper, V.R., Jarrell, J. L., Sennett, D. G. 1998. Bacterial management strategies for stock enhancement of warm water marine fish: a case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). *Bull. Mar. Sci.* 62, 573-588.
- Kilb, B., Kuhlmann, B., Eschweiler, B., Preu, B. G., Ziemann, E., Schattler, U. 1998. Community structures of different ground water habitats investigated using the methods of molecular biology. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 26, 349-354.
- Kirk, J. L., L. Beaudette, M. Mart, P. Moutoglis, J. Klironomos, H. Lee, J. Trevors. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods.* 58, 169 – 188
- Kisand, V. & Wikner J. .2003. Combining Culture-Dependent and Independent Methodologies for Estimation of Richness of Estuarine Bacterioplankton Consuming of Riverine Dissolved Organic Matter. *Applied and Environmental Microbiology.* 69, 3607-3616.
- Lighthner, D. V. 1992. Shrimp Pathology : Major diseases of concern to the farming industry in the Americas. En Memoria del primer congreso Ecuatoriano de acuicultura. Guayaquil-Ecuador, 1992. 177 - 196.
- Link, C, K. 1995. Progression of intensive marine shrimp culture in Thailand, In C.L. Browdy and J.S. Hopkins (eds.), *Swimming through troubled water. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. Aquaculture 95.* World Aquaculture Society, Baton Rouge, La. 13-23
- Link et al. 1995. *Theor. Appl. Genet.* 90, 27-32.
- Lindstrom, E. S. 1998. Bacterioplankton community composition in a boreal forest lake. *FEMS. Microbial. Ecol.* 27, 163-174.

- Maeda, M & Liao I. Chiu. 1992. Effect of bacterial population on the growth of a prawn larva, *Penaeus monodon*. Bull.Natl.Res. Inst.Aquaculture 21,25-29.
- Martin, A. 2002. Phylogenetic Approaches for Describing and Comparing the Diversity of Microbial Communities. Applied and Environmental Microbiology. 68,3673 – 3682.
- Métodos de Laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio Cholerae*, 1994. OPS-CDC.
- Microbiology Manual. 2000. System Quality Management. Merck Kga. pp.192-194.
- Moeseneder, M. M., Arrieta, J. M., Muyzer, G., Winter, C. & Herndl, G. J. 1999. Optimization of Terminal-Restriction Fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 65, 3518-3525.
- Mohney, L. L., Lightner, D. V., Bell, T. A. 1994. An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond reared *Penaeus vannamei* Bonne (Crustacea: Decapoda). Journal of world Aquaculture Society. 25,116-125.
- Morales, I. 1992. Observaciones sobre el síndrome de descamación del epitelio digestivo "Bolitas" en larvas de *Penaeus vannamei* en Ecuador. Memorias del Primer Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. Guayaquil, Ecuador, 203-207.
- Moriarty, D. J. W. 1999. Diseases control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. In: Microbial Biosystems: New Frontiers. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. C.R.Bell, M. Brylinsky & P.Johnson-Green (ed.). Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- Moriarty, D. J. W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture. 164, 351 - 358.

- Moriarty, D. J. W. 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture*. 151, 333-349.
- Moriarty, D. J. W., 1990. Interactions of microorganisms and aquatic animals, particularly the nutritional role of the gut flora. IN: Lésel, R.(eds.), *Microbiology in Poecilotherms*. Elsevier, Amsterdam., 217-222 .
- Moriarty, D. J. W., Hayward, A. C. 1982. Ultrastructure of bacteria and the proportion of Gram negative bacteria in marine sediments. *Microb. Ecology*. 8, 1-14.
- Morris, C.E., Bardin, M., Berge, O., Frey-Klett, F., Fromin, N., Girardin, H., Guinebretiere M., Lebaron, P., Thiéry, J.M. & Troussellier, M. 2002. Microbial Biodiversity: Approaches to Experimental Design and Hypothesis Testing in Primary Scientific Literature from 1975 to 1999. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. pp. 592-616.
- Moss, S., Leamaster, B. R. & Sweeney, J. N. 2000. Relative abundance and species composition of Gram-negative, aerobic bacteria associated with the gut of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in oligotrophic well water and eutrophic pond water. *J World Aquac Soc.* 31, 255-263.
- Moss, S. M., LeMaster, B. R., Sweeney, J. N. 1996. Effects of water source on gut microflora in juvenile white shrimp *Penaeus vannamei*. WAS Meeting 263. WAS Book of Abstract.
- Murray, A. E., Hollibaugh, J. T & Orrego, C. 1996. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 2676-2680.

- Muyzer, G, MdeWaal, E. C, Vitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase Chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA . . Applied and Environmental Microbiology . 59,695-700.
- Muyzer, G. & Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gelelectrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie Leeuwenhoek. 73, 127-141.
- Nakatsu, C.H., Torsvick, V. & Ovreas, L.2000.Soil Community Analysis Using DGGE of 16S rDNA Polymerase Chain Reaction Products. Published in Soil Sci. Soc. Am.J.64, 1382-1388.
- Nash, G. L. 1990. *Penaeus monodon* grow-out diseases. In: M.B.New, H.de Saram and T.Singh (ed.). Aquatech Conference 1990: Technical and Economic Aspects of Shrimp Farming.Infofish, Kuala Lumpur, 302p.
- Nedoluha, P. C., Westhoff, D. 1995. Microbiological analysis of striped bass (*Morone saxatilis*)grown in flow-through tanks.J.Food Prot. 58,1363-1368.
- Nogami, K & Maeda, M. 1992. Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49, 2373-2376.
- Norrell, S. & Messley, K. 1997. Microbiology. Laboratory manual. Principles and applications. Prentice – Hall, Inc. A Simon and Schuster de Viacom Company. New Jersey, USA.
- Olafsen, J. A. 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. Aquaculture. 200, 223-247.
- Pace, N. R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science . 276,734-740.

- Parker, R. B. 1974. Probiotics. The other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition Health*. 29, 4-8.
- Pianas, M., & Cunha, I. 1999. Larviculture of Marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture*. 88,179-188.
- Pintado, J., Guyot, P. P., Ampe, F. 2003. Múltiple competitive PCR-DGGE as a tool for quantifying and profiling defined mixed cultures of Lactic Acid bacteria during production of probiotics from complex polysaccharides. *Journal of Applied Microbiology*.95, 921-933.
- Queiroz, J. F. & Boyd, C. E. 1998. Effects of a bacterial inoculum in channel catfish ponds. *J.World Aquacult. Soc.* 29,67-73.
- Rabinowitz J. C & Roberts, M. 1986. Translational barriers limiting expression of *E.coli* genes in *Bacillus* and other Gram-positive organisms. In: Levy, S. B, Novick, R. P(ed.). *Banbury Report 24: Antibiotic Resistance Genes: Ecology, Transfer and Expression*.Cold Spring Harbour Laboratory. pp. 297-312.
- Ranjard, L., Poly, F., Nazaret, S. 2000. Monitoring complex bacterial communities using culture – independent molecular techniques: application to soil environment. *Res. Microbial*. 151, 167 – 177.
- Raskin, L., Capman, W. C., Sharp, R., Poulsen, L. K., Stahl, D. A.1997. Molecular ecology of gastrointestinal ecosystems. In: Jackie, R. I., Withe, B. A., Isaacson, R. E.(ed.). *Gastrointestinal Microbiology, Vol.2, Gastrointestinal Microbes and Host Interactions*.Chapman & May Microbiology Series, International Thomson Publishing, New York. pp. 243-298.



- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S. Menasaveta, P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiotic bacterium (*Bacillus S11*) Aquaculture. 191: 271 – 288.
- Rengpipat, S., Phianphak, W., Menasveta, P., Pyatirotitivo Rakul, S. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon*, survival and growth. Aquaculture. 167, 301-313.
- Riemann, L., A. Winding. 2001. Community Dynamics of free-living and Particle-associated Bacterial Assemblages during a Freshwater Phytoplankton Bloom. Microbial Ecology. 42, 274 – 285.
- Riemann, L., Steward, G. F., Fandino, L. B., Campbell, L., Landry, M. R. & Azam, F. 1999. Bacterial community composition during two consecutive NE Monsoon periods in the Arabian Sea studied by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of rRNA genes. Deep-Sea Res. Part II-Topical Stud. Oceanogr. 46, 1791-1811.
- Riquelme, C., Jorquera, M. A., Rojas, A. I., Avendano, R. E., Reyes, N. 2001. Addition of inhibitor producing bacteria to mass cultures of *Argopecten purpuratus* larvae (Lamarck, 1819). Aquaculture. 192, 111-119.
- Riquelme C., Araya R. & Escribano R. 2000. Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culture systems of the Chilean scallop. Aquaculture. 181, 25-36.
- Riquelme, C., R. Araya, N. Vergara, A. Rojas, M. Guaita & M. Candia. 1997. Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). Aquaculture. 154, 17-26.

- Robertson P. A. W., O'Dowd C., Williams P. & Austin B. 2000. Use of *Carnobacterium sp.* as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*). *Aquaculture*. 185, 235-243.
- Rodicio, M. & Mendoza, M. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas. Microbiología Clínica*. 22(4), 238-245.
- Rodríguez, J. & Le Moullac, G., 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture* .191 : 109-119.
- Rombaut, G., G. Suantika, N. Boon, S. Maertens, P. Dhert, E. Top, P. Sorgeloos, W. Verstraete. 2001. Monitoring of the evolving diversity of the microbial community present in rotifer cultures. *Aquaculture*. 198, 237 – 252.
- Roques, C. & Dussert, L. 1991. The interest of live yeast supplementation in aquaculture and its providing effects on feed conversión. *Eur. Aquacult. Soc., Spec. Publ.* 14,37-45
- Rosello-Mora, R., Thamdrup, B., Schäfer, H., Séller, R. & Amann, R. 1999. The response of the microbial community of marine sediments to organic carbon input under anaerobic conditions. *Sist. Appl.Microbial*. 22,237-248.
- Rozsak,D.B. & Colwell,R.R.2002. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. . *Applied and Environmental Microbiology*. Rev. 51, 365-379.
- Sadhukhan, P. C., Ghosh, S., Chaudhuri, J., Ghosh, D. K., Mandal A. 1997. Mercury and organomercurial resistance in bacteria isolated from freshwater fish of wetland fisheries around Calcutta.*Environ. Pollut.* 97,71-78.

- Schaefer, H & Muyzer G. 2001. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis in Marine Microbial Ecology. *Methods in microbiology*. 30: 425 – 466.
- Schauer, M., Balagué V., Pedrós-Alió C., Massana R. 2003. Seasonal changes in the taxonomic composition of bacterioplankton in a coastal oligotrophic system. *Aquatic Microbial Ecology*. 31, 163 – 174.
- Sharmita, R., Abraham, T.J., Sundaray, V. 1996. Bacterial flora of semi-intensive pond reared. *Penaeus indicus* (H.Milne Edwards) and the environment. *J. Aquaculture.Trop*. 11, 193-203.
- Shariff, M., Yusoff, F. M., Devaraja, T. N. & Srinivasa Rao, P. S. 2001. The effectiveness of a comercial microbial product in poorly prepared tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius), ponds. *Aquaculture Research*. 32,181-187.
- Siavichay, K. 1997. Aplicación de nuevas técnicas para el seguimiento bacteriológico en un laboratorio de larvas de camarón. Tesis de Acuicultor. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. ESPOL. Guayaquil Ecuador.
- Sigler, W.V., Miniaci, C & Zeyer, J. 2004. Electrophoresis time impacts the denaturing gradient gel electrophoresis-based assessment of bacterial community structure. *Journal of Microbiological Methods*. Elsevier.57,17-22.
- Simoës, N., Jones, D., Soto-Rodríguez, S., Roque, A., Gómez-Gil, B. 2002. Las bacterias en el inicio de la alimentación exógena en larvas de camarones Penaeidos: Efectos de la calidad del agua, tasas de ingestión y rutas de colonización del tracto digestivo. In: Cruz-Suarez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Caxiola-Cortés, M.G. Simoës, N.(Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.

- Skjermo J. & Vadstein O. 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture*.177, 333-343.
- Smalla, K., N. Cresswell, L. C. Mendonca – Hagler, A. Wolters, & Van Elsas J. D. 1993. Rapid DNA extraccion protocol from soil for polymerase chain reaction – mediated amplification. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 78 – 85.
- Smit, E., P. Leeflang, & Wnars K. 1997. Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23, 249 – 261.
- Smith, V. H.1993. Implications of resource-ratio theory for microbial ecology.*Limnol Oceanogr* 38, 239-249.
- Sotomayor, M. 2000. Obtención de un modelo de infección experimental en juveniles de *Penaeus vannamei*, con el *Vibrio vulnificus*. Tesis de Grado. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. ESPOL. Guayaquil Ecuador.
- Staley, J. & Konopka, A. 1985. Measurements of *in situ* activities of nonphotosynthstic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* 39,321-346.
- Strom, E., Olafsen, J. A. 1990. The indigenous microflora of wild-captured juvenile cod in net-pen rearing. In: Lésel, R.(Ed.). *Microbiology in Poecilotherms*. Elsevier, Amsterdam, pp.181-185.
- Stone, C.W. 1998. Yeast product in the Feed Industry, a ractical Guide for Feed Professionals. Diamond V, Mills, Inc-Bulletin, Cedar Rapids, IA, 52407, USA,PP,1-16.

- Subasinghe, R.1997. Fish Health and quarantine. In Review of the State of the World Aquaculture FAO Fisheries circular No.886. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. pp.45-49
- Sugita, H., Hirose, Y., Matsuo, N., Deguchi, Y. 1998. Production of the antibacterial substance by *Bacillus sp.* strain NM12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture*. 165,269-280.
- Sugita, H., Hirose, Y., Matsuo, N., Iwato, M., Deguchi, Y.1997. *Vibrio sp.* strain NM10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscicida*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63,4986 - 4989.
- Sugita, H., Matsuo, N., Shibuya, K., Deguchi, Y.1996. Production of antibacterial substances by intestinal bacteria isolated from coastal crab and fish species. *J. Mar. Biotechnol.*4,220-223.
- Sugita, H., Tanaami, H., Kobashi, T., Deguchi, Y. 1981. Bacterial flora of coastal bivalves, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 47,655-661.
- Sung, H. H., Li, H. C., Tsai, F. M., Ting, Y. Y., Chao, W. L. 1999. Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. *J. Exp. Mar. Ecol.* 236, 261-271.
- Tanasomwang, V., Nakai, T. Nishimura, Y., Muroga, K. 1998. *Vibrio* inhibiting marine bacteria isolated from black tiger shrimp hatchery. *Fish Pathology*. 35(5), 459-466.
- Temmerman, R., I. Scheirlinck, G. Muys & Swings J. 2003. Culture – Independent Analysis of Probiotic Products by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 220 – 226.

- Torsvik, V., Goksoyr, J. & Daae, F.L., 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. .  
Applied and Environmental Microbiology. 56,782-787.
- Vandenberghe, J., Verdonck, L., Robles-Arozarena, R., Rivera, G., Bolland, A.,  
Balladares, M., Gomez-Gil, B., Calderon, J., Sorgeloos, P., Swings, J. 1999. *Vibrios*  
associated with *Litopenaeus vannamei* Larvae, Post-larvae, Broodstock, and  
Hatchery Probiotics. . Applied and Environmental Microbiology. pp. 2592-2597.
- Vandenberghe, J., Lib Y., Verdonck L., Lib J., Xub H.S. & Swings J. 1998. *Vibrios*  
associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: decapoda) larvae in chinensis shrimp  
hatcheries. Aquaculture. 169,121-132.
- Vaseeharan, B. & Ramasamy, P. 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus*  
*subtilis* BT23, a possible treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Letters  
in Applied Microbiology. 36,83-87.
- Verschuere Laurent, Rombaut Geert, Sorgeloos Patrick, Verstraete Willy. 2000.  
Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. Microbiology and  
Molecular Biology Reviews. 64, 655-671.
- Wallner, G., Fuchs, B., Spring, S., Beisker, W., Amann, R. 1997. Flow sorting of  
microorganisms for molecular analysis. Appl. Environ. Microbiol. 63, 4223-4231.
- Wang, X.-H., Ji W.-S & Xu H.-S. 1999. Application of Probiotic. Aiken Murray  
Corp.(Internet)
- Watve, M. G. & Gangal, R. M. 1996. Problems in Measuring Bacterial Diversity and  
Possible Solution. Applied and Environmental Microbiology. pp. 4299-4301.
- Williams, S. T. & Vickers, J. C. 1986. The ecology of antibiotic production. Microb.  
Ecol. 12,43-52.

- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. 1990. Towards a natural aystem of organisms: Proposal for the domains Archaea,Bacteria, and Eucarya. Proceedings of the National Academy of Science of the USA. 87, 4576-4579.
- Yasuda, K. & Kitao, T.1980. Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *Penaeus japonicus* Bate. Aquaculture 19,229-234.
- Zherdmant, M.T., San Miguel, L., Serrano, J., Donoso, E., Mialhe, E. 1997. Estudio y Utilización de Probióticos en el Ecuador. Panorama Acuícola, 2-28.
- Zwart, G., Huismans, R., Agtirveld, M. P van, Van de Peer & De Rijk, P.Eenhoorn, H., Muyzer, G., Hanner E.J. van, Gons, H. J. Laanbrock, H. J. 1998. Divergent members of the bacterial división Verrucomicrobiales in a temperate freshwater lake. FEMS. Microbial Ecol. 25,159-169.

## ANEXO # 1

EXTRACCION DE ADN BACTERIANO (Técnica según Smalla *et al.*, 1993).

- Colocar 1 ml de sobrenadante separado de las muestras de sedimento en tubos de 1,5 ml estériles, autoclavados y secos.
- Adicionar 250µl de phenol – cloroformo en relación 1:1, mezclar por un minuto en vortex y centrifugar a 1700 g por ocho minutos, recuperar el sobrenadante en tubos nuevos. Adicionar 400 µl de cloroformo, y centrifugar a 1700 g por cinco minutos, recuperar el sobrenadante en tubos nuevos. Adicionar 600 µl de Isopropanol puro almacenar a - 20°C por 12 horas para precipitar el DNA.
- Centrifugar a 1700 g por 10 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y lavar los pellets con 100µl de etanol al 70% (Merck®).
- Centrifugar y eliminar el sobrenadante.
- Secar el pellet a 40-45°C por 15 minutos, y resuspender el DNA en 50µl de agua destilada estéril doblemente filtrada.

## ANEXO # 2

PURIFICACIÓN DEL ADN BACTERIANO OBTENIDO DE MUESTRAS DE SEDIMENTO.

El DNA de las muestras se purifica por el método descrito por Smit *et al.*, 1997. Se realiza utilizando un Sistema de Purificación basado en filtros (Wizard PCR Preps DNA Purification System - Promega®), siguiendo las instrucciones del proveedor brevemente :

- Adicionar 500 µL de resina a los tubos estériles de 1,5 ml con 50 µL de muestra (DNA).
- Agitar por dos minutos



- Tomar la muestra con una jeringa de 1 ml y pasar por el filtro.
- Filtrar 2 ml de Isopropanol al 80 % (para eliminar residuos de resina).
- Centrifugar el filtro a 1700 g por dos minutos.
- Secar el filtro por cinco minutos a temperatura ambiente.
- Colocar los filtros en tubos estériles de 1,5 ml y adicionar 50  $\mu$ L de agua destilada estéril doblemente filtrada a 68°C.
- Incubar las muestras por dos minutos para que el agua se empape en el filtro.
- Centrifugar a 1700 g por 30 segundos para desprender el DNA y recuperarlo en los tubos nuevos.

### ANEXO # 3

#### ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

- Preparar un gel de agarosa al 2% (w/v), usando una solución buffer de electroforesis (Solución TAE 1X) y bromuro de etidio (concentración final 10 mg. ml<sup>-1</sup>).
- Cuando el gel polimeriza, retirar el sello de la bandeja, el peine y colocar la bandeja con el gel en la cubeta de electroforesis.
- Añadir suficiente buffer (TAE 1X, pH 8) para cubrir el gel.
- Adicionar al producto final amplificado 5  $\mu$ l de tampón de depósito: azul de bromofenol 0.25% (w/v), glicerol 40% (v/v) y
- Tomar 8  $\mu$ l del producto amplificado, colocar cada muestra en un pozo con una pipeta, incluir un marcador de peso molecular como referencia.
- Correr la electroforesis a 95-115 voltios, durante dos horas. Llevar el gel a un transiluminador UV y fotografiar.
- Fotografiar el gel con una cámara digital y archivar.

#### ANEXO # 4

##### GELES DE POLIACRILAMIDA CON GRADIENTE DESNATURALIZANTE.

- Mezclar en un tubo 11,5 ml de desnaturalizante al 60%, 80 µl de persulfato de amonio (10%) y 5,0 µl de temed®.
- Mezclar en otro tubo se 11,5 ml de desnaturalizante al 40%, 80 µl de persulfato de amonio (10%) y 5,0 µl de Temed®.
- Verter ambas soluciones en un equipo para gradientes y cargar entre dos vidrios con un espaciador de 0.75 mm, colocar el peine y dejar polimerizar durante 2 horas.
- Colocar en los geles con gradiente desnaturalizante, el producto de PCR (8 µl) de DNA genómico de las muestras de sedimento, camarón y (5 µl) de DNA genómico de las muestras de agua.
- Correr la electroforesis a 60°C de temperatura durante 10 minutos a 20 voltios seguido por cinco horas a 150 voltios.

#### ANEXO # 5

##### TINCIÓN DE PLATA (AgNO<sub>3</sub>). Según Protocolo de Dinesh *et al.* (1995).

- Colocar suavemente en las cubetas con solución de tinción los geles de poliacrilamida.
- De cada solución se utiliza 1,5 litros, siendo las soluciones de fijación y enjuague nuevas para cada tinción, pudiendo reutilizar hasta aproximadamente 5 veces las otras soluciones).

Soluciones y etapas para la tinción con Nitrato de Plata.

PASO	REACTIVO		TIEMPO
1. Fijación	10% etanol	150 ml	15 minutos
	0,5% ácido acético	7,5 ml	
	Enrasar con H <sub>2</sub> O desionizada hasta 1.5 litros.		
2. Impregnación	0,011 M AgNO <sub>3</sub>	2,8 g	20 minutos
Enrasar con H <sub>2</sub> O desionizada hasta 1.5 litros.			
3. Enjuague	H <sub>2</sub> O desionizada	1,5 litros	1 minuto
4. Revelado	0,75 M NaOH	45 gr	±10 minutos
	0,085 M Formaldehído	10,5 ml	
	Enrasar con H <sub>2</sub> O desionizada hasta 1.5 litros.		
5. Parada	0,07 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	11 gr	3 – 5 minutos
Enrasar con H <sub>2</sub> O desionizada hasta 1.5 litros.			

### ANEXO 6

Tabla resumen de las transformaciones realizadas sobre cada variable para cumplir con las asunciones de normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (prueba de Levene), durante los análisis de varianza (ANOVA). “Sin Transformación” indica que no hubo necesidad de transformación.

Variable	Transformación realizada		
	CAMARON	SEDIMENTO	AGUA
Conteos totales AM	Log <sub>10</sub> x	Log <sub>10</sub> x	Log <sub>10</sub> x
Conteos totales TCBS	Log <sub>10</sub> x	Log <sub>10</sub> x	Log <sub>10</sub> x
<b>Bioquímica</b>			
Gram-positivos	$\sqrt{x+0,375}$	Arco seno ( $\sqrt{X}$ )	-
Gram-negativos	$\sqrt{x+0,375}$	Arco seno ( $\sqrt{X}$ )	-
Aeromonas	Sin Transformación	Sin Transformación	-
<i>Vibrio</i> spp	Sin Transformación	Sin Transformación	-
<b>Índices de Diversidad</b>			
Riqueza de Especies®	Sin Transformación	Sin Transformación	Sin Transformación
Shannon-Weaver(H)	Sin Transformación	Log <sub>10</sub> x	Log <sub>10</sub> x
Evenness(E)	Sin Transformación	Log <sub>10</sub> x	Arco seno ( $\sqrt{X}$ )
<b>Producción</b>			
Supervivencia	Arcoseno ( $\sqrt{X}$ )	-	-
Peso Promedio	Sin Transformación	-	-
Producción(Kg.Ha <sup>-1</sup> )	Sin Transformación	-	-
Tasa de crecimientos(g.día <sup>-1</sup> )	Sin Transformación	-	-

