

“CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS MARINAS PRESENTES EN SUELOS DE PISCINAS CAMARONERAS EN TIEMPO DE POST-COSECHA Y PRE-SIEMBRA, LUEGO DE LA PREPARACIÓN DE SUELOS MEDIANTE EL METODO DE APLICACIÓN DE FUENTES DE NITROGENO”

C.B. Farinango, N.S. Rodriguez, M.G. Sandoval, F.Burgos
Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar,
Escuela Superior Politécnica del Litoral, Km. 30.5 vía Perimetral
Guayaquil-Ecuador

Cabofari@espol.edu.ec, nsrodrig@espol.edu.ec, msandova@espol.edu.ec, franciscaburgosv@yahoo.es

Resumen

Este proyecto tiene la finalidad de realizar un análisis microbiológico de las piscinas camaroneras de Acuario 5 en los tiempos de post cosecha y pre siembra luego de haber realizado una preparación de las piscinas con fuentes de nitrógeno, de esta manera obtener muestras e identificar la población bacteriana de cada uno de los tiempos y así realizar mediante cuadros estadísticos comparaciones entre las poblaciones y la cantidad de nitrógeno administrada.

El método utilizado es el tradicional, debido a que se pretende implementar un laboratorio en el lugar de estudio, pero teniendo como opción laboratorios especializados, con esto obtendremos el 1% de la biomasa bacteriana.

Con la finalidad de dar un aporte al sector camaronero, se podrá llegar a tener como referencia las bacterias presentes que determinan la calidad de sus suelos y aprovecharlas potenciando su función, y de esta manera su producción mejore.

Palabras claves: análisis microbiológico, camaronera, post cosecha, pre siembra, nitrógeno, población bacteriana, biomasa, calidad de suelos

Abstract

This project has the purpose to carry out the analysis of microbiology of the shrimp farm Acuario 5 in the times of post to harvest and the pre sowing after to have realized a preparation of the pools with fountains of nitrogen, with this manner to obtain samples and to identify the bacterial population each of the times and this way to carry out statistical tables and make comparisons between populations and the amount of nitrogen administered.

The method used is traditional, because it intends to implement a laboratory at the venue, but given as an option specialist laboratories, with this we get 1% of bacterial biomass.

In order to give a contribution to the shrimp sector as a reference may have bacteria that determine the quality of their soils and their role by harnessing power to improve their production.

Keywords: analysis of microbiology, shrimp farm, post harvest, pre sowing, nitrogen, bacterial population, biomass, quality of their soils.

1. Introducción

Al final de la década de los sesenta se inició la industria camaronera en el Ecuador y con ello nació una de las industrias de mayor crecimiento y tecnificación en nuestro país [1]. La producción de camarón puede realizarse en varios tipos de cultivo, que van desde extensivo a ultra-intensivo, siendo los más utilizados los sistemas extensivos, semi-intensivos e intensivos [2].

El cultivo de camarón se constituyó en una de las actividades económicas de mayor crecimiento productivo durante las décadas del 70, 80 y 90 sin embargo para la década de los 90 numerosos brotes epidémicos se registraron en el cultivo de *Penaeus vannamei*. [3]

El Ecuador inició como pequeño productor y se consolidó años después como uno de los principales productores dentro del sector acuícola, llegando en 1998 a producir y exportar 159,878 Toneladas métricas (TM) de camarón, convirtiéndose en el primer exportador de camarón en cautiverio del hemisferio Occidental.

En 1999 se reportó oficialmente en Ecuador la presencia del Virus de la Mancha Blanca (Alday, 1999) el mismo que se propagó hasta afectar el 100% de las camaroneras a nivel nacional. Con el impacto del Virus de la Mancha Blanca se pudo evidenciar el decrecimiento de la producción en el año 2000, provocando una reducción de un 65% de la producción total

A pesar del aumento de áreas de camaroneras en el Ecuador, los productores no habían realizado estudios concernientes a bacterias presentes en el sedimento de las piscinas, por lo que no podían determinar el potencial que éstas ejercían en la producción de camarón.

Es por esto, que tiempo después, la producción comenzó a verse afectada con alta concentración de

nutrientes, debido a la falta de control en los parámetros físicos y químicos de las camaroneras.

Los sistemas de cultivo intensivos crean un ambiente modificado para los organismos marinos incrementando de por sí el crecimiento bacteriano, las bacterias llegan a tomar ventajas de los cambios ecológicos introducidos en los sistemas, llegando a causar enfermedades en sistemas donde normalmente predominan las bacterias Gram negativas.

Hasta hoy a nivel mundial han sido reportados un número considerable de enfermedades de naturaleza infecciosa y no infecciosa, encontrándose dentro del primer grupo las de etiología viral y bacteriana.

La especie de *Vibrio* son consideradas oportunistas que con cambios ambientales favorables pueden producir focos de infección, el *Vibrio penicida* es una bacteria altamente patógena capaz de causar mortalidades masivas en pocos días, pero esta patogenicidad se manifiesta sólo durante los períodos de cambio de temperatura y salinidad [4].

Por lo que este estudio pretende determinar las bacterias marinas presentes en las piscinas de camarón en los tiempos de post cosecha y pre siembra con el fin de analizar este método de preparación de suelo, estableciendo que tan optimo es para el cultivo de camarón. De esta manera el productor podrá tener una referencia de que bacterias estarán presentes durante su producción.

Este estudio tiene la finalidad de dar un punto de vista técnico-científico al productor camaronero, y de esta manera potenciar los microorganismos encontrados en sus suelos y que mejor manera haciéndolo desde la preparación del suelo.

2. Marco teórico

Características de los suelos:

La caracterización de las condiciones superficiales y sub-superficiales de los suelos del lugar de estudio. Estas evaluaciones sobre varias características pueden en un momento

dado sugerir la ubicación de mejores lugares. Entre otras, estas son algunas observaciones importantes a realizarse en el área de la mecánica de suelos. Los suelos arcillo-limosos a arcillo-arenosos son los más convenientes para la construcción de piscinas para acuicultura.

Según estudios realizados en 1999 se colectaron muestras de suelo del fondo de 74 piscinas camaroneras correspondiente a 40 camaroneras del Ecuador.

La mayoría de los estanques presentaron valores de $\text{pH} > 6$ y concentraciones de carbón total $< 2.5\%$.

Bacterias:

Son seres generalmente unicelulares que pertenecen al grupo de los procariotas. Son células de tamaño variable cuyo límite inferior está en las 0,2 μm y el superior en las 50 μm ; sus dimensiones medias oscilan entre 0,5 y 1 μm . Las bacterias tienen una estructura menos compleja que la de las células de los organismos superiores: son células procariotas

Las bacterias Gram negativas son aquellas bacterias que no se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram: de ahí el nombre de "Gram negativas" o también "gran negativas" (Salton, 1996). Esta característica está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular, por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana. Las bacterias que se tiñen de azul oscuro o de violeta son las bacterias Gram positivas.

Las bacterias Gram negativas presentan dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano, mientras que las bacterias Gram-positivas presentan sólo una membrana lipídica y la pared de peptidoglicano es mucho más gruesa.

Género Vibrio

Es un género de bacterias, incluidas en el grupo gamma de las proteobacterias. Existen varias especies marinas bioluminiscentes, tanto de

vida independiente como simbiótica o parasitaria.

Las especies de género *Vibrio* son invariablemente bacilos Gram-negativos, de entre 2 y 3 μm de largo, dotados de un único flagelo polar que les permite una elevada movilidad. Soportan bien los medios alcalinos, así como las concentraciones salinas. [5].

3. Principales impactos

3.1 Sociales

El proyecto a realizar podrá dar una visión clara al sector camaronero, de productos orgánicos que puede reciclar para el preparado de piscinas, lo cual hace más económico el proceso.

La identificación bacteriana tiene como fin demostrar al productor, que en su medio puede encontrar las herramientas necesarias para mejorar su producción, de esta manera podrá potencializar sus suelos y optimizar costos.

También con este estudio, se desea dar a conocer la diversidad bacteriológica que posee el Ecuador, debido a que la población bacteriana no ha sido identificada aun, por lo que pueda dar una pauta de las especies que existen.

3.2 Ambientales.

Basándose en la identificación de bacterias en el suelo de áreas camaroneras permitirá incursionar en la biorremediación, ya que se podría recuperar suelos que se consideran de muy mala calidad. Fomentando así este método que es muy eficiente pero poco aplicado.

Con este proyecto se pretende concientizar al productor en darle un buen mantenimiento a los suelos, con el fin de que no destruya los nutrientes y microorganismos que más bien pueden ser beneficiosos para la zona.

El sector camaronero podrá reutilizar sedimentos con materia orgánica rica en nitrógeno como la urea que pueden ser una alternativa, y enriquece al suelo por lo tanto, no interrumpe ningún ciclo biológico importante.

3.3 Científicos.

Mediante la identificación, las bacterias encontradas servirán como referencia del estado

en el que se encuentra las zonas aledañas a la camaronera, por lo que los productores podrán determinar que tipo de tratamiento necesitan sus suelos.

La identificación bacteriana permite el estudio de las bacterias encontradas y aprovecharlas para diferentes funciones, en este caso priorizando su aplicación para la acuicultura a través de los ya conocidos probióticos.

4. Metodología

4.1 Área de estudios.

El área de estudio se encuentra ubicada en la zona de Los Puertos – Isla Patria en el Cantón de Santa Rosa, Parroquia Jambelí en la Provincia El Oro en donde se tomaran muestras en los cultivo: semi-intensivos (Camaronera Acuario 5), área 82,7 Has.

4.2 Protocolo de trabajo.

- Preparación de suelos de piscinas de camaronera
- Colecta de muestras.
- Preparación de cultivos.
- Técnicas de dilución y siembra de superficie de placa
- Conteo de colonia y caracterización morfológica de colonia.
- Tinción de Gram.
- Prueba bioquímica Api E20.

4.3 Preparación de piscinas de camaronera.

Una vez realizada la post cosecha, las piscinas deben mantenerse con una película de agua de 30 cm con el fin de mantenerla húmeda.

Luego se procede a colocar la urea cuya dosis será de un saco de 50 Kg por cada hectárea de la piscina.

Después de esto, se espera que se dé la proliferación bacteriana, la cual irá biodegradando los sedimentos. Esto se dará en un tiempo estimado de 7 días.

Al final se irá haciendo lavados continuos a la piscina con el fin de ir retirando la materia orgánica

4.4 Colecta de muestra.

- Se utilizara un tubo de PVC (core) estéril.
- El core fue introducido a una profundidad de 5cm del sedimento de la piscina.
- Luego la muestra será colocada en fundas plásticas previamente rotuladas.
- Después de ser recolectadas las muestras fueron transportadas en frío hasta su posterior tratamiento en el laboratorio de Microbiología.

4.5 Técnicas de dilución y siembra de superficie de placa.

- Las siembras se realizaron siguiendo la metodología tradicional empleando diluciones sucesivas en una relación 1:10 para las muestras de agua y sedimento.
- Cada tubo de ensayo empleado para las diluciones contiene 9 ml de solución salina al 2% con NaCl, estéril.
- Para realizar las diluciones de las muestras de sedimento se utilizaran frascos con 90 ml de solución salina con 10g de muestra.
- Posteriormente se adicionara 100 ml de cada dilución en su respectiva caja petri, en Agar Marino como en Agar TCBS.
- Posteriormente se efectuara la siembra por el método de directo (barrido) que consiste en extender la muestra con ayuda de un asa de vidrio en forma de bastón (asa de Drygalski), previamente esterilizada al calor.
- Las placas seran incubadas en la en posición invertida entre 28 - 30 °C por 48 horas para las muestras de sedimento.[6]

4.6 Procedimiento de Tinción de Gram.

1. Cubrir el frotis con 2 gotas de cristal violeta durante 30 segundos a 1 minuto.
2. Lavar cuidadosamente el frotis con agua de la llave o destilada para eliminar el exceso de colorante.

3. Sacudir un poco y sin dejar secar el frotis con 2 gotas de lugol por 30 segundos.
4. Lavar cuidadosamente el frontis con agua.
5. Inclinar el porta objeto y aplicar gota a gota el decolorante dejando que se escurra hasta que no fluya mas tintura.
6. Inmediatamente lavar con agua.
7. Aplicar 2 gotas de safranina durante 30 segundos.
8. Lavar con agua, eliminar cuidadosamente el exceso de agua con una toalla de papel y dejar secar al aire.[7]

4.7 Prueba bioquímica api e20.

1. Preparación del inóculo.
2. La inoculación de la Franja.
3. Preparación de la Franja.
4. Incubación de la Faja.
5. Lectura de franja.
6. Interpretación. [8]

5. Análisis estadístico

5.1 Conteo de UFC

Debido a que obtenemos 9 muestras de las piscinas y cada una de ellas posee 3 replicas tendremos el valor de la media aritmética de cada muestra con sus respectivas muestras con el fin de obtener un valor representativo del promedio de UFC que posee cada muestra. Con ayuda de ANNOVA obtendremos datos como:

Desviación Estándar

Varianza

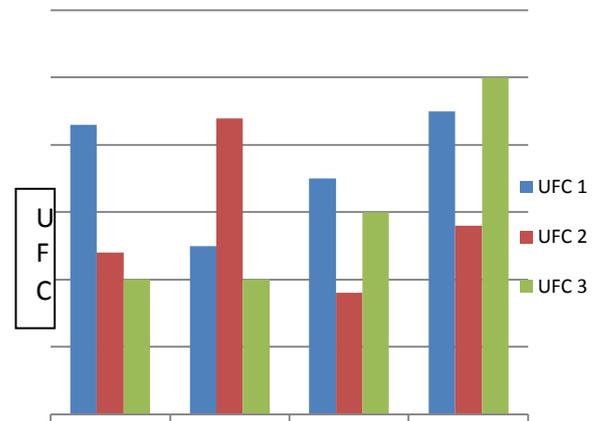
Serán valores que podremos comparar en los dos tiempos de post-cosecha y pre siembra con el fin de analizar mediante un gráfico de barras, si la presencia de nitrògeno provocó un aumento en la UFC en los tiempos en los cuales se obtuvieron las muestras.

Variables Dependientes:

- Unidad Formadora de Colonias en tiempos de: post cosecha y pre siembra

Variables Independientes:

- Concentración de Fuentes de Nitrògeno



Concentración de Fuentes de Nitrògeno

Gráfico 6

Título: Representación en Barras de las UFC encontradas en los tiempos de Post cosecha y pre siembra

Fuente: Autores

1. Análisis de Gram Negativas y Gram Positivas

Luego de una tinción de Gram, a cada muestra con sus respectivas réplicas se procede a cuantificar los Gram a través de porcentajes, de acuerdo a la presencia que posean en las respectivas muestras.

Lo que se espera obtener es que se obtenga un alto porcentaje de gram negativas antes de la preparación de gram negativas debido a la gran cantidad de materia orgánica que queda en los sedimentos, luego de la cosecha.

En el tiempo de pre siembra se espera obtener una concentración de porcentajes medianamente equilibrado entre gram positivas y gram negativas.

Los datos serán procesados en gráfico de torta con el fin de mostrar las diferencias de presencia de gram positivas y negativas.

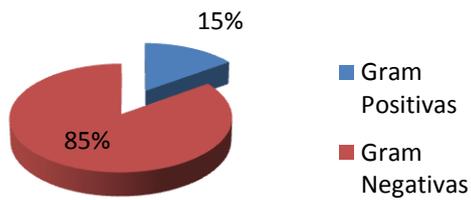


Gráfico 7

Título: Concentración en porcentajes de gram positivas y negativas encontradas

Fuente: Autores

2. Especies encontradas

Con la identificación API podremos obtener las especies de bacterias que poseen los sedimentos, los cuales serán representados en un gráfico de tortas los cuales mostrarán que especies predominan en cada uno de los tiempos: post cosecha y pre siembra.

En los tiempos de post cosecha esperamos ver predominancia de *Vibrio Cholerae*, seguido por *V. parahaemolyticus*, *V. Harveyi*, otros. Por lo cual los representamos en gráficos circulares para demostrar mediante porcentajes la presencia de estos vibrios.

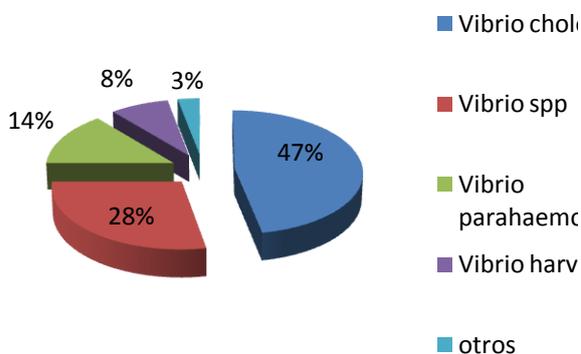


Gráfico 8

Título: Población Bacteriana por especies encontradas en porcentajes

Fuente: Autores

Mientras que en los tiempos de pre siembra podemos obtener una predominancia de *V. cholerae*, el cual predomina en las piscinas de camarón.

6. Resultados y Recomendación

- Se espera que luego del análisis microbiológico de las muestras correspondientes a los sedimentos de post cosecha se observe una predominancia de las bacterias Gram negativas, debido a que los suelos son sometidos a ciclo de producción, los cuales utilizan insumos como balanceado con lo que se da la presencia de desechos orgánicos fomentando así la proliferación de bacterias Gram negativas.
- Una vez tratada la piscina de engorde de camarón con la fuente de nitrógeno se presume que la calidad de los suelos será óptima para poder realizar el cultivo.
- Se pretende llegar a un equilibrio entre las bacterias marinas presentes en el suelo.
- Se conocerá el 1% de la población bacteriana existente en la zona de estudio, gracias a los estudios de caracterización morfológica y las pruebas bioquímicas de Api E20.
- Utilizar la comunidad bacteriana encontrada para estudios posteriores de biorremediación en suelos de camarón.
- Analizar la función de las bacterias de la muestra para determinar su rol positivo o negativo en la producción.

7. Conclusiones

1. Con la ejecución del proyecto los estudiantes responsables obtendrán destrezas necesarias para la utilización de los instrumentos del laboratorio y experiencias en estudios microbiológicos
2. Con la utilización de fuentes de nitrógeno se contribuye a no desgastar

la calidad de los suelos, dándose un beneficio económico y ambiental.

3. Las macro empresas camaronera o pequeños productores de una misma zona deben implementar laboratorios que realicen estudios microbiológicos con el fin de hacer seguimiento a la calidad de los suelos. Creando así una base de datos de las bacterias endémicas de la zona para luego potenciarlas y utilizarlas.
4. El asesoramiento es primordial para la implementación de laboratorios microbiológicos.

8. Agradecimientos

- Agradecemos a nuestras familias por habernos apoyado durante todo este tiempo, confiar en nosotros y por sus palabras de aliento de seguir adelante.
- También a nuestros profesores que con su guía hemos podido desarrollar este proyecto principalmente a PhD Marcelo Muñoz y a nuestra profesora Francisca Burgos, Msc, y a Ricardo Cedeño, Msc quienes creyeron en nuestras ideas y nos ayudaron a desarrollarlas.

9. Bibliografía.

[1] Francisco Marriot, M. Baquero Latorre.- Análisis del Sector Camaronero. Apuntes de Economía nº 29.(2003).

[2]Cámara de productores de camarón, Libro blanco del camarón, (2a. Edición, Octubre 1993, Codemet S.A).

[3] Cámara Nacional de Acuicultura, 2000. Análisis de las Exportaciones de Camarón. Enero-Julio del 2000. Acuicultura del Ecuador. Edición 39, 86 pp.

[4] Sotomayor, M.A., Balcázar, J.L. 2003. Inhibición de *Vibrios* patógenos de camarón por mezclas de cepas prebióticas.

[5]Thompson FL, Iida T, Swing J (2004). "Biodiversity of *Vibrios*". *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68** (3): 403-431.

[6]Aquihuatl Ramos, Ma; Pérez Chabela, Ma. 2004. Manual de prácticas del Laboratorio de Microbiología General. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

[7] Sutton Scott, La tinción de Gram, 2006

[8] Brown BJ & LG Leff. 1996. Comparison of fatty methyl ester analysis with the use of API 20E and NFT strips for identification of aquatic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 2183-2185