Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada

CICESE

[illegible] BACTERIANAS ASOCIADAS CON BIOPELICULAS EN TANQUES DE CULTIVO LARVARIO DE *Litopenaeus vannamei*

TESIS

DOCTORADO EN CIENCIAS

MARCO ANTONIO LOPEZ TORRES

Ensenada, Baja California, Octubre del 2006

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS

CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA

COMUNIDADES BACTERIANAS ASOCIADAS CON BIOPELÍCULAS EN TANQUES DE CULTIVO LARVARIO DE *Litopenaeus vannamei*

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta:

MARCO ANTONIO LÓPEZ TORRES

Ensenada, Baja California, México, Octubre del 2006.

TESIS DEFENDIDA POR

Marco Antonio López Torres

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Marcial Leonardo Lizárraga-Partida
Director del Comité

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Miembro del Comité

Dr. Jorge de la Rosa Vélez
Miembro del Comité

Dr. Ricardo Searcy Bernal
Miembro del Comité

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro
Miembro del Comité

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro
Coordinador del programa de posgrado en Acuicultura y Biotecnología Marina

Dr. Raúl Ramón Castro Escamilla
Director de Estudios de Posgrado

10 de agosto de 2006

RESUMEN de la tesis de **Marco Antonio López Torres** presentada como requisito parcial para la obtención del grado de DOCTOR EN CIENCIAS con orientación en BIOTECNOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California, México. Octubre 2006.

COMUNIDADES BACTERIANAS ASOCIADAS CON BIOPELÍCULAS EN TANQUES DE CULTIVO LARVARIO DE *Litopenaeus vannamei.*

Resumen aprobado por:

Dr. Marcial Leonardo Lizárraga-Partida
Director de tesis

Un total de 68 muestras de biopelículas fueron obtenidas de 17 tanques de concreto durante tres producciones larvarias comerciales de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*. Durante cada producción se colectaron muestras en cuatro estadios de desarrollo larvario: Zoea I (ZI), Mysis I (MI), postlarva 1 (Pl1) y en el estadio de cosecha, postlarva 16 (Pl16), lo que representó un total de 17 muestras por cada estadio. En cada muestra se evaluaron bacterias heterótrofas viables (BHV), bacterias tipo *Vibrio* (BTV) y bacterias totales (BT) por conteos con DAPI. Asimismo, estos grupos bacterianos se evaluaron en muestras de agua de fuentes externas de bacterias al cultivo. También se usaron diferentes sondas de oligonucleótidos destinadas al 16-23S rRNA para detectar grupos bacterianos en las muestras anteriores. Valores promedio para BHV variaron desde $3.2x10^2$ hasta $5.8x10^3$ UFC/cm^2. No se encontraron diferencias estadísticas ($P>0.05$) entre los estadios ZI, MI y Pl1, solo el estadio Pl16 fue diferente de los tres anteriores. Los promedios para BTV fluctuaron desde <10 hasta $1.8x10^1$ UFC/cm^2. Los estadios Pl1 y Pl16 fueron estadísticamente diferentes ($P<0.05$) de los estadios precedentes. BT variaron desde $1.4x10^4$ hasta $1.6x10^5$ bacterias/cm^2, donde Pl16 fue estadísticamente diferente ($P<0.05$) de los primeros estadios. En cuanto al agua de fuentes externas, la *Artemia* y los nauplios de camarón aclimatados fueron las más importantes fuentes de BTV al cultivo. En cuanto a las sondas, las principales señales de hibridación fueron presentadas por EUB338 y GAM42a. Para biopelículas se obtuvieron valores promedio de 27% (ZI) hasta 70% (Pl16) para la sonda EUB338, mientras que para GAM42a los promedios fueron desde 1% (Pl16) hasta 11% (MI). La principal fuente de γ-Proteobacterias fueron los nauplios de *Artemia* vivos y de camarón aclimatados, con porcentajes promedio de hibridación de 88% y 40%, respectivamente. Estos valores elevados concuerdan con valores altos de BTV, las cuales

pertenecen a este grupo filogenético. Las producciones larvarias en los tanques evaluados presentaron valores de sobrevivencia superiores al 50%, consideradas exitosas, por lo que se concluye que los resultados corresponden a la formación de biopelículas saludables que pudieron ser benéficas al cultivo.

Palabras clave: biopelículas, *Vibrio*, γ-Proteobacterias, cultivo larvario

ABSTRACT of the thesis presented by **Marco Antonio López Torres** as a partial requirement to obtain the DOCTOR OF SCIENCE degree in SPECIALIZATION in MARINE BIOTECHNOLOGY. Ensenada, Baja California, Mexico. October 2006.

BACTERIAL COMMUNITIES ASSOCIATED WHIT BIOFILMS ON LARVAE CULTURE TANKS OF *Litopenaeus vannamei.*

A total of 68 biofilm samples were collected from 17 concrete tanks at three larvae production times, in a commercial shrimp hatchery of *Litopenaeus vannamei*. During each production, samples were accomplished at four larvae developments stages, Zoea I (ZI), Mysis I (MI), postlarvae 1 (Pl1) and postlarvae 16 (Pl16), the last stage before harvesting. In each sample we evaluated viable heterotrophic bacteria (BHV), *Vibrio*-like bacteria (BTV) and total bacteria (BT) with DAPI. Also, it those bacterial groups were evaluated from water of external bacterial sources to shrimp hatchery tanks. Likewise, different 16-23S rRNA targeted oligonucleotide probes were used to quantify the presence of specific bacterial groups in biofilm and water samples from sources external to shrimp hatchery tanks. Average of BHV ranged from $3.2x10^2$ to $5.8x10^3$ CFU/cm^2. No significant statistical differences ($P>0.05$) were found among ZI, MI and Pl1, but Pl16 show a significant difference ($P<0.05$) with precedent stages. Average results of BTV ranged from <10 to $1.8x10^1$ CFU/cm^2 where stages Pl1 and Pl16 presented a significant difference from other stages. BT ranged from $1.4x10^4$ to $1.6x10^5$ cells/cm^2, where Pl16 was statistical different ($P<0.05$) from other stages. Water of external sources from *Artemia* and acclimated shrimp nauplii were the principal BTV sources to shrimp culture tanks. The most important hybridization signals were obtained with EUB338 and GAM42a probes. An average of 27% (ZI) to 70% (Pl16) of total cell counts with DAPI were detected with the EUB338 probe, while the GAM42a probe signal ranged from 1% (Pl16) to 11% (MI) on biofilm samples. The most significant external sources of subclass γ-Proteobacteria and BTV were found in water of *Artemia* alive and shrimp nauplii, with hybridization percentages of 88% and 40%, respectively. Shrimp productions evaluated were successful as larval survival was concerned, with a survival average higher than 50%. Thus, we conclude that our results correspond to healthy biofilm microbial structures, which are beneficial to shrimp larvae.

Keywords: biofilm, *Vibrio*, γ-Proteobacteria, shrimp hatchery, *Litopenaeus vannamei*.

DEDICATORIA

A Tí Hermosa y a Ustedes mis hijos: Andrés, Leonardo y Andrea; porque son el eje que mueve mi vida y la fuerza que me impulsa siempre. Gracias por su paciencia y sacrificios. Los amo.

A mis padres, Angelita y Pedro, por darme la oportunidad de llegar a este mundo y luchar por mis anhelos. Dios los bendiga.

A Pedro Ortega Romero y Lorena Bringas Alvarado, porque gracias a su apoyo incondicional, me permitieron tomar las alas de la ciencia y poder volar hasta donde hoy he llegado. Siempre estarán mis pensamientos en USTEDES al igual que mi agradecimiento.

In memoria: Heriberto, que éste trabajo sea un reconocimiento a tu esfuerzo y dedicación, donde quiera que estés.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Marcial Leonardo Lizárraga-Partida, por compartir de nuevo un sendero más en mi carrera profesional. Gracias por todo Leo.

A la empresa AREMAR, S.A. de C.V., por permitirme utilizar sus instalaciones para el desarrollo de este trabajo. Especialmente al Oc. Pedro Delgado Sotelo, Ing. Jorge Anaya, Oc. Octavio Medina y a todo el personal que laboró para la Empresa. Gracias.

A mi comité de tesis, por sus siempre acertados comentarios y sugerencias para la mejora de este trabajo: Dra. María del Pilar Sánchez-Saavedra, Dr. Jorge de la Rosa-Vélez, Dr. Ricardo Searcy-Bernal y al Dr. Alexei Fedórovish Licea-Navarro. Tomaré su ejemplo de rectitud y tenacidad para mi vida profesional futura. Gracias.

Y de nuevo a Tí, Lupita Vargas Cárdenas, por todo tu apoyo incondicional en el laboratorio y fuera de él, lo que hizo más fácil mi estadía en CICESE. Por siempre todo mi aprecio.

A mis compañeros de generación (Mario, Luvia, Edgar, Alejandro y Alejandra, Sandra, Raúl, Toño, Glenda, Héctor, Jorge y Claudia) por hacer el paso por CICESE más grato y placentero. Mil gracias.

Muy especial para la **UNIDAD EXPERIMENTAL PEÑASCO**, el alma de vida académica, que aunque físicamente ya no exista, llevaré su imagen y recuerdo por siempre. Gracias UEP y a todos los que formaron parte de tu esencia, porque allí aprendí a dar mis primeros pasos en este sendero eterno del conocimiento y eso jamás se olvida. Conservas un lugar especial en mi corazón.

Al CICESE por abrirme sus puertas y poder viajar junto a él en este basto camino del conocimiento.

Al PRONALSA, por su apoyo para la mejor realización de este trabajo.

Al PROMEP, por su apoyo económico para mis mejores condiciones de estudio.

Al **CONACYT**, porque sin su valioso apoyo económico, el sueño del doctorado quizá no hubiera podido realizarse.

CONTENIDO

Página

I. INTRODUCCIÓN 1
I.1. Antecedentes 3
I.1.1. Bacterias patógenas en camaronicultura 3
I.1.2. Biopelículas bacterianas 4
I.1.3. Importancia de biopelículas bacterianas en sistemas de producción de camarón 6
I.1.4. Evolución del conocimiento de la diversidad bacteriana 8
I.1.5. Importancia del RNA ribosomal 10
I.1.6. Identificación de microorganismos en biopelículas 11
I.2. Objetivos 14

II. MATERIALES Y MÉTODOS 15
II.1. Lugar de estudio y fechas de muestreo 15
II.2. Condiciones generales del cultivo 15
II.3. Tanques muestreados 19
II.4. Muestreos de biopelículas bacterianas en tanques de cultivo larvario 19
II.5. Agua de fuentes externas de bacterias al cultivo 21
II.6. Cuantificación de bacterias cultivables y totales 22
II.7. Hibridación in situ fluorescente (FISH) 22
II.7.1. Sondas para hibridación 23
II.7.2. Condiciones de hibridación 24
II.7.3. Observación al microscopio 25
II.8. Análisis estadísticos 26

III. RESULTADOS 27
III.1. Densidad de siembra de nauplios de camarón 27
III.2. BHV, BTV y BT en biopelículas de tanques de cultivo larvario 27
III.3. FISH en biopelículas de tanques de cultivo larvario 30
III.4. Porcentajes de bacterias cultivables en biopelículas 35
III.5. BHV, BTV y BT en agua de fuentes externas al cultivo 38
III.6. FISH en muestras de agua del cultivo larvario 40
III.7. FISH en agua de fuentes externas de bacterias al cultivo 41
III.8. Porcentaje de bacterias cultivables en agua de fuentes externas al cultivo 41

IV. DISCUSIÓN 45
IV.1. BHV, BTV y BT en biopelículas de tanques de cultivo larvario 45
IV.2. Porcentaje de bacterias cultivables en biopelículas 47
IV.2.1. BHV/BT 47
IV.2.2. BTV/BT 48
IV.2.3. BTV/BHV 48
IV.3. BHV, BTV y BT en agua de fuentes externas al cultivo 49

CONTENIDO (continuación)

Página

IV.4. Porcentaje de bacterias cultivables en agua de fuentes externas al cultivo 50
IV.5. FISH en biopelículas de tanques de cultivo larvario 50
IV.6. FISH en agua de cultivo 51
IV.7. FISH en agua de fuentes externas de bacterias al cultivo 52

V. CONCLUSIONES **56**
V.1. Recomendaciones 57

VI. LITERATURA CITADA **58**

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Clasificación de microorganismos con base a secuencias del 16S rRNA y algunas sondas específicas (Tomado de Amann et al., 1995).	11
2	Principales fuentes externas potenciales de entrada de bacterias al cultivo larvario de *Litopenaeus vannamei* de acuerdo a su desarrollo larvario.....	17
3	Bacterias en biopelículas de tanques durante el cultivo larvario de *Litopenaeus vannamei* con diferente densidad de siembra inicial (5 y 10 millones de nauplios), durante dos corridas de producción (P1 y P3). No se encontraron diferencias estadísticas significativas (P>0.05) dentro de los grupos de bacterias heterótrofas viables (BHV), bacteria tipo *Vibrio* (BTV) y bacterias totales (BT), en los estadios de desarrollo larvario de Zoea I (ZI), Mysis I (MI), postlarva 1 (Pl1) y postlarva 16 (Pl16).....	28
4	Bacterias heterótrofas viables (BHV), bacterias tipo *Vibrio* (BTV) y bacterias totales (BT) en biopelículas de tanques de cultivo larvario de *Litopenaeus vannamei* durante tres producciones (1, 2 y 3), en los diferentes estadios de desarrollo.....	29
5	Valores promedio de bacterias tipo *Vibrio* (BTV), bacterias heterótrofas viables (BHV) y bacterias totales (BT) en los diferentes estadios de desarrollo larvario para las tres producciones evaluadas. Letras diferentes (a,b) dentro de los grupos de bacterias representan diferencia estadística significativa (P<0.05).....	31
6	Porcentajes de hibridación en muestras de biopelículas durante tres producciones (1, 2, 3) de cultivo larvario de *Litopenaeus vannamei* en los estadios de Zoea I (ZI), Mysis I (MI), postlarva 1 (Pl1) y postlarva 16 (Pl16) de las sondas EUB338 y GAM42a. Las sondas restantes solo alcanzaron un máximo de 1% de hibridación (no graficadas).....	32

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
7	Promedios de porcentajes de hibridación obtenidos de la figura 6. Diferente letra (a, b, c,) representa diferencia estadística significativa ($P<0.05$) entre los estadios para cada sonda.....	34
8	Bacterias heterótrofas viables (BHV), bacterias tipo *Vibrio* (BTV) y bacterias totales (BT) en muestras de agua de fuentes externas al cultivo durante las tres producciones evaluadas.....	39
9	Porcentajes de hibridación promedio de las dos sondas más importantes en muestras de agua de cultivo (A) y biopelículas (B), en los estadios de desarrollo de postlarva 1 (Pl1) y postlarva 16 (Pl16) de las producciones 2 y 3.....	40
10	Porcentajes de hibridación de las tres sondas más importantes en muestras de agua de fuentes externas al cultivo para las tres producciones (P1, P2, P3).....	42

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Bacterias cultivables determinadas como un porcentaje de bacterias crecidas en medio de cultivo comparadas con conteo total de células.	9
II	Rutina de tratamientos para larvas y postlarvas de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, de la empresa AREMAR, S.A. de C.V. en Puerto Peñasco, Sonora.	18
III	Características de siembra de nauplios de *Litopenaeus vannamei* en las tres producciones evaluadas en la empresa AREMAR S.A. de C.V. en Puerto Peñasco, Sonora.	20
IV	Sondas de oligonucleótidos utilizadas para hibridación *in situ*, marcadas en la posición 5' con el fluorocromo indocarbocianina CY3.	24
V	Valores promediados de los porcentajes de la relación de bacterias heterótrofas viables (BHV/BT) crecidas en agar de ZoBell y bacterias tipo *Vibrio* (BTV/BT) crecidas en TCBS, con conteos de bacterias totales hechos con DAPI, en muestras de biopelículas de tanques de cultivo larvario de *Litopenaeus vannamei* en los distintos estadios de desarrollo y producciones. Los valores son *X±ES**. Letras distintas en columnas (*) o renglones (**) representan diferencia estadística significativa ($P<0.05$) por producción o estadio.	36
VI	Porcentajes de la relación de bacterias tipo *Vibrio* crecidas en TCBS con bacterias heterótrofas viables (BTV/BHV) crecidas en agar ZoBell en muestras de biopelículas de tanques de cultivo larvario de *Litopenaeus vannamei* en diferentes estadios de desarrollo y producciones. Los valores son X±ES. No hay diferencia significativa en renglones ($P>0.05$) por producción. Letras distintas en columnas representan diferencia estadística significativa ($P<0.05$) dentro de los estadios.	37
VII	Porcentaje de la relación de bacterias heterótrofas viables (BHV/BT) crecidas en agar de ZoBell y bacterias tipo *Vibrio* (BTV/BT) crecidas en TCBS, en relación con conteos de bacterias totales hechos con DAPI en muestras de agua de fuentes externas de bacterias al cultivo larvario de *Litopenaeus vannamei*.	43

LISTA DE TABLAS (continuación)

Tabla		Página
VIII	Porcentaje de la relación de bacterias tipo *Vibrio* crecidas en TCBS y bacterias heterótrofas viables (BTV/BHV) crecidas en agar de ZoBell en muestras de agua de fuentes externas al cultivo larvario de *Litopenaeus vannamei*.	44

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarón es una de las actividades acuícola de más desarrollo en los últimos años. De acuerdo a estadísticas de la FAO, el crecimiento de la producción mundial de camarón entre 1984 y el año 2001 fue de 14% por año, con una producción en ese último año de más de 1,138,610 toneladas (Panorama Acuícola Magazine, 2002). Tailandia, Indonesia e India son los países con mayor producción en el hemisferio oriental, mientras que en el hemisferio occidental, solo Ecuador destaca a nivel mundial.

En México, el cultivo de camarón se inició en 1985 y se incrementó de manera progresiva, de tal manera que en el ámbito mundial México ocupó el noveno lugar durante el 2001 con una producción de 47,000 toneladas (Panorama Acuícola Magazine, 2002), siendo los principales estados productores Sinaloa, Sonora, Nayarit y Tamaulipas (Alatorre, 1998; Peña, 1998). Para el año 2005, la producción superó las 80,000 toneladas, colocando a Sonora como el principal productor de camarón del País con 55,652 toneladas (Comités de Sanidad Acuícola de México, 2006). La pesca de camarón en altamar y esteros así como en bahías se ha mantenido estable por lo menos en los últimos 10 años (aproximadamente 35,000 ton. y 25,000 ton., respectivamente), mientras que la producción por acuicultura pasó de 4,371 ton. en 1990 a 47,000 ton. en el año 2001, para un crecimiento neto de 975%, lo que indica un crecimiento promedio anual del 30%. Las estadísticas de producción mexicana ubican al camarón como la especie de mayor valor en la producción total por acuicultura con el 70% del valor total, muy por encima del 16% representado por especies como la tilapia y la mojarra que ocupan el segundo lugar (Panorama Acuícola Magazine, 2002).

Sin embargo, el mantenimiento o incremento de la producción camaronícola por acuicultura puede verse limitado por los problemas derivados de las enfermedades tanto virales como bacterianas (Lightner, 1996; Lightner, 1998).

Durante la etapa larvaria muchas especies acuáticas, incluida el camarón, son más susceptibles de ser atacadas por agentes infecciosos, principalmente bacterias, que son uno de los agentes causantes de enfermedades más importantes en acuicultura (Sinderman y Lightner, 1988). Tanto la producción de semilla de camarón en laboratorio como su posterior proceso de engorda se ven afectados por la presencia de diferentes géneros bacterianos cultivables, de los cuales el género *Vibrio* es el más importante por su incidencia y patogenicidad (Sinderman y Ligthner, 1988; Kwei-Lin, 1989; Baskar y Setty, 1994; Kuo-Kau et al., 1996), ya que puede generar mortalidades de hasta el 100% en los cultivos afectados (Brock y Main, 1994).

Para el control de enfermedades de origen bacteriano se ha recurrido a diversos químicos y antibióticos sin que se haya demostrado una efectividad total de ellos. En algunos países se ha llegado a prohibir el uso de estos compuestos debido a los problemas de salud de los trabajadores en las granjas y los efectos negativos sobre el ambiente acuático (Brown, 1989).

Otras alternativas para evitar la incidencia de bacterias patógenas se han basado en el uso de microorganismos llamados probióticos, cuya efectividad tampoco ha sido plenamente comprobada (Moriarty, 1999; Gómez-Gil et al., 2000).

Otro enfoque hasta ahora no explorado, es un manejo ecológico de los tanques de cultivo larvario para lo cual es necesario generar un conocimiento de estructuración de las biopelículas bacterianas formadas en las paredes de dichos tanques, elucidando la secuencia

de comunidades que progresivamente van formando las biopelículas, lo anterior con el objeto de detectar si estos nichos ecológicos facilitan o impiden la implantación de bacterias patógenas para los diferentes estadios larvarios del camarón. Aspecto sobre el cual se desarrolló este trabajo.

I.1.- Antecedentes.

I.1.1.- Bacterias patógenas en camaronicultura:

El ambiente acuicultural provee un espacio favorable para el desarrollo de bacterias potencialmente patógenas, entre ellas las del género *Vibrio* cuya concentración promedio en agua de mar es del orden de 10^2 UFC/ml, mientras que en cultivos larvarios puede llegar hasta 10^4 UFC/ml en los estadios de zoea II (Lavilla-Pitogo, 1988) y hasta 10^5-10^6 UFC/ml en los estadios de postlarva 6-12 (López-Torres et al., 2000; López-Torres y Lizárraga-Partida, 2001). Lo anterior se debe a la elevada eutrofización de estos sistemas de cultivo la cual favorece a grupos bacterianos específicos (Eilers et al., 2000; Pinhassi y Berman, 2003).

Las especies del género *Vibrio* que mas frecuentemente han sido aisladas de los cultivos de camarón corresponden a *V. alginolyticus*, *V. (Listonella) anguillarum*, *V. damsela*, *V. fluviales*, *V. nereis*, *V. tubiashi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, y *V. harveyi*, estas tres últimas especies bacterianas son las de mayor importancia en Latinoamérica (Ceballos et al., 1996; Ligthner, 1996). Otros géneros bacterianos también impactan el cultivo de camarón, aunque no de manera tan determinante.

I.1.2.- Biopelículas bacterianas:

En medios acuáticos la asociación de microorganismos en una superficie o en la interfase líquido-aire se denomina biopelícula. Toda superficie inmersa en agua, incluyendo aquellas de organismos, es rápidamente cubierta con una biopelícula de microorganismos debido que dichas superficies proveen un hábitat rico en materia orgánica producto de procesos físicos de adsorción de moléculas a la superficie o a la producción de mucus o mucílago (Armstrong et al., 2001).

Una biopelícula esta constituida por una comunidad microbiana multiespecífica, cuyas bacterias y demás microorganismos pueden integrarse, intercambiar material genético en tasas elevadas dentro de ella o abandonar la biopelícula una vez que los nutrientes escasean (Angles et al., 1993; Hausner y Wuertz, 1999).

Se requieren diferentes factores para la formación de la biopelícula, entre ellos, la capacidad de desplazamiento de las bacterias para contactar superficies y adherirse, lo cual es favorecido por la presencia de flagelos y de algunos tipos de pilis bacterianos. Una vez que el contacto con la superficie se ha llevado a cabo, las bacterias usan tanto los flagelos como sus pilis para moverse a lo largo de la superficie en dos dimensiones, hasta que encuentran otras bacterias para la formación y extensión de las microcolonias iniciales (Watnick y Kolter, 2000). Finalmente, la producción de exopolisacáridos bacterianos, representados principalmente por heteropolisacáridos de glucosa y galactosa (Rodríguez y Bhosle, 1991), forman un glicocálix que constituyen los pilares que estabilizan la estructura fija de la biopelícula en su estado maduro (Sutherland, 2001). Algunos estudios de competencia entre cepas de *V. cholerae,* tipo silvestre y mutante en el pili o flagelos, muestran que estas estructuras proveen gran ventaja para la colonización de superficies;

asimismo, se ha observado que una vez establecida la biopelícula, la síntesis de flagelos se inhibe significativamente y se incrementa la producción de exopolisacáridos (Gacesa, 1998). La maduración de la biopelícula a través de los exopolisacáridos constituye una ventaja importante para la tolerancia a muchas sustancias tóxicas para los microorganismos (Yildiz y Schoolnik, 1999), como antibióticos, cloro y detergentes (Costerton et al., 1987, Karunasagar et al., 1996, Parsek y Fuqua, 2004), favorecido por la presencia de células persistentes (Lewis, 2001; Keren et al., 2004); así como para proveer protección de una gran variedad de factores ambientales adversos tales como luz ultravioleta, cambios de pH, shock osmótico y desecación (Fleming, 1993). Algunas evidencias como disminución de la difusión dentro de la biopelícula (De Beer et al., 1994), decremento en la tasa de crecimiento bacteriano (Evans et al., 1990) y efectos específicos de censo de población (Davies et al., 1998), son estrategias desarrolladas por las bacterias para enfrentar dichos factores ambientales adversos.

Además de su función estructural, los exopolisacáridos producidos por la biopelícula pueden servir como fuente de alimento durante las épocas de escasez de nutrientes para la comunidad que constituye la biopelícula (Allison et al., 1998; Davey y O'toole, 2000).

Algunos genes bacterianos pueden ser expresados en respuesta al tipo de superficie sobre la cual la bacteria se adhiere; por ejemplo, las bacterias pueden utilizar la quitina, un polímero de N-acetil glucosamina abundante en medios marinos ya que forma parte de exoesqueletos de insectos y crustáceos, para adherirse y formar biopelículas, al mismo tiempo que pueden degradarla enzimáticamente para abastecerse de alimento. Esta

propiedad constituye una parte fundamental para la sobrevivencia de muchas especies de vibrios en ambientes marinos (Keyhani y Roseman, 1996).

I.1.3.- Importancia de biopelículas bacterianas en sistemas de producción de camarón:

La importancia de biopelículas bacterianas en acuicultura ha sido demostrada inicialmente en la fijación y metamorfosis de diversas larvas de invertebrados marinos (Kirchman et al., 1982; Weiner et al., 1989), incluidas larvas de ostión, donde algunas especies bacterianas en particular han sido relacionadas con la fijación y metamorfosis de este organismo (Weiner et al., 1985; Kavouras y Maki, 2003; Lau et al., 2005).

Varios estudios han demostrado que en tanques de cultivo acuícola las biopelículas juegan diferentes papeles. Las bacterias en biopelículas representan una fuente de alimento, enzimas, ácidos grasos poliinsaturados, esteroles y aminoácidos para los organismos en cultivo (D'Agostino y Provasoli, 1970; Vinatea y Andreatta, 1997; Thompson et al., 1999) y potencial fuente de vacunas para peces (Shanker y Mohan, 2001). Las biopelículas han sido relacionadas con el mejoramiento de la calidad de agua durante los cultivos a través de la reducción de amonio y fósforo, lo que favorece la disminución en los recambios de agua durante el cultivo dando como resultado una menor eutroficación de las áreas receptoras de efluentes (Thompson et al., 2002; Pinhassi y Berman, 2003) y por consecuencia, reducción en los costos de producción (McIntosh et al., 2000).

A pesar de estas ventajas inherentes a la formación de biopelículas, una práctica común en taques de producción larvaria de organismos de importancia acuicultural es la eliminación total de las biopelículas entre una producción y otra. Lo anterior se debe a que

en algunos trabajos con cultivos de camarón se recomienda desinfectar los tanques, además del agua, entre las producciones larvarias (Baticados, 1988; Baticados et al., 1990), para así evitar la posible presencia de bacterias potencialmente patógenas para el cultivo. Se ha visto que biopelículas de estas bacterias en tanques, pueden resistir lavados con cloro de hasta 200 ppm dependiendo de la estructura de la pared del contenedor, con máxima resistencia en superficies de cemento o plástico y menor en acero (Karunasagar et al., 1996). Experimentalmente también se ha encontrado que algunas bacterias, entre ellas algunos vibrios, cuando se han establecido en una biopelícula pueden llegar a tener mayor virulencia (Prayitno y Latchford, 1995) y al coexistir en simbiosis con microalgas bentónicas en la biopelícula, pueden ser transmitidas a los organismos al momento de pastorear la biopelícula (Thompson et al., 2002), lo que representaría un riesgo patológico potencial. Sin embargo, en la práctica no se ha determinado con precisión la actividad patogénica de estas bacterias a través de las biopelículas, ya que otra gran gama de bacterias cultivables y no cultivables presentes en ellas, podrían ser potencialmente favorecedoras del cultivo (probióticas), por lo que es necesario una investigación mas profunda para establecer la verdadera importancia de estas bacterias durante los cultivos larvarios, sobre todo de camarón donde no existen estudios previos sobre este tema.

Las bacterias presentes en los sistemas de producción larvaria de organismos de importancia acuicultural proceden de diversas fuentes claramente identificadas, entre las que se cuentan el agua, sistema de tuberías, el alimento de las larvas conformado por microalgas y nauplios de *Artemia*, en el caso de camarón, así como los propios nauplios o larvas de los organismos a cultivar (Lavilla-Pitogo et al., 1990; Lavilla-Pitogo, 1995; López-Torres y Lizárraga-Partida, 2001; López-Torres et al., 2001). En cuanto a camarón,

la principal fuente de entrada de bacterias vibrios al sistema lo constituyen los nauplios de *Artemia*, a pesar de que los quistes antes de la eclosión no contienen bacterias de este género (López-Torres y Lizárraga-Partida, 2001). El proceso de sucesión de la flora normal de los quistes (bacterias Gram positivo) durante la eclosión de éstos por bacterias *Vibrio* es desconocido, por lo que dicho proceso puede ser atribuido a la posible presencia de estas bacterias en biopelículas en los tanques de eclosión o contenidas en el agua de cultivo.

I.1.4.- Evolución del conocimiento de la diversidad bacteriana:

La aplicación de técnicas moleculares para el estudio de la diversidad bacteriana, puso de manifiesto las limitaciones derivadas de la tendencia a cultivarlas y así obtener cultivos puros para poder ser caracterizadas (Amann et al., 1995), razón por la cuál, menos de 5000 especies de bacterias han sido identificadas, mientras que millones de plantas y animales han sido descritos. Los métodos de conteo de bacterias viables en placa o por el número más probable, han sido frecuentemente utilizados para la cuantificación de células activas en muestras ambientales. Sin embargo, debido a que estos métodos son selectivos, son por lo tanto, inadecuados para determinar el total de la población de bacterias de un ambiente determinado (Amann et al., 1996), lo cuál fue demostrado cuando se implementó la técnica de conteo directo por epifluorescencia.

Para ambientes acuáticos de condiciones oligotróficas a mesotróficas, se ha constatado que los conteos directos por microscopia exceden los conteos de células viables por muchos órdenes de magnitud. Situación similar ha sido observada en sedimentos y suelos (Tabla I). La baja relación entre conteos de células viables y conteo total de células, usualmente entre 1 y 15%, había sido atribuida a una fracción relativamente grande de

células en la biomasa reciclada, representada por bacterias muertas. En la actualidad, se acepta que en la mayoría de los casos, las células visualizadas microscópicamente son viables, pero no forman colonias en las placas de cultivo. Dos diferentes tipos de células contribuyen a esta mayoría de bacterias no cultivables pero activas: aquellas especies que han entrado a un estado viable no cultivable y aquellas desconocidas que nunca han sido cultivadas debido a la carencia de métodos adecuados (Amann et al., 1996). Aunque gran parte de esta problemática ha sido superada a través de técnicas moleculares, el empleo de medios de cultivo bacteriano sigue siendo una metodología de uso frecuente en granjas acuícola, en especial con medios selectivos, debido a la falta de infraestructura o de personal especializado en técnicas moleculares.

Tabla I.- Bacterias cultivables determinadas como un porcentaje de bacterias crecidas en medio de cultivo comparadas con conteo total de células.

Hábitat	**% de cultivables[a]**
Agua de mar	0.001-0.1
Agua dulce	0.25
Lago mesotrófico	0.1-1
Agua estuarina no contaminada	0.1-3
Fango de alcantarilla activado	1-15
Sedimentos	0.25
Suelo	0.3

[a] Bacterias cultivables medidas como UFC.
(Tomado de Amann et al., 1995).

I.1.5.- Importancia del RNA ribosomal:

El rRNA puede ser encontrado en todos los organismos vivos, es relativamente estable y puede encontrarse en un gran número de copias (usualmente varios cientos por célula) y posee secuencias tanto variables como altamente conservadas, lo que lo hace un blanco ideal para metodologías moleculares (Amann et al., 2001).

Los primeros intentos para el análisis de muestras ambientales por estudio de rRNA empezaron hace aproximadamente 25 años (Woese, 1987). En estos estudios, moléculas de 5S rRNA fueron extraídas de muchas muestras y las moléculas pertenecientes a una comunidad distante de miembros fueron separadas por electroforesis para generar secuencias comparativas para el establecimiento de filogenias (Lane et al., 1985). Estos trabajos presentaron avances importantes, sin embargo, la información contenida en los aproximadamente 120 nucleótidos del 5S rRNA es relativamente pequeña, lo que limitó el análisis de microorganismos en ambientes complejos.

Un cambio de estrategia fue el trabajar con moléculas mayores de rRNA tales como el 23S rRNA y el 16S rRNA (Olsen et al., 1986). Las molécula de 23S rRNA y 16S rRNA contienen aproximadamente 3000 y 1500 nucléotidos, respectivamente, por lo que cuando son completamente analizados (o al menos un número mayor a 1000 nucléotidos), contienen suficiente información para análisis filogenéticos confiables. Por los avances en las técnicas moleculares, los organismos han sido agrupados con bases más firmes, que las obtenidas a través de la taxonomía clásica (Woese, 1987). Las células de diferentes especies tienen diferente contenido de ribosomas, el cual varía de 10^3 a 10^5 moléculas por células. A menudo para una cepa el contenido de ribosomas puede variar significativamente

(al menos en un orden de magnitud), ya que ellos están directamente relacionados con la tasa de crecimiento (De Long et al., 1989). La relativa abundancia de rRNA deberá, sin embargo, representar una razonable medida de la actividad fisiológica relacionada con una población en particular.

I.1.6.- Identificación de microorganismos en biopelículas:

Las metodologías moleculares han generado una reclasificación de los seres vivos con base a secuencias del rRNA ribosomal en la cual se establecen tres dominios filogenéticos: Eukaria, Bacteria y Archae (Woese, 1987). Con respecto a las bacterias se tiene ahora un nuevo esquema de clasificación el cual es resumido en la Figura 1.

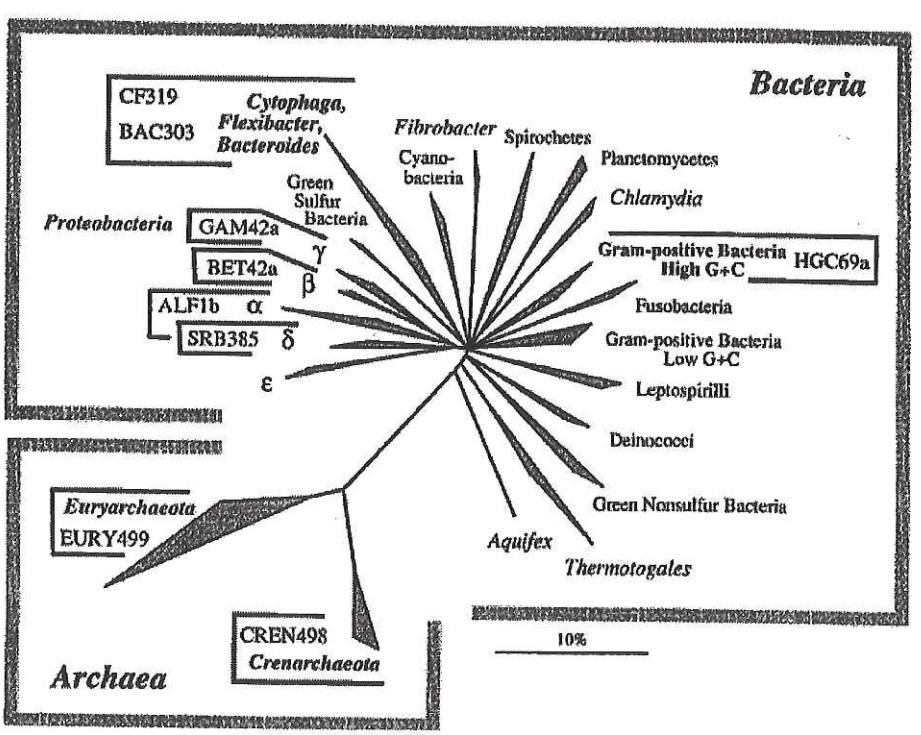

Figura 1.- Clasificación de microorganismos con base a secuencias del 16S rRNA y algunas sondas específicas (Tomado de Amann et al., 1995).

Otros de los avances introducidos por las metodologías moleculares ha sido la aplicación de técnicas *in situ* basadas en el rRNA, lo cual ha mejorado el monitoreo de las comunidades microbianas en las biopelículas (Amann et al., 1996; Aoi, 2002).

Uno de los métodos de determinación de microorganismos *in situ* desarrollados recientemente es el denominado FISH (Fluorescence *in situ* hibridization). FISH es altamente efectivo para detectar bacterias específicas y analizar la organización espacio-temporal de una comunidad microbiana compleja, debido a la posibilidad de detectar células bacterianas específicas a nivel de células simples por una hibridación *in situ* usando marcadores genéticos (sondas de oligonucleótidos con blanco en el 16S o 23S-rRNA) marcados con un compuesto fluorescente (Amann et al., 1990). El rRNA es un blanco ideal para hibridación *in situ* con sondas de oligonucleótidos debido a (i) que está presente en todos los organismos y la identificación de poblaciones naturales está basada en la clasificación filogenética de secuencias del 16S-rRNA; (ii) un gran número de secuencias de diferentes organismos están almacenadas en base de datos; (iii) un alto número de copias por célula incrementa grandemente la sensitividad de detección y mejora la identificación directa de una célula sencilla por medio del uso de microscopio de epifluorescencia o de un microscopio confocal de escaneo por láser (CSLM).

Las técnicas dependientes de FISH han contribuido a clarificar las estructuras de una comunidad microbiana *in situ* en varios tipos de comunidades de biopelículas, incluyendo aquéllas en medio ambiente natural y en sistemas de ingeniería (Tal et al., 2003). La ubicación de bacterias desconocidas y no cultivables en biopelículas ha sido analizada por el uso combinado de electroforesis en gel por gradiente de desnaturalización (PCR-DGGE) lo cual mejora el diseño de sondas de oligonucleótidos para FISH, siguiendo

la determinación de especies bacterianas blanco y secuencias de su 16S rDNA (Aoi, 2002). Algunos otros métodos combinados con FISH han incrementado la eficiencia de esta herramienta de diagnóstico como son el caso de su uso con microautoradiografía (MAR-FISH) (Lee et al., 1999), con microsensores (Ramsing et al., 1993) y con PCR *in situ* (Hodson et al., 1995).

A pesar de una serie de problemáticas identificadas en el uso de FISH, como es la ausencia de señal (fluorescencia), grupos bacterianos no detectados con la sonda general (Neff et al., 1998), la variabilidad en la cantidad de ribosomas en las células y problemas con la resolución de las sondas (Bouvier y del Giorgio, 2003), entre otros, ésta es una de las principales herramientas para evaluación y caracterización de comunidades bacterianas en biopelículas.

Muchos de los problemas con las bacterias presentes en cultivos larvarios, sobre todos aquellos que producen mortalidades, podrían estar directamente relacionados con la flora bacteriana que participa en la formación y estructuración de biopelículas. La interrelación de las biopelículas bacterianas con el cultivo no es clara, ya que actualmente no se conoce como se constituye una biopelícula en estos sistemas en espacio y tiempo, ni se ha estudiado a las bacterias no cultivables allí existentes. Se desconoce la influencia de la adición de alimento al cultivo sobre la conformación de grupos bacterianos y de las biopelículas, las cuales constituyen el principal elemento biótico del cultivo. La abundante disponibilidad de materia orgánica en estos sistemas de producción favorece el desarrollo de microorganismos, que en un momento dado pueden convertirse en elementos patógenos que pueden poner en riesgo la viabilidad del cultivo. El conocer como están compuestas filogenéticamente las poblaciones bacterianas en las biopelículas durante los cultivos,

mejorará el entendimiento de los diversos factores microbiológicos que favorecen o ponen en riesgo el éxito de los cultivos larvarios de *L. vannamei.* Por lo anterior, para el presente trabajo se establecieron los siguientes objetivos:

I.2. OBJETIVOS:

♦ Evaluar la concentración de bacterias tipo *Vibrio* (BTV), bacterias heterótrofas viables (BHV) y bacterias totales (BT) presentes en biopelículas formadas en tanques durante diferentes estadios de desarrollo larvario y postlarvario de *Litopenaeus vannamei.*

♦ Establecer el porcentaje de hibridación con sondas específicas de grupos bacterianos presentes en biopelículas formadas en tanques durante el cultivo larvario y postlarvario de *Litopenaeus vannamei.*

♦ Evaluar cargas de bacterias (BTV, BHV y BT) así como los porcentajes de hibridación de grupos bacterianos específicos en muestras de agua de fuentes externas al cultivo larvario: agua de cultivo, microalga, nauplios vivos de *Artemia franciscana* y nauplios de *Artemia franciscana* cocidos y congelados.

♦ Establecer el porcentaje de bacterias cultivables (BTV y BHV) relacionadas con bacterias totales y de BTV con relación a BHV, en muestras de biopelículas y de agua de fuentes externas.

♦ Relacionar porcentajes de hibridación en muestras de agua de cultivo y biopelículas obtenidas durante la producción larvaria de *Litopenaeus vannamei.*

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1.- Lugar de estudio y fechas de muestreo.

Los muestreos de biopelículas se realizaron en tanques de producción comercial de larvas de camarón de la Empresa AREMAR, S.A. de C.V., ubicada en la Unidad Experimental Peñasco, de la Universidad de Sonora en Puerto Peñasco, Sonora, México. Los muestreos se realizaron en 3 producciones larvarias llevadas a cabo en los períodos del 2 al 29 de febrero (P1); del 13 de abril al 08 de mayo (P2) y del 12 de julio al 06 de agosto (P3) del año 2004.

II.2.- Condiciones generales del cultivo.

Los cultivos larvarios se efectuaron en tanques rectangulares construidos de concreto y recubiertos interiormente con pintura epóxica blanca resistente al agua de mar. El volumen total de los tanques fue de 28 m^3. Estos están ubicados en naves construidas de material sólido con techo translúcido de fibra de vidrio color amarillo, para permitir el paso de luz. Antes de cada cultivo, los tanques fueron lavados exhaustivamente con ácido clorhídrico comercial (35%), enjuagados con agua dulce y lavados con solución comercial de hipoclorito de sodio (Clorox) y de nuevo enjuagados con agua dulce. Estos se dejaron secar hasta su uso.

El agua empleada para el cultivo fue obtenida de un pozo costero de aproximadamente 30 pies de profundidad. El agua de mar no recibió ningún tratamiento antes de llegar al cultivo, únicamente pasó a través de filtros de bolsa de 1 μm de poro inmediatamente antes de su llegada a los tanques. Un sistema de 2 calderas fue utilizado

para calentar indirectamente el agua en época de invierno por medio de serpentines de PVC flexible en el interior de los tanques. La oxigenación se realizó por flujo de aire a presión generado por aereadores externos y conducido por tubería de PVC con orificios, colocada en el fondo de los tanques.

Para las siembras se utilizaron nauplios V de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei* (Boone), comprados a un laboratorio productor de larvas en la ciudad de la Paz, Baja California Sur, México.

Los cultivos larvarios se llevaron a cabo a una temperatura constante de 30±2 °C por un período de 26 días, hasta la etapa de postlarva 16. La salinidad se mantuvo en 35‰ y el oxígeno disuelto fue superior a 6 ppm. Los nauplios en el estadio de zoea fueron alimentados con cultivos de la microalga *Chaetoceros muelleri* (Lemm.) a concentraciones entre 70,000 y 120,000 células/ml. La microalga *Isochrysis galvana* se adicionó esporádicamente al cultivo en una proporción máxima del 20% del total de microalga. Al final del estadio zoea III se adicionaron nauplios de *Artemia franciscana* (Salt Creek, UTAH, USA), cocidos a 80-90 °C durante 10-15 minutos, a una concentración de 4 nauplios/larva/día. El excedente de nauplios cocidos fue congelado hasta por 3 días a -4 °C y se utilizó en las alimentaciones posteriores en estos estadios. Esta práctica continuó hasta el estadio Mysis II, donde se empezó a adicionar nauplios de *Artemia* vivos (20 nauplios/larva/día), lo cual se continuó hasta el final del cultivo en Pl16 (104 nauplios/larva/día) (Fig. 2). Durante todo el cultivo diariamente se adicionó EDTA (10 ppm), mientras que en los primeros doce días se añadió al cultivo el compuesto treflán (Sinfluran 4 EC, Trifuralina, Westrade de México) a 10 ppm, para controlar el brote de hongos (principalmente *Lagenidium* sp.). En este período se añadieron cada tercer día, de

manera escalonada, los antibióticos cloranfenicol (Fagalab) (1 gr/m^3), enrofloxacina (Enroqueen plus solución oral 10%; Fagalab.) (4 ml/m^3) y furazolidona (Fagalab) (1.5 gr/m^3) hasta finalizar en el estadio Pl1. Al arribar al estadio Pl12, se adicionó al cultivo formol (Fagalab) al 37% y furazolidona (Fagalab) en cantidades de 15 ml/m^3 y 1.5gr/m^3, respectivamente. A partir del estadio Pl15 y hasta la cosecha se añadió cal (hidróxido de calcio hidratado) al cultivo a una concentración de 1 ppm. En la etapa de postlarva se adicionó al cultivo alimento microencapsulado (Microfeast) como complemento a la alimentación con nauplios de *Artemia* vivos (Tabla II). A partir del estadio Zoea III se establecieron recambios de agua en los tanques de producción que fueron desde 30% diario al inicio, hasta un 100% diario hacia el final del cultivo (Pl16).

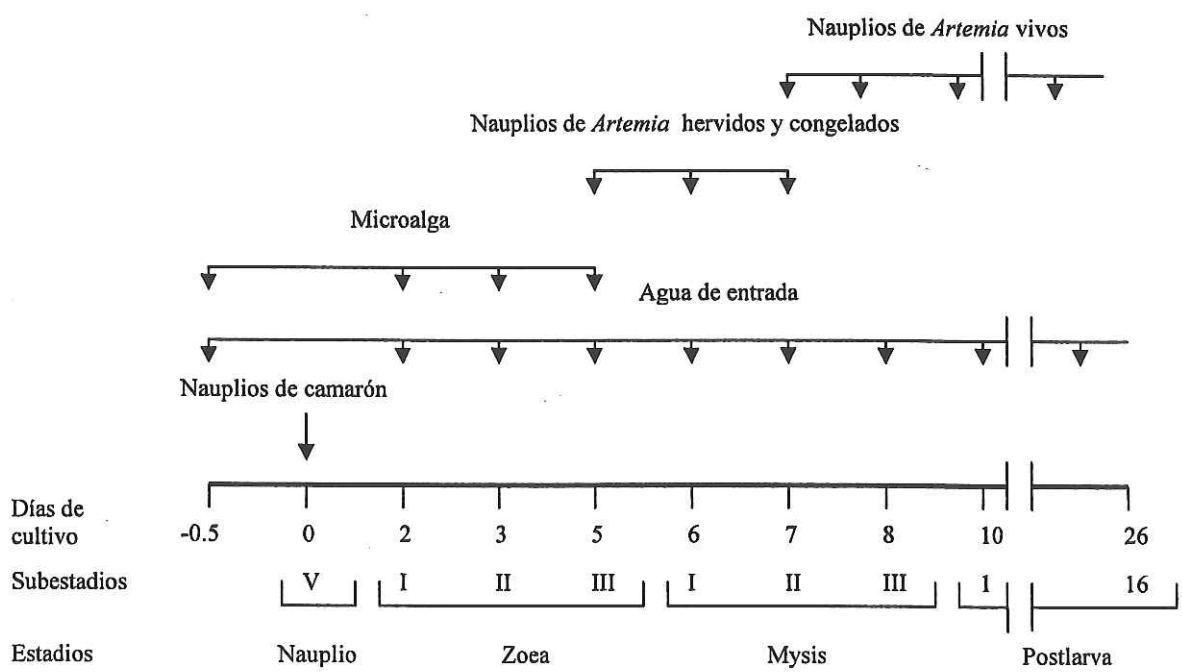

Figura 2.- Principales fuentes externas potenciales de entrada de bacterias al cultivo larvario de *Litopenaeus vannamei* de acuerdo a su desarrollo larvario.

Tabla II.- Rutina de tratamientos para larvas y postlarvas de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei* de la empresa AREMAR S.A. de C.V. en Puerto Peñasco, Sonora.

Días de cultivo	Estadio	Manejo de agua			Tratamientos y aditivos			
		Bajar m^3	% Flujo	Subir m^3	EDTA gr/m^3	Treflán	Antibióticos	Vit.C/Cal (ppm)
1	NV	----------	---------	12	20	10	CP 1 gr/m^3	------
2	ZI	----------	---------	16	20	10	Enroqueen 4 ml/m^3	-------
3	ZII	----------	----------	20	20	10	----------	-------
4	ZII/ZIII	----------	----------	24	20	10	----------	-------
5	ZIII	14	----------	24	20	10	Enroqueen 5 ml/m^3	-------
6	MI	12	----------	24	10	10	----------	1
7	MII	10	----------	24	10	10	----------	1
8	MIII	10	----------	24	10	10	Fura 1.5gr/m^3	1
9	MIII/Pl 1	10	----------	24	10	10	Fura 1.5gr/m^3	1
10	Pl 1	8	---------	24	10	10	----------	1
11	Pl 2	8	---------	24	10	10	----------	1
12	Pl 3	Flujo	80	24	10	10	Formol 37% 15ml/m^3+ Fura 1.5gr/m^3	1
13	Pl 4	Flujo	80	24	10	----------	----------	1
14	Pl 5	Flujo	100	24	10	----------	----------	1
15	Pl 6	Flujo	100	24	10	----------	----------	1/1
16	Pl 7	Flujo	100	24	10	----------	----------	1/1
17	Pl 8	Flujo	100	24	10	----------	----------	1/1
18	Pl 9	Flujo	100	24	10	----------	----------	1/1
19	Pl 10	Flujo	100	24	10	----------	----------	1/1
20	Pl 11	Flujo	100	24	10	----------	----------	1/1
21	Pl 12	Flujo	100	24	10	----------	----------	1/1

CP:Cloranfenicol. Fura:Furazolidona

II.3.- Tanques muestreados.

En las tres producciones estudiadas, se tuvieron tanques con densidades de nauplios V que fluctuaron entre 2.75 y 10 millones (Tabla III). Todos los tanques se sembraron a un volumen inicial de 16 m^3 de agua de mar y se incrementó su volumen diariamente hasta llegar a 24 m^3 (volumen total para el cultivo) al cuarto día de cultivo, el cual se mantuvo hasta el final de la producción. Para los tanques sembrados con el doble de organismos, la población fue dividida en dos tanques en la etapa de Zoea III (al séptimo día de cultivo).

II.4.- Muestreos de biopelículas bacterianas en tanques de cultivo larvario.

En todos los casos se muestrearon biopelículas de la pared adyacente al drenaje en los tanques de cultivo en las etapas de desarrollo de Zoea I (ZI), Mysis I (MI), postlarva 1 (Pl1) y postlarva 16 (Pl16) durante los recambios de agua. Para el muestreo en el estadio de ZI, las biopelículas se obtuvieron con portaobjetos limpios y estériles introducidos y suspendidos con cuerdas estériles dentro de los tanques una vez adicionada la microalga *C. muelleri* (70 000 cel/ml), 1 gr/m^3 de cloranfenicol, 20 gr/m^3 de EDTA, 10 ppm de treflán al agua de cultivo y aproximadamente 10 horas antes de la siembra de los nauplios de camarón. Los portaobjetos se mantuvieron hasta que las larvas en cultivo alcanzaron el estadio ZI (aproximadamente 40 horas en total). Una vez extraídos los portaobjetos se enjuagaron con 5 ml agua de mar diluída a 28‰ de salinidad, esterilizada y filtrada por 0.22mμ (AMEF), para eliminar bacterias planctónicas no adherida. Se escurrió el exceso de agua y con un cotonete de algodón estéril se muestreó la biopelícula de una superficie de 10 cm^2. El cotonete se introdujo en un tubo de ensayo con 10 ml de AMEF para dar una dilución 1:1.

Esta muestra se trasladó al laboratorio para los análisis bacteriológicos descritos posteriormente.

Tabla III.-Características de siembra de nauplios de *Litopenaeus vannamei* en las tres producciones evaluadas en la empresa AREMAR, S.A. de C.V. en Puerto Peñasco, Sonora.

Producción	Sala sembrada	Fecha	Tanques	Nauplios/tanque (Millones)	Total siembra/día (Millones)
1	C	2 febrero 2004	CT2*	10	25
			CT3	5	
			CT4*	10	
		3 febrero 2004	CT7*	10	25
			CT8	5	
			CT9*	10	
2	A	13 abril 2004	AT1	3.75	22.5
			AT2	3.75	
			AT3	3.75	
			AT4	3.75	
			AT5	3.75	
3	C	12 julio 2004	CT2*	10	25
			CT3	5	
			CT4*	10	
		13 julio 2004	CT7*	10	25
			CT8	5	
			CT9*	10	

*Del quinto al sexto día de cultivo, en el estadio Zoea III, la mitad de población de organismos sembrados se pasó a otro tanque, para igualar las poblaciones.

Para los muestreos subsecuentes, las biopelículas se obtuvieron directamente de las paredes de los tanques ubicadas en la zona de drenaje durante el recambio de agua a un volumen de $18m^3$ (volumen mínimo al recambio). Cada muestra en un mismo tanque se tomó de distinta posición horizontal de la pared pero a la misma altura.

Para la toma de muestra se utilizó una plantilla de PVC preparada con una abertura de 100 cm^2 lavada previamente con alcohol y secada al aire antes de cada muestreo. La biopelícula se obtuvo raspando con un portaobjetos estéril y dos cotonetes de algodón estériles, los 100 cm^2 delimitados por la plantilla. Inmediatamente fueron introducidos en un frasco con tapón de rosca (Corning) con 100 ml de AMEF. Los frascos con las diluciones fueron trasladados al laboratorio para la cuantificación de BHV, BTV y tinción con DAPI para BT. De las muestras anteriores se tomaron alícuotas que se fijaron con formol (Spectrum) al 6% (concentración final), previamente filtrado a través de un filtro millipore de 0.22 µm, para llevar a cabo el estudio de fluorescencia por hibridación *in situ* (FISH). Las muestras fijadas se conservaron a -20° C hasta su procesamiento. En total se tomaron 17 muestras por cada uno de los estadios larvarios, a partir de los cuales se evaluaron los promedios para cada uno de ellos.

II.5.- Agua de fuentes externas de bacterias al cultivo:

Se tomaron un total de 10 muestras de agua a la entrada de los tanques de cultivo después de pasar por un filtro de bolsa de 1 µm por las tres producciones. Asimismo, se analizaron 8 muestras de agua del cultivo de *C. muelleri* cultivada en tanques plásticos a un volumen de 2500 litros. En el caso de *Artemia* cocida y congelada se analizaron 8 muestras, mientras que en *Artemia* viva (Sorgeloos et al., 1986), se analizaron 6 muestras por las tres producciones. Agua de nauplios de camarón se analizó en cinco ocasiones. Todas las muestras fueron tomadas en tubos de centrífugas cónicos estériles de 50 ml de capacidad (Falcon) e inmediatamente procesadas de acuerdo a lo establecido en la sección II.4. y analizadas según lo descrito en las secciones II.6, II.7 y II.7.2.

II.6.- Cuantificación de bacterias cultivables y totales.

Una vez en el laboratorio, tanto las muestras de biopelículas como de agua fueron agitadas en un vórtex (VWR) por 1 minuto a velocidad máxima. Se realizaron diluciones seriadas, cuando fue requerido, en tubos de ensayo conteniendo AMEF. De las diluciones seleccionadas se inoculó por duplicado una alícuota de 0.1 ml, por la técnica de siembra en superficie en los medios de cultivo agar de ZoBell (AZ) para evaluar bacterias heterótrofas viables (BHV) y en agar Tiosulfato-Citrato Sales Biliares-Sacarosa (TCBS, DIFCO) para evaluar las bacterias tipo *Vibrio* (BTV). En muestras de agua donde se esperaba un bajo contenido de BTV, se filtró por vacío diferentes volúmenes de agua a través de un filtro millipore de 0.45 μm de poro y 47 mm de diámetro, que fue colocado en placas con agar TCBS. Asimismo se filtraron muestras para conteos de BT por tinción con DAPI (4', 6' diamino-2 fenilindol, SIGMA) de acuerdo a lo recomendado por Vargas-Cárdenas et al. (1999). Las placas inoculadas se incubaron por 48±2 horas a 30±2 °C y se contabilizaron las unidades formadoras de colonia (UFC). Los portaobjetos con las muestras teñidas con DAPI fueron mantenidos en frío (10°C) hasta su conteo por medio de un microscopio invertido de epifluorescencia Zeiss Axiovert 100.

II.7.- Hibridación *in situ* fluorescente (FISH).

Para el análisis de las muestras por FISH se siguió el procedimiento establecido por Manz et al. (1992), con algunas modificaciones.

Para el análisis, 12 ml de cada muestra fijada con formol se centrifugó 15 000 x g durante 5 minutos y se lavó dos veces con 1 ml de un buffer de fosfato salino 1X, pH 7.2 (PBS) para remover totalmente el fijador. Finalmente las muestras se disolvieron en 0.5 ml

de PBS 1X y 0.5 ml de alcohol etílico absoluto frío. Las muestras tratadas de esta manera se conservaron en frío (10 °C) hasta su análisis.

Para el análisis se colocaron 8 µl de muestra por ventana de un portaobjetos cubierto con teflón (Precision Lab Products), previamente impregnados por inmersión en una solución de gelatina y sulfato de potasio crómico al 0.1% y 0.01%, respectivamente y secados al ambiente. Las muestras en los portaobjetos se secaron a temperatura ambiente y se deshidrataron en series de alcohol etílico al 50%, 80% y 98% por 3 minutos en cada una de ellas, para luego secarse también a temperatura ambiente. Los portaobjetos con las muestras adheridas y deshidratadas pueden conservarse indefinidamente.

II.7.1.- Sondas para hibridación:

En el estudio se utilizaron las sondas de oligonucleótidos mostradas en la Tabla IV. Las sondas fueron elaboradas por Genosys-Sigma (México) y marcadas con el fluorocromo indocarbocianina CY3 en el extremo 5'.

Las sondas EUB338 (bacterias en general), GAM42a (subclase γ-Proteobacterias: que agrupa a bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Alteromonas*, *Thiotrix*, *Leucotrix*, entre otros). ALF1b (subclase α-Proteobacterias: género *Rickettsia*, *Rodobacter*, *Roseobacter*, entre otros), BET42a (subclase β-Proteobacterias: grupo oxidantes de amonio y otros), SRB385 (subclase δ-Proteobacterias: con grupos como *Desulfovibrio*) y NHGC (bacterias Gram positivo con bajo GC, como *Bacillus*, *Clostridium*, Mycoplasmas, *Staphylococcus*). Las sondas anteriormente mencionadas fueron desarrolladas por Amann et al. (1995), mientras que la sonda HGC69a (bacterias con alto GC: como *Actinobacterias*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*) fue propuesta por Roller et al. (1994).

Tabla IV.- Sondas de oligonucleótidos utilizadas para hibridación *in situ*, marcadas en la posición 5' con el fluorocromo indocarbocianina CY3.

Sonda	Secuencia	Sitio blanco en rRNA (posición)[a]	Especificidad	%F[b]
EUB 338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S, 338-355	bacteria	35
NHGC	TATAGTTACGGCCGCCGT	23S, 1901-1918	Bacterias con bajo GC.	35
HGC69a	TATAGTTACCACCGCCGT	23S, 1901-1918	Bacterias Gram positivo con alto GC	25
ALF1b	CGTTCGCTCTGAGCCAG	16S,19-35	α-Proteobacteria	35
BET42a	GCCTTCCCACTTCGTTT	23S, 1027-1043	β-Proteobacteria	35
SRB385	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	16S, 385-402	δ-Proteobacteria	35
GAM42a	GCCTTCCCACATCGTTT	23S, 1027-1043	γ-Proteobacteria	35

[a] posición en *E. coli*, [b] porcentaje de formamida durante la hibridación.
(Fiedrich *et al.*, 2001).

Las sondas BET42a y la sonda GAM42a fueron utilizadas con oligonucleótidos competidores de acuerdo a lo recomendado por Manz et al. (1992).

II.7.2.- Condiciones de hibridación:

Se prepararon 2 ml de buffer de hibridación (BH), de los cuales 8 µl se añadieron a cada ventana del portaobjetos para una concentración final de 0.9M NaCl, 0.01% dodecyl sulfato de sodio (SDS) y 20mM Tris/HCl, pH 7.2. La formamida se aplicó en un 35% en el BH para todas la sondas, excepto para HGC69a donde se utilizó a 25% (Tabla IV). Antes de aplicar el BH al portaobjetos se le añadió la sonda específica para dar una concentración final de 3 ng/µl. Los portaobjetos con el BH se introdujeron en un tubo de polipropileno de 50 ml (cámara de hibridación), el cual contenía una pieza de papel absorbente que se humedeció con el sobrante del BH para mantener saturada la cámara y evitar variación en

la concentración de los reactivos durante la hibridación. Ésta se llevó a cabo a 46°C por un tiempo de 12±1 horas en la oscuridad. Los portaobjetos se retiraron de los tubos y fueron lavados por 10 minutos en un tubo con buffer de lavado precalentado a 48°C, que contenía 700 ml NaCl 5M, 1ml Tris/HCl 1M, 48.25 ml de agua destilada filtrada por un filtro millipore de 0.22 µm y esterilizada en autoclave (ADFE) y 50 µl de SDS al 10%, para las sondas hibridadas con 35% de formamida. Para la sonda HGC69a la cantidad de NaCl 5M fue de 1490 ml y de ADFE de 42.46 ml. Posteriormente los portaobjetos fueron lavados con ADFE y secados a temperatura ambiente en la oscuridad, para después ser contrateñidos con 4µl de DAPI (1µg/ml) por ventana del portaobjetos durante 5 minutos en la oscuridad y finalmente lavados y secados como se mencionó anteriormente.

Paralelo al análisis de las muestras se utilizaron dos cultivos bacterianos puros como controles para observar la especificad de tres sondas. *Vibrio harveyi* Z2, sonda GAM42a y *Bacillus subtilis* (ATCC 15134), sonda NHGC. Ambas cepas se utilizaron también para la sonda EUB338.

II.7.3.- Observación al microscopio:

Para la observación al microscopio se añadieron 5µl de CITIFLUOR AF87 (Citifluor) (sustancia antiblanqueo) a cada ventana del portaobjetos para posteriormente colocar un cubreobjetos y finalmente aceite de inmersión. La observación se realizó en un microscopio Zeiss Axiovert 100 con un filtro de excitación verde con el set TRIC/Dil 31002 (Chroma), para cuantificar el número de células hibridadas con los oligonucleótidos. El total de células bacterianas por muestra fue determinado por los conteos con DAPI usando un filtro con excitación UV.

Los conteos de células hibridadas con cada sonda fueron calculados como un porcentaje del total de células observadas en relación con las cuantificadas con DAPI en los mismos campos.

II.8.- Análisis estadísticos.

Los análisis estadísticos realizados fueron desarrollados con el programa ProStat versión 3.0. Análisis de varianza y pruebas de rango múltiple de la menor diferencia significante (LSD) fueron aplicadas para determinar las diferencias significativas ($P<0.05$), en los grupos bacterianos de los diferentes estadios de desarrollo larvario evaluados y los porcentajes de bacterias cultivables; asimismo para los porcentajes de hibridación con las diferentes sondas. Todos los datos de concentración bacteriana (UFC o BT) fueron transformados a logaritmo base 10 y los porcentajes de bacterias cultivables y de hibridación fueron transformados por el arcoseno antes del análisis estadístico, de acuerdo a lo recomendado por Zar (1984).

III. RESULTADOS

III.1.- Densidad de siembra de nauplios de camarón.

Para las producciones 1 y 3, la siembra de nauplios se realizó en dos días consecutivos con diferente densidad de siembra en algunos tanques (Tabla III). En la Figura 3 se observan los valores logarítmicos de las concentraciones de BHV, BTV y BT. Los tres grupos bacterianos muestran una ligera tendencia a incrementar con relación a la edad del cultivo. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) dentro de los grupos de bacterias en cada estadio evaluado con relación a la densidad de siembra, por lo que todos los resultados se analizaron sin tomar en cuenta esta característica del cultivo.

III.2.- BHV, BTV y BT en biopelículas de tanques de cultivo larvario.

En la Figura 4 se presentan los valores logarítmicos de los conteos de los tres grupos bacterianos por estadios en las tres producciones. De manera general, se observó una relación directa de los conteos de los tres grupos bacterianos con respecto a la edad del cultivo, con valores elevados al final del período.

Para las BHV, la concentración varió entre $9.0x10^1$ UFC/cm^2 para el estadio MI de la P3, hasta $8x10^3$ UFC/cm^2 en el estadio Pl16 de la P2. Los valores más elevados en las tres producciones (10^3 UFC/ml) se obtuvieron en Pl16.

Los valores para BTV variaron desde menos de 2 UFC/cm^2 en el estadio MI de la P3, hasta $8.0x10^1$ UFC/cm^2 para el estadio Pl16 de la P1. Sin embargo, la mayoría de los valores promedios por producción presentaron menos de 10 UFC/cm^2.

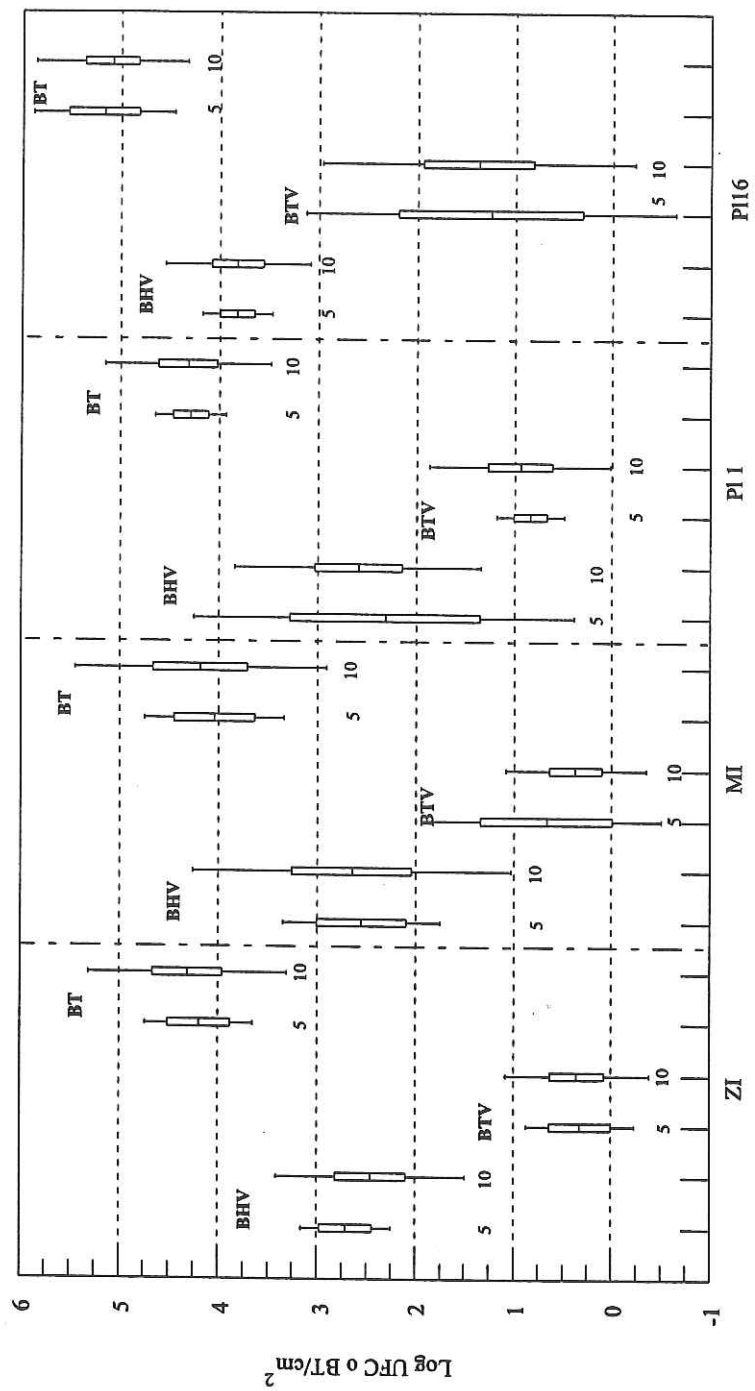

Figura 3.- Bacterias en biopelículas de tanques durante el cultivo larvario de *Litopenaeus vannamei* con diferente densidad de siembra inicial (5 y 10 millones de nauplios), durante dos corridas de producción (P1 y P3). No se encontraron diferencias significativas (P>0.05) dentro de los grupos de bacteria heterótrofas viables (BHV), bacterias tipo *Vibrio* (BTV) y bacterias totales (BT) en los estadios de desarrollo larvario de Zoea I (ZI), Mysis I (MI), postlarva 1 (Pl1) y postlarva 16 (Pl16).

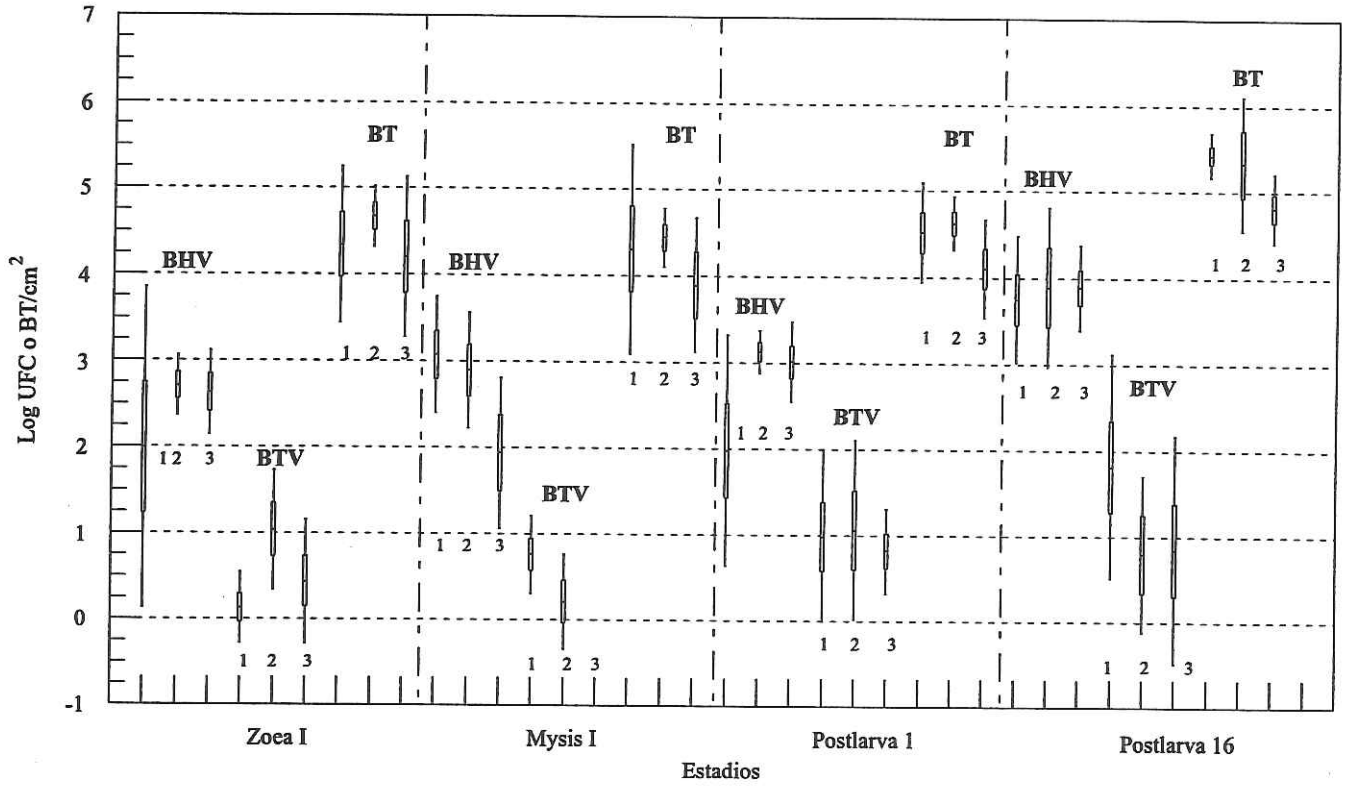

Figura 4.- Bacterias heterótrofas viables (BHV), bacterias tipo *Vibrio* (BTV) y bacterias totales (BT) en biopelículas de tanques de cultivo larvario de *Litopenaeus vannamei* durante tres producciones (1, 2 y 3), en los diferentes estadios de desarrollo.

Por lo que respecta a los BT, al igual que los dos grupos bacterianos anteriores, presentaron un incremento hacia el estadio Pl16 en las tres producciones. Este grupo presentó la menor fluctuación y solo varió en una potencia entre los estadios en las tres producciones. Los valores menores se presentaron en el estadio MI. Las BT variaron desde $8.5x10^3$ bacterias/cm^2 en el estadio MI de la P3 hasta $4.5x10^5$ bacterias/cm^2 en Pl16 de la P1.

Con los valores promedio por estadio de las tres producciones, se obtuvieron los resultados que se observan en la Figura 5. Los valores logarítmicos promedio muestran que en las BHV el rango promedio fluctuó desde $6.0x10^2$ UFC/cm^2 en ZI hasta $9.0x10^3$ UFC/cm^2 en el estadio Pl16. En tanto que las BTV variaron desde $3.5x10^0$ UFC/cm^2 para el estadio MI hasta $2.5x10^1$ en el estadio Pl16. Las BT promedio presentaron menor variación entre los estadios, con valores de 10^4 bacterias/cm^2 para los primeros tres estadios y $2.0x10^5$ bacterias/cm^2 en Pl16 valor que es estadísticamente diferente ($P<0.05$).

Las concentraciones de bacterias en los tres grupos bacterianos se incrementaron hacia el estadio Pl16 con diferencias estadísticas ($P<0.05$) con relación a los primeros estadios.

III.3.- FISH en biopelículas de tanques de cultivo larvario.

En la Figura 6 se presentan los porcentajes de hibridación por estadio de desarrollo larvario y producción de las dos sondas que presentaron mayor señal de hibridación: EUB338 y GAM42a. Se puede apreciar que la sonda GAM42a presentó una menor fluctuación para los diferentes estadios y producciones, mientras que la sonda EUB338 mostró una tendencia de incrementar con la edad del cultivo. El mayor porcentaje de

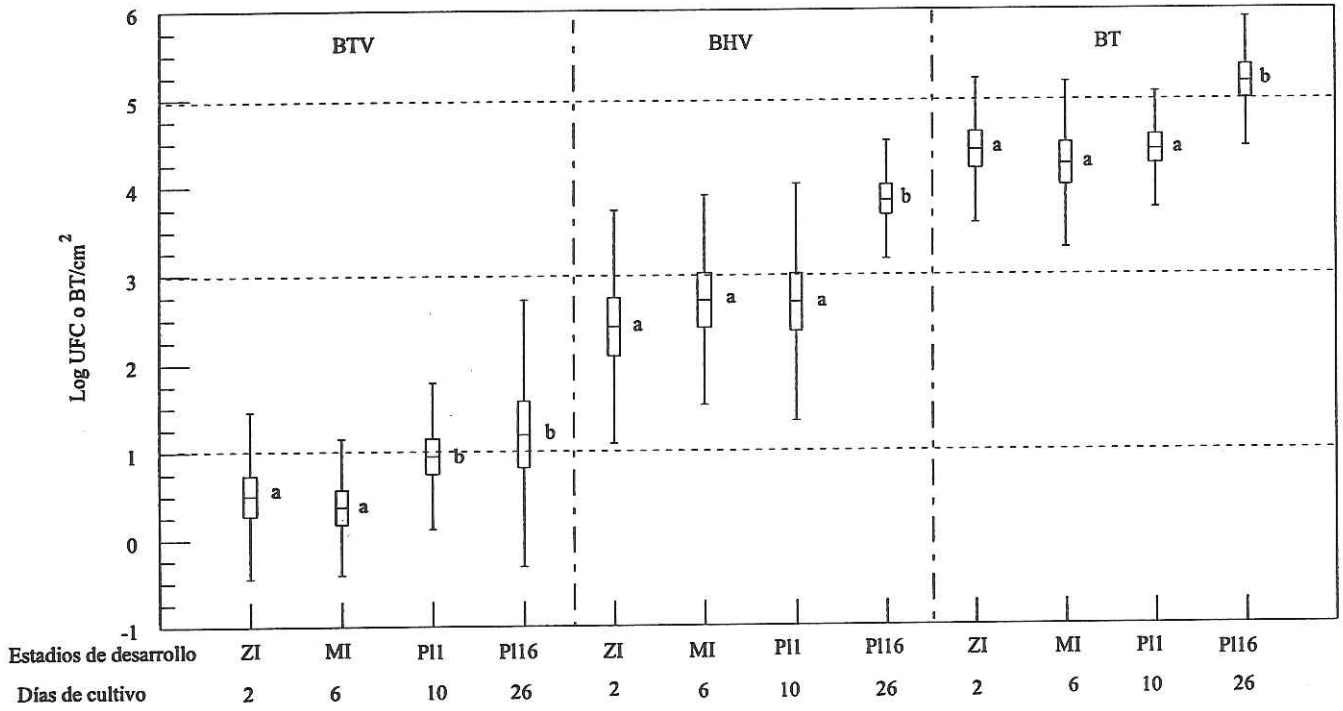

Figura 5.- Valores promedio de bacterias tipo *Vibrio* (BTV), bacterias heterótrofas viables (BHV) y bacterias totales (BT) en los diferentes estadios de desarrollo larvario para las tres producciones evaluadas. Letras diferentes (a,b) dentro de los grupos de bacterias representan diferencia estadística significativa ($P<0.05$).

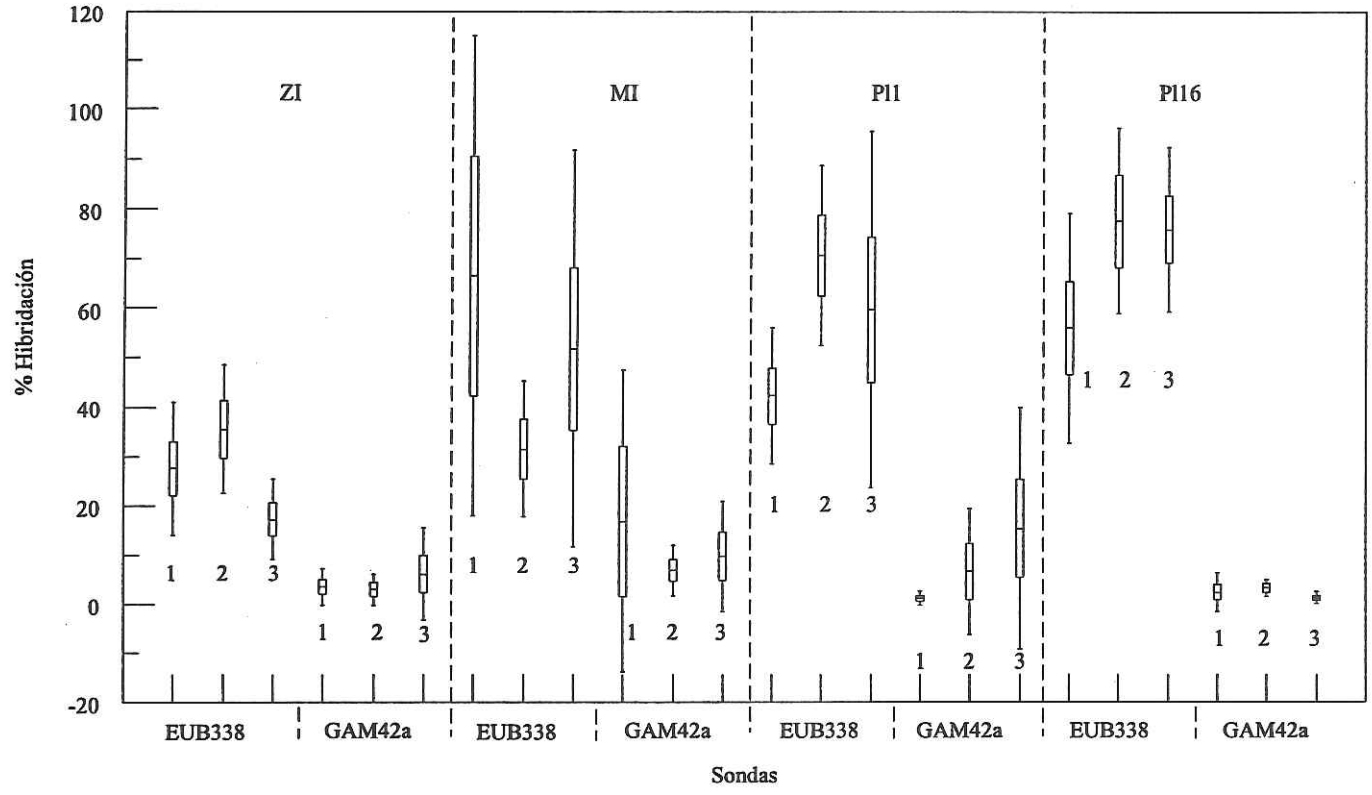

Figura 6.- Porcentajes de hibridación en muestras de biopelículas durante tres producciones (1, 2, 3) de cultivo larvario de *Litopenaeus vannamei* en los estadios de Zoea I (ZI), Mysis I (MI), postlarva 1 (PI1) y postlarva 16 (PI16), de las sondas EUB338 y GAM42a. Las sondas restantes solo alcanzaron un máximo 1% de hibridación (no graficadas).

hibridación para la sonda EUB338 fue de 80% el estadio Pl16 de la P2 y el menor fue de 18% para el estadio de ZI de la P3. La señal para la sonda GAM42a varió desde un porcentaje de hibridación de 18% en el estadio de MI en la P1, hasta aproximadamente 1% para el estadio Pl16 de la P3.

En la figura 7 se presenta el promedio porcentual de hibridación de cada una de las sondas presentadas en la figura 6. El promedio porcentual de hibridación con la sonda EUB338, relacionado con conteos de DAPI, varió entre 27% (ZI) y 70% (Pl16). El promedio porcentual de hibridación para ZI (27%) presentó diferencia significativa ($P<0.05$) con respecto a los tres estadios que le anteceden, MI (50%), Pl1 (58%) y Pl16 (70%). MI y Pl1 presentaron valores inferiores, significativamente diferentes ($P<0.05$) a Pl16. La tendencia general para esta sonda fue de incremento con relación a la edad del cultivo.

La señal de hibridación con la sonda GAM42a no presentó diferencias estadísticas significativas ($P>0.05$) en los tres primeros estadios; sin embargo, MI y Pl1 fueron diferentes estadísticamente ($P<0.05$) de Pl16. Los porcentajes promedio variaron entre 11% y 1% para MI y Pl16, respectivamente. La señal de hibridación en los estadios ZI y Pl16, no presentó diferencia significativa ($P>0.05$) con relación a otras sondas distintas a EUB338. Esta sonda no presentó una tendencia de aumento con la edad del cultivo, sino al contrario, en el mayor estadio evaluado su señal de hibridación disminuyó notablemente.

El porcentaje de hibridación de GAM42a con relación a EUB338 presentó una tendencia a reducirse de acuerdo a la edad del cultivo con porcentaje promedio de 26.5% para los estadios de ZI y MI hasta 3% para el estadio Pl16.

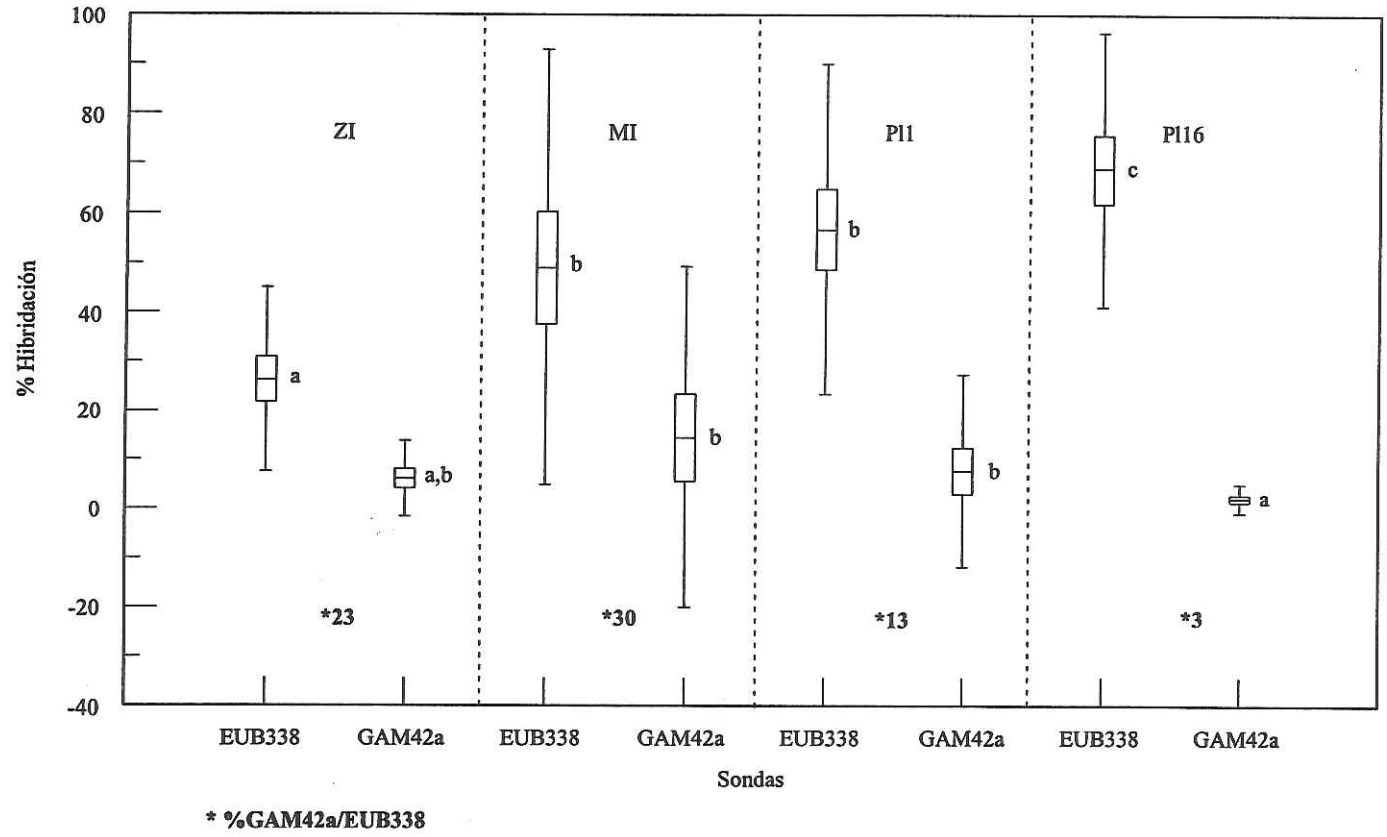

Figura 7.- Promedios de porcentajes de hibridación obtenidos de la figura 6. Diferente letra (a, b, c) representa diferencia estadística significativa ($P<0.05$) entre los estadios para cada sonda.

Las sondas NHGC, BET42a, ALF1b, SRB385 y HGC69a presentaron señales de hibridación inferiores a 1%, sin diferencia significativa (P>0.05) entre ellas.

III.4.- Porcentajes de bacterias cultivables en biopelículas.

La relación de las concentraciones de BHV y BTV con BT (BHV/BT, BTV/BT) se presenta en la Tabla V.

La relación de BHV/BT presentó un rango que varió de 0.6 hasta 12.9, con tendencia a incrementarse desde ZI (1.9) hacia el estadio de Pl16 (7.1). BTV/BT presentó un rango inferior de fluctuación desde 0.01 hasta 0.09 con una tendencia de incremento similar a lo presentado por BHV/BT.

La relación de las BTV con los valores de BHV (BTV/BHV), las cuales representan grupos bacterianos comúnmente evaluados en sistemas de producción acuícola como indicadores de calidad bacteriológica, se observa en la Tabla VI. Los valores no muestran una tendencia clara con la edad del cultivo o con la época de producción.

No se encontraron diferencias estadísticas (P>0.05) entre los estadios de cada una de las producciones, aunque se observan diferencias entre valores del estadio Pl16 de la P1 y P3. Los valores porcentuales variaron numéricamente desde 0.1% para el estadio Pl16 de la P3, hasta 4.3% para el estadio Pl1 de la P1. Los promedios porcentuales por estadio presentaron un valor máximo y mínimo de 2.0% y 0.7% para los estadios Pl1 y MI-Pl16, respectivamente.

En muestras de agua de cultivo de la producción 2 y 3 en los estadios Pl1 y Pl16, los porcentajes de BTV/BHV tuvieron un valor de 1.1% (1.3-0.9%) y de 17% (30.3-3.7%), respectivamente.

Tabla V.-Valores promediados de los porcentajes de la relación de bacterias heterótrofas viables (BHV/BT) crecidas en agar de ZoBell y bacterias tipo *Vibrio* (BTV/BT) crecidas en TCBS, con conteos de bacterias totales hechos con DAPI, en muestras de biopelículas de tanques de cultivo larvario de *Litopenaeus vannamei* en los diferentes estadios de desarrollo larvario y producciones. Los valores son $^{*}X \pm ES^{**}$. Letras diferentes en columnas (*) o renglones (**) representan diferencia estadística significativa ($P<0.05$) por producción o estadio.

Producción	Grupo bacteriano	ZI	MI	PI1	PI16
1	BHV	$^{a}1.6\pm0.8^{a}$	$^{a}9.0\pm3.1^{b}$	$^{a}0.6\pm0.2^{a}$	$^{a}3.3\pm1.7^{a}$
6 muestras	BTV	$^{a}0.009\pm0.002^{a}$	$^{a}0.06\pm0.03^{b}$	$^{a}0.03\pm0.008^{ab}$	$^{a}0.06\pm0.03^{ab}$
2	BHV	$^{a}1.4\pm0.5^{a}$	$^{b}3.7\pm0.9^{a}$	$^{a}3.3\pm0.2^{a}$	$^{a}4.3\pm1.2^{a}$
6 muestras	BTV	$^{a}0.02\pm0.008^{a}$	$^{b}0.009\pm0.004^{a}$	$^{a}0.07\pm0.04^{a}$	$^{a}0.009\pm0.005^{a}$
3	BHV	$^{a}2.9\pm0.7^{a}$	$^{b}1.7\pm1.0^{a}$	$^{b}11.5\pm4.0^{b}$	$^{b}12.9\pm2.1^{b}$
5 muestras	BTV	$^{a}0.02\pm0.01^{a}$	$^{ab}0.01\pm0.004^{a}$	$^{a}0.09\pm0.04^{b}$	$^{a}0.02\pm0.01^{a}$
% Promedios	BHV	1.9±0.4	5.3±0.4	5.2±1.7	7.1±1.5
17 muestras	BTV	0.02±0.005	0.03±0.01	0.06±0.02	0.03±0.01

ES: Error estándar.

Tabla VI.- Porcentajes de la relación de bacterias tipo *Vibrio* crecidas en TCBS con bacterias heterótrofas viables (BTV/BHV) crecidas en agar ZoBell en muestras de biopelículas de tanques de cultivo larvario de *Litopenaeus vannamei* en diferentes estadios de desarrollo larvario y producciones. Los valores son X±ES. No hay diferencia significativa en renglones (P>0.05) por producción. Letras diferentes en columnas representan diferencia estadística significativa (P<0.05) dentro de los estadios.

Producción	Zoea I	Mysis I	Postlarva 1	Postlarva 16
1	[a]0.6±0.2	[a]1.1±0.7	[a]4.3±2.1	[a]2.4±1.0
2	[a]1.3±0.7	[a]0.3±0.1	[a]1.8±1.1	[ab]0.5±0.4
3	[a]0.8±0.2	[a]1.0±0.3	[a]1.3±0.6	[b]0.1±0.1
% Promedio de 17 muestras	0.9±0.2	0.7±0.3	2.0±0.7	0.7±0.3

ES: Error estándar.

III.5.- BHV, BTV y BT en agua de fuentes externas al cultivo.

Los resultados del análisis de muestras agua de fuentes externas de bacterias al cultivo larvario se observan en la Figura 8.

Las dos principales fuentes externas de bacterias fueron el agua de cultivo de los nauplios de *Artemia* vivos (Fig. 8E), preparados para adicionarse al cultivo y el agua de traslado y aclimatación de los nauplios de camarón (Fig. 8C) al momento de la siembra. En el primer caso, las BHV alcanzaron un promedio de 10^7 UFC/ml para las tres producciones, mientras que en el segundo, llegaron a 10^6 UFC/ml. Estas dos fuentes aportaron la mayor cantidad de BTV, con valores promedio de 10^6 UFC/ml para los nauplios de *Artemia* y de 10^3-10^4 UFC/ml para las nauplios de camarón. El agua de entrada (Fig. 8A), presentó los valores mas bajos para los tres grupos bacterianos; el valor máximo para BHV alcanzó $9.1x10^3$ UFC/ml en la P3, mientras que las BTV promediaron como máximo 5 UFC/ml en la P2; las BT tuvieron un máximo de $1x10^5$ bacterias/ml. El agua de cultivo de la microalga *C. muelleri*, al igual que el agua de mar utilizada para el cultivo larvario, aportó bajas concentraciones de los grupos de bacterias cultivables y un máximo de $1.80x10^7$ bacterias/ml para las BT. Las BTV se mantuvieron en valores máximos de $2x10^1$ UFC/ml (Fig. 8B). Los nauplios de *Artemia* cocidos y congelados (Fig. 8D), presentaron concentraciones de bacterias cultivables inferiores con relación a los nauplios de *Artemia* vivos. El grupo bacteriano más afectado por el calor fue las BTV que se redujeron en hasta 3 órdenes de magnitud, de 10^6 a 10^3 UFC/ml, en las dos primeras producciones.

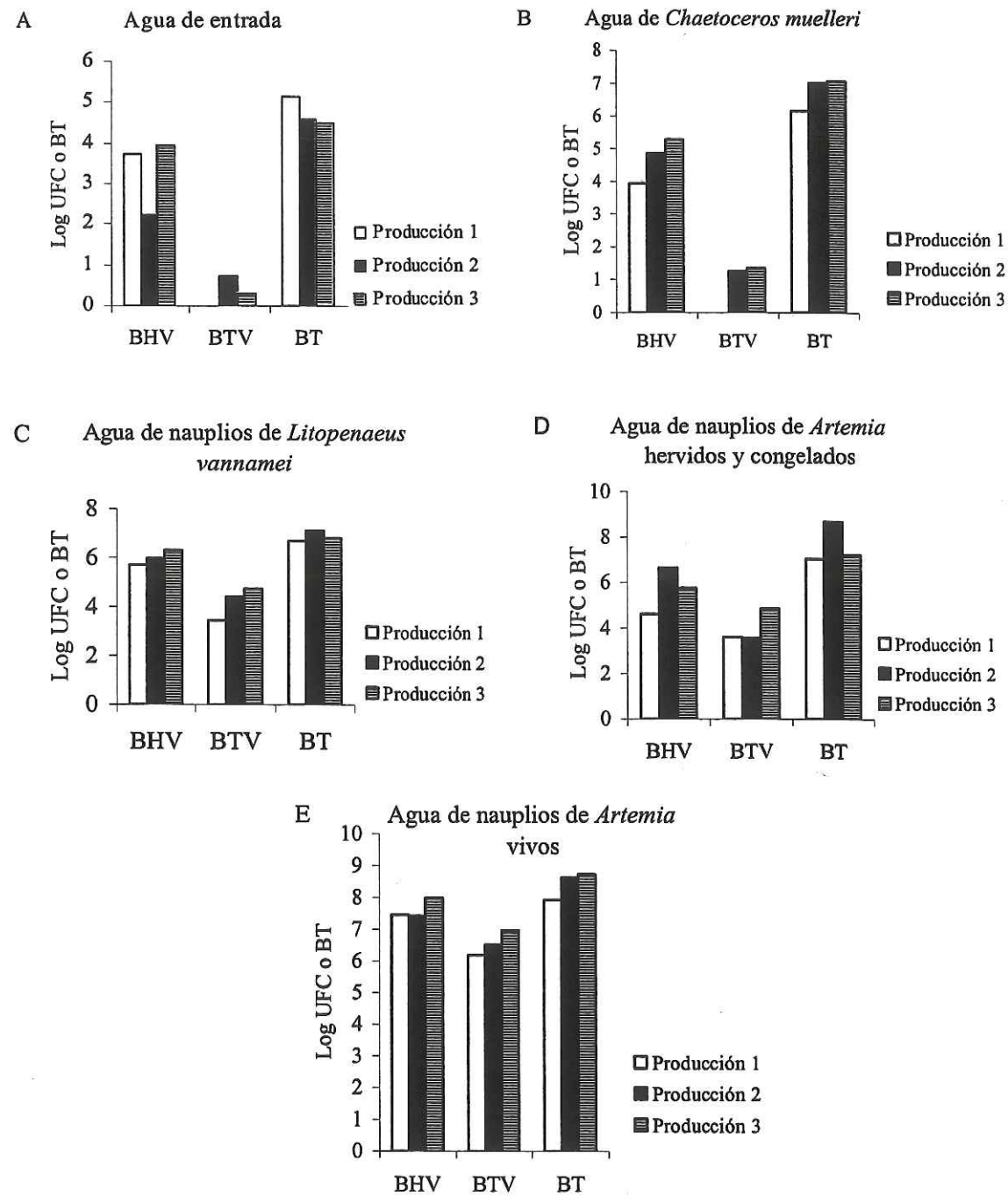

Figura 8.- Bacterias heterótrofas viables (BHV), bacterias tipo *Vibrio* (BTV) y bacterias totales (BT) en muestras de agua de fuentes externas al cultivo durante las tres producciones evaluadas.

III.6.- FISH en muestras de agua del cultivo larvario.

En agua de cultivo solo se detectaron hibridaciones con las sondas EUB338 y GAM42a (Fig. 9). La primera varió de 75% hasta 85%, sin diferencia significativa ($P>0.05$), mientras que la segunda fluctuó de 5% hasta 7%. En los mismos estadios, los promedios de muestras de biopelícula variaron desde 60% a 78% para la sonda EUB338, mientras que para la sonda GAM42a la variación fue de 2% a 7%.

Los porcentajes de GAM42a con respecto a EUB338 en muestras de agua no variaron de manera importante para los dos estadios evaluados, con valores de 6.7% y 8.2% para Pl1 y Pl16, respectivamente. En biopelículas, estos mismos estadios presentaron relaciones de 12.3% y 3%, respectivamente.

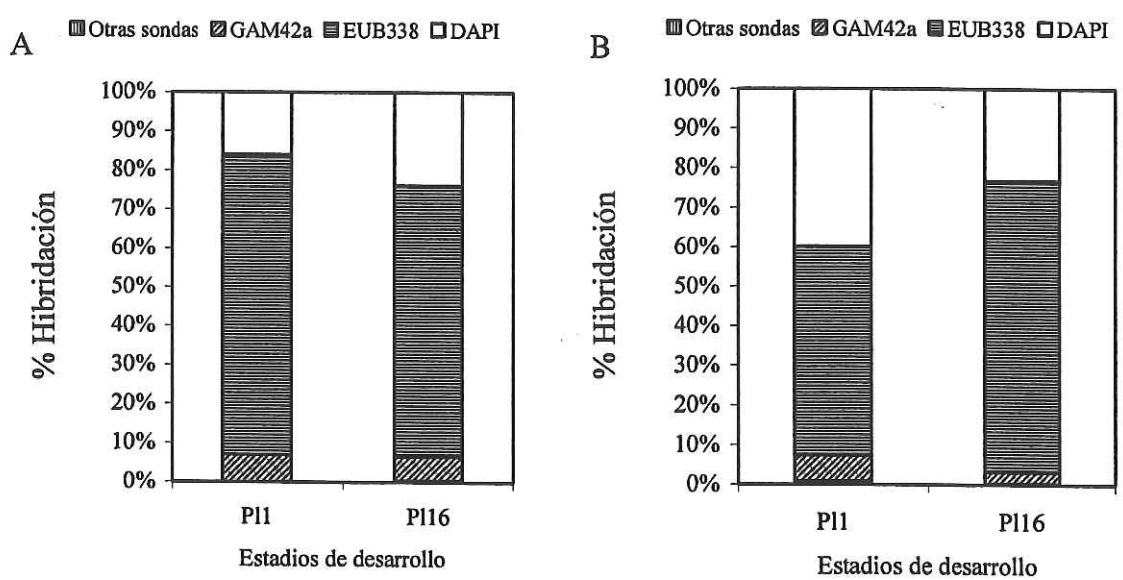

Figura 9.- Porcentajes de hibridación promedio de las dos sondas más importantes en muestras de agua de cultivo (A) y biopelículas (B), en los estadios de desarrollo de postlarva 1 (Pl1) y postlarva 16 (Pl16) de las producciones 2 y 3.

III.7.- FISH en agua de fuentes externas de bacterias al cultivo.

Las señales de hibridación predominantes fueron para las sondas EUB338 y GAM42a, al igual que en las biopelículas. Con EUB338 los porcentajes de hibridación variaron desde 14% para agua de entrada en la P2, hasta 98% para nauplios de *Artemia* vivos en la P3. Los nauplios de *Artemia* y de camarón presentaron los porcentajes de hibridación mayor para la sonda GAM42a, con un porcentaje superior al 50% del total de señal de hibridación de la sonda EUB338 para el primer caso (Fig. 10).

En los cultivos de la microalga *C. muelleri* no se detectó hibridación de la sonda GAM42a en ningún muestreo.

Después de las γ-Proteobacterias, las bacterias Gram positivo de bajo GC (sonda NHGC) fue el grupo específico más abundante, con valores inferiores al 5% en las muestras donde se detectaron.

III.8.- Porcentaje de bacterias cultivables en agua de fuentes externas al cultivo.

Los valores porcentuales de BHV/BT y BTV/BT, se pueden ver en la Tabla VII. Los mayores porcentajes en ambos grupos de bacterias cultivables se encontraron en los nauplios de *Artemia* vivos y en los nauplios de camarón, con valores de 34.0% para BHV/BT y de 2.0% para BTV/BT en el caso *Artemia*. Para los nauplios de camarón se registraron porcentajes de 13.7% para BHV/BT y 2.0% para BTV/BT.

El porcentaje menor de BHV/BT se encontró en nauplios de *Artemia* cocidos y congelados de la P1 con 0.1%; en estas muestras se obtuvieron los menores valores porcentuales promedio de las tres producciones de 2.7%, seguido de *C. muelleri* con 3.5%.

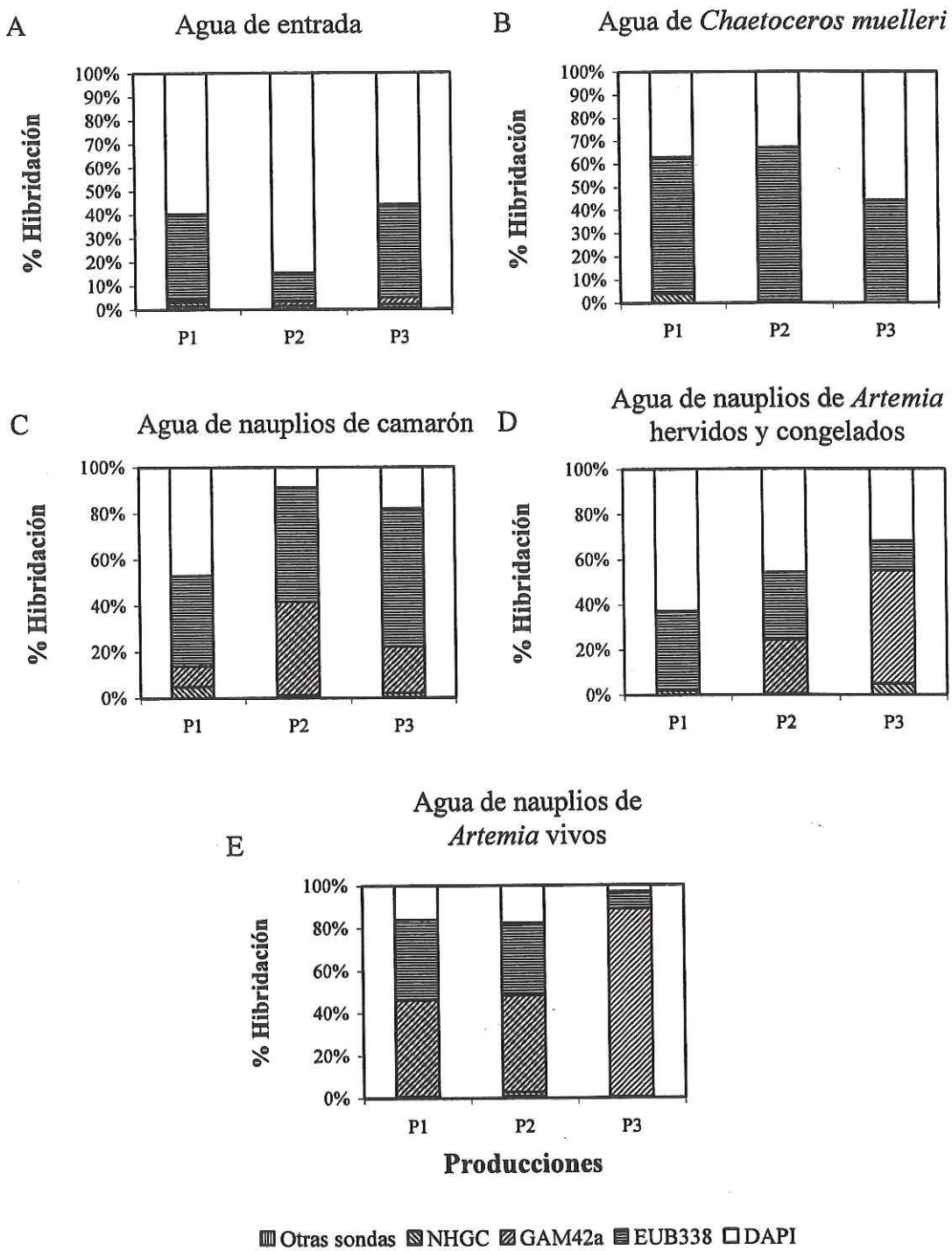

Figura 10.- Porcentaje de hibridación de las tres sondas mas importantes en muestras de agua de fuentes externas al cultivo para las tres producciones (P1, P2, P3).

Tabla VII.- Porcentaje de la relación de bacterias heterótrofas viables (BHV/BT) crecidas en agar de ZoBell y bacterias tipo *Vibrio* (BTV/BT) crecidas TCBS, en relación con conteos de bacterias totales hechos con DAPI en muestras de agua de fuentes externas de bacterias al cultivo larvario de *Litopenaeus vannamei*.

Fuente	Producción	Grupo bacteriano	%±ES	% Promedio±ES	
				BHV	BTV
Agua de entrada al cultivo	1	BHV	8.6±6.4		
		BTV	0.001±0.0009		
	2	BHV	0.5±0.1	4.3±2.1	0.01±0.003
		BTV	0.02±0.003		
	3	BHV	9.4±6.1		
		BTV	0.01±0.004		
Agua con cultivo de *Chaetoceros muelleri*	1	BHV	0.6±0.5		
		BTV	0.00001±0.00001		
	2	BHV	6.9±5.2	3.5±2.0	0.0001±0.00005
		BTV	0.0002±0.0001		
	3	BHV	1.9±0.6		
		BTV	0.0002±0.0001		
Agua con nauplios de camarón	1	BHV	13.7±0.0		
		BTV	0.05±0.01		
	2	BHV	7.3	14.7±2.4	0.4±0.2
		BTV	2		
	3	BHV	19.4±2.8		
		BTV	0.8±0.1		
Agua con nauplios *Artemia* hervidos y congelados	1	BHV	0.1±0.01		
		BTV	0.01±0.006		
	2	BHV	1.9±1.3	2.7±1.1	0.1±0.08
		BTV	0.004±0.003		
	3	BHV	5.2±2.0		
		BTV	0.4±0.2		
Agua con nauplios *Artemia* vivos	1	BHV	34		
		BTV	1.8		
	2	BHV	8.0±4.5	17.7±5.3	1.6±0.5
		BTV	0.9±0.2		
	3	BHV	18.7±7.5		
		BTV	2.0±1.05		

ES: error estándar.

En cuanto a BTV/BT, los menores porcentajes se encontraron en *C. muelleri* con un promedio de 0.0001%, seguido de agua de entrada con 0.01%. Los mayores valores porcentuales promedio de ambos grupos cultivables se encontraron en nauplios de *Artemia* vivos y en nauplios de camarón con 17.7% y 14.7% para BHV/BT y de 1.6% y 0.4% para BTV/BT, respectivamente.

Los valores porcentuales inferiores de BTV/BHV se encontraron en muestras de *C. muelleri* y agua de entrada con 0.002% y 0.01%, respectivamente, ambos para P1 (Tabla VIII). Los porcentajes promedio mas elevados se registraron en nauplios de *Artemia,* con un promedio porcentual de 19.4%, seguido de los nauplios de *Artemia* cocidos y congelados con 5.6%. Los nauplios de camarón promediaron un porcentaje de 2.6%. Los porcentajes promedio inferiores fueron encontrados en *C. muelleri* y agua de entrada con 0.02% y 1.8%, respectivamente.

Tabla VIII.- Porcentaje de la relación de bacterias tipo *Vibrio* crecidas en TCBS con bacterias heterótrofas viables (BTV/BHV) crecidas en agar de ZoBell en muestras de agua de fuentes externas al cultivo larvario de *Litopenaeus vannamei.*

Fuente	Producción	% ± ES	% promedio ± ES
Agua de entrada	1	0.01±0.001	
al cultivo	2	3.6±0.6	1.8±0.6
	3	0.2±0.2	
Agua con	1	0.002±0.001	
cultivo de *C.*	2	0.03±0.009	0.02±0.007
muelleri	3	0.02±0.01	
Agua con	1	0.4±0.1	
nauplios	2	2.7	2.6±1.0
camarón	3	4.7±0.8	
Agua con	1	4.7±3.8	
nauplios *Artemia*	2	0.1±0.05	5.6±2.6
hervidos y	3	12.0±6	
congelados			
Agua con	1	5.2	
nauplios *Artemia*	2	9.6±0.9	19.4±9.4
vivos	3	30.7±17.7	

ES: error estándar.

IV. DISCUSIÓN

Las biopelículas bacterianas en cultivos acuícola desempeñan diferentes funciones, que van desde fuentes de alimento, mejoradoras de la calidad de agua del cultivo hasta ser un reservorio de bacterias patógenas. De allí el interés de analizarlas y determinar la función específicas que desempeñan en cultivos particulares de organismos acuáticos de importancia comercial.

IV.1.- BHV, BTV y BT en biopelículas de tanques de cultivo larvario.

Para la producción 1 y 3 se sembraron tanques con diferente densidad de organismos, sin embargo, la cantidad de larvas iniciales no afectó cuantitativamente la constitución de las biopelículas en ninguna de las etapas evaluadas. Esto se puede deber a que las biopelículas se formaron a partir de la flora bacteriana presentes en el agua y la microalga *C. muelleri* al momento de preparar los tanques, por lo que al momento de la siembra, aproximadamente 10 horas después, la comunidad bacteriana de la biopelícula no fue afectada cuantitativamente por BTV introducidas al sistema en cantidades importantes en los nauplios de camarón. Es de notar el hecho que la formación inicial de la biopelícula ocurre a pesar de que el agua de cultivo fue tratada con cloranfenicol (1 ppm). Lo anterior fue observado por Karunasagar et al. (1996), cuando *V. harveyi*, una bacteria común en cultivo larvarios, fue capaz de desarrollar biopelículas en presencia de cloranfenicol y oxitetraciclina a concentración de 50 ppm, a pesar de que la bacteria en pruebas de laboratorio fue susceptible a ambos antibióticos.

Los valores de bacterias cultivables y de BT encontrados en el estadio ZI en los portaobjetos y posteriormente en las paredes de los tanques, señalan que los portaobjetos

son adecuados para capturar biopelículas cuando el sistema de cultivo no permita obtenerlas directamente del tanque. En nuestro estudio, la colonización en portaobjetos fue evaluada hasta 40 horas después de que los tanques fueron preparados para la siembra y aproximadamente 31 horas después desde la siembra de los organismos.

Los valores promedio de bacterias de los diferentes grupos evaluados en las biopelículas no se incrementaron notablemente en los 26 días del cultivo, pues las BHV solo se incrementaron en dos potencias (de 10^2 al inicio hasta 10^4 UFC/cm^2) al igual que las BTV (de 10^0 a 10^1 UFC/cm^2) mientras que las BT presentaron valores más homogéneos (10^4 hasta 10^5 bacterias/cm^2). Lo anterior puede significar que la colonización inicial mantiene su constitución cuantitativa durante toda la producción. Sin embargo, existen indicios de que las concentraciones de bacterias encontradas en las biopelículas son un reflejo de las condiciones del cultivo. Lizárraga-Partida et al. (1998), encontraron concentraciones bacterianas de hasta 10^4 UFC/cm^2 para BHV y 10^1 UFC/cm^2 para BTV en biopelículas del fondo de tanques de cultivo de larvas de *Haliotis rufescens* con 3 semanas de edad, valores cercanos a los encontrados en nuestro estudio. Sin embargo, estos autores encontraron valores de VHB de hasta 10^6 UFC/cm^2 y un aumento importante en BTV de hasta 10^5 UFC/cm^2 en biopelículas a los tres meses de cultivo durante el mismo estudio. Dicho incremento se atribuyó a la adición de alimento artificial al cultivo y a la disminución por pastoreo de la diatomea (*Navicula incerta*), alimento natural del abulón, por lo tanto, la estructura microbiana inicial de la biopelícula puede ser afectada por los organismos en cultivo o por la adición de alimento.

La estabilidad de la biopelícula puede ser debida a la colonización inicial con bacterias no oportunistas (Skjermo y Vadstein, 1999), a la presencia de sustancias

antimicrobianas producidas por microalgas (Austin y Day, 1990; Alabi et al., 1999; Naviner et al., 1999) o por otras bacterias (James et al., 1996), por el pastoreo de bacterias por parte de protozoarios y flagelados (Thompson et al., 1999), incluyendo a las mismas postlarvas en estadios de mayor desarrollo y con carácter bentónico (Thompson et al., 2002).

IV.2.- Porcentaje de bacterias cultivables en biopelículas.

Las numeraciones de poblaciones de bacterias heterótrofas ha sido una práctica común en granjas de acuicultura, sin embargo muy pocos estudios relacionan las BHV, BTV y BT. Estos porcentajes podrían ser indicativos de la estabilidad y del estado de salud del cultivo, con lo que se podrían establecer porcentajes indicadores al relacionar a estas poblaciones. Se considera que la mayoría de las poblaciones bacterianas que crecen en agar TCBS corresponden a especies del género *Vibrio*, el cual es considerado un patógeno potencial para los cultivos larvarios (Lightner, 1993), aspecto por el cual se relacionan con otros trabajos donde se ha procedido de la misma manera aunque en diferentes nichos.

IV.2.1.- BHV/BT.

Se pudo establecer que la relación BHV/BT presentó valores superiores (1.9-7.1%) a los reportados para agua de mar (0.001-0.1%) en zona oligotróficas y mesotróficas. Sin embargo, se asemejan a los valores reportados para fangos activados de alcantarillado (1-15%) (Amann et al., 1995), y en aguas de cultivo de *A. purpuratus*, (Jorquera et al., 2004), donde se registraron valores comprendidos entre 0.18-7.53%. Lo anterior parece indicar el

grado trófico de un ambiente, en donde un mayor porcentaje sería indicativo de una mayor concentración de materia orgánica.

IV.2.2.-BTV/BT.

Los valores registrados en nuestro estudio (0.02 a 0.06) son mayores que los registrados por Jorquera et al. (2004), en aguas de cultivo de *A. purpuratus*, los cuales estuvieron comprendidos entre 0.003-0.02%.

IV. 2.3.- BTV/BHV.

En este trabajo la relación BTV/BHV tuvo un porcentaje que varió de 0.1 a 4.3% para los estadios evaluados. Es importante hacer notar que en las tres producciones larvarias se reportaron valores de sobrevivencia superiores al 50% (datos no presentados), lo cual se considera dentro de los índices normales de mortalidad, por lo que estos valores pueden ser indicativos de condiciones sanas del cultivo en lo que se refiere a bacterias del tipo *Vibrio* y considerados normales para un cultivo exitoso. En biopelículas de tanques de *H. rufecens* (Lizárraga-Partida et al., 1998), se pudo establecer un valor promedio de BTV/BHV para las tres primeras semanas de cultivo de 0.18%, que coincide con lo encontrado en este estudio, sin embargo, a los tres meses de cultivo la relación se incrementó hasta 12.57%, tiempo en el cual se presentó la mayor mortalidad.

En el agua de cultivo durante el estudio, la relación de BTV/BHV presentó valores supriores a los encontrados en las biopelículas en el estadio Pl16 (17% promedio) de las P2 y P3 (0.5-0.1%, respectivamente), aunque en el estadio de Pl1 (1.1%), la relación fue semejante a la encontrada en las biopelículas para estas producciones (1.8-1.3% para P2 y

P3, respectivamente). Sin embargo, los valores superiores en las biopelículas fueron obtenidos en la P1 (4.3-2.4% para Pl1 y Pl16, respectivamente), período en el cual no se muestreó agua de cultivo, por lo que no se puede establecer con precisión si la biopelícula aportó bacterias a la columna de agua o si este es un factor independiente.

IV.3.- BHV, BTV y BT en agua de fuentes externas al cultivo.

Las evaluaciones en el agua de fuentes externas de bacterias al cultivo (Fig. 8), demuestran que los nauplios de *Artemia* vivos constituyeron la principal entrada de bacterias de los tres grupos, lo que concuerda con reportes anteriores (Gómez-Gil, 1993; Lizárraga-Partida et al., 1997; López-Torres y Lizárraga-Partida, 2001). Los nauplios de camarón, así como las nauplios de *Artemia* cocidos y congelados, también representaron una fuente importante de bacterias, sobre todo de las potencialmente patógenas BTV (Vandenberghe et al., 1998; López-Torres et al., 2000). El agua de mar a la entrada de los tanques y la del cultivo de la microalga *C. muelleri*, constituyeron la menor fuente de bacterias, lo que coincide con lo encontrado por otros autores (López-Torres et al., 2000; Jorquera et al., 2004). Las BTV encontradas en el agua de entrada para las producciones 2 y 3 son atribuidos a la falta de limpieza de los filtros de bolsa de 1μm y quizás a la tubería de conducción (López-Torres et al., 2001; Abraham y Palaniappan, 2004), ya que la carga de BTV en el agua del pozo utilizada es inferior a 1 UFC/100ml (López-Torres et al., 2000). Estos últimos autores plantean la utilidad de los conteos de bacterias heterótrofas en cuanto a la detección de fuentes de contaminación bacteriológica en diferentes etapas del cultivo, lo que es ratificado por nuestros resultados.

IV.4.- Porcentaje de bacterias cultivables en agua de fuentes externas al cultivo.

Por lo que se refiere a los porcentajes de ambos grupos de bacterias cultivables relacionados con BT (Tabla VII), los valores quedaron dentro de los rangos encontrados en las biopelículas, a excepción de los nauplios de camarón y *Artemia* vivos cuyos valores porcentuales de BHV/BT (14.7 y 17.7%, respectivamente) se equiparan con los encontrados en fangos activados de alcantarillas (1-15%) (Amann et al., 1995). Los valores elevados para ambos grupos de bacterias cultivables relacionados con BT podrían ser indicativo de la generación potencial de brotes infecciosos por estas fuentes. Sin embargo, en el caso de nauplios de *Artemia*, una proporción elevada de las BTV presentes durante su eclosión está constituida por la bacteria *V. alginolyticus* (López-Torres y Lizárraga-Partida, 2001), del cual algunas cepas han sido consideradas probióticas capaces de contrarrestar el efecto patógeno de otras cepas bacterianas (Austin et al., 1995; Vandenberghe et al., 1998).

IV.5.- FISH en biopelículas de tanques de cultivo larvario.

Los valores promedio de hibridación con la sonda EUB338 encontrados en este estudio (27% a 70%), son comunes en otros ambientes acuáticos marinos (Ramsing et al., 1996; Glöckner et al., 1999; Cottrel y Kirchman, 2000; Jorquera et al., 2004), así como en ambientes riparios (Kenzaka et al., 1998). Las diferencias en hibridización de la sonda EUB338 están relacionadas con las poblaciones BHV y BT, con valores elevados hacia los estadios de desarrollo más avanzados.

Los resultados promedio obtenidos con la sonda GAM42a (γ-Proteobacterias) (1% a 11%), son inferiores a los encontrados por Jorquera et al. (2004) para agua de cultivo de *A.*

purpuratus (4% a 28%), pero similares a los establecidos por Glöckner et al. (1999) para el agua del Mar del Norte (4% a 9%).

Una mayor diversidad de grupos bacterianos fue observada en el primer estadio evaluado (ZI), lo cual concuerda con la hipótesis establecida por Jackson (2003) para biopelículas jóvenes. En este estadio todas las sondas, excepto SRB385, presentaron señal de hibridación.

El porcentaje de bacterias detectadas con GAM42a con respecto a las detectadas con la sonda general, EUB338, presenta un decremento con el tiempo del cultivo, ya que se registraron valores de 23%, 30%, 13% y 3% para los estadios ZI, MI, PI1 y PI16, respectivamente. Lo anterior significa que existe un incremento en las poblaciones metabólicamente activas en la biopelícula con la edad del cultivo pero sin una elevación del grupo de GAM42a, lo que provoca un descenso de éstas en el total de bacterias.

IV.6.- FISH en agua de cultivo.

En agua de cultivo y biopelículas las hibridaciones de las sondas EUB338 y de las γ-Proteobacterias fueron semejantes en los estadios comparados, lo que indica que las proporciones de estos grupos bacterianos no son afectados por el tipo de ambiente. López-Torres y Pérez-Alvídrez (1999) y Puga-López et al., (2002), no encontraron diferencias en conteos de bacterias cultivables en agua de cultivo durante procesos de recambio en tanques de cultivo larvario de camarón, por lo que esto tampoco parece afectar a las poblaciones bacterianas presentes en las biopelículas.

IV.7.- FISH en agua de fuentes externas de bacterias al cultivo.

Los mayores porcentajes de hibridación de sondas dirigidas a grupos específicos se registraron con la GAM42a (γ-Proteobacterias), en *Artemia* y nauplios de camarón. Lo anterior concuerda con los resultados de BTV (Fig. 8), por lo que se puede establecer que el principal grupo bacteriano en estas muestras está representado por bacterias del género *Vibrio* (parte de las γ-Proteobacterias), el cual es frecuentemente identificado en laboratorios de producción larvaria (Vandenberghe et al., 1998; López-Torres et al., 2000).

El agua de entrada presentó el valor de detección menor con la sonda EUB338, a pesar de que las BT alcanzaron un valor de aproximadamente 10^7 bacterias/ml (Fig. 8A), lo que podría suponer un bajo contenido de ribosomas en las células por escasez de nutrientes.

Las muestras de microalgas solamente presentaron hibridación con el grupo bacteriano detectado por la sonda NHGC en una producción. La señal de la sonda GAM42a no fue detectada en ninguna producción a pesar de que BTV fueron cuantificadas en estas muestras durante dos producciones. Lo anterior se pudo deber al bajo contenido de rRNA en las células bacterianas que no fue detectado por sonda (Amann et al., 1995). Sin embargo, en medios de cultivo las γ-Proteobacterias presentan una respuesta de crecimiento rápida (Pinhassi y Berman, 2003) y principalmente el género *Vibrio* (Eilers et al., 2000).

La señal de hibridación obtenida con la sonda EUB338 así como la ausencia de señal con otras sondas utilizadas en algunas muestras permite concluir que hubo dominancia de grupos bacterianos diferentes a los buscados, entre ellos posiblemente cianobacterias, ya que se observaron al microscopio bacterias filamentosas con características de éstas, principalmente en estadios postlarvarios y en los cultivos de microalga.

El uso de medios de cultivo generales (Agar de ZoBell) y selectivos (TCBS) es una práctica común en granjas acuícola que actualmente es punto de crítica ya que solo se evalúan grupos de bacterias cultivables, sin embargo, los resultados obtenidos entre los cocientes de la relación de BTV/BHV (Tabla VIII) y los resultados de hibridación, se puede observar una relación importante entre ambas metodologías. Elevados valores porcentuales de BTV/BHV corresponden con valores elevados de porcentaje de hibridación de la sonda GAM42a, relacionada con bacterias del género *Vibrio* y otros géneros afines. Lo anterior se manifiesta claramente en un cociente de 19.4% en agua de *Artemia* viva, el valor más elevado encontrado en las fuentes externas al cultivo, el cual se relaciona con un porcentaje superior al 40% de hibridación con la sonda GAM42a; lo mismo se puede observar con los datos de las otras fuentes externas al cultivo. Lo anterior nos señala que el uso de las metodologías tradicionales con medios de cultivo se puede considerar como una herramienta útil para la evaluación y clasificación de poblaciones bacterianas específicas cuando no se cuente con la infraestructura para realizar estudios moleculares.

Aunque en el presente estudio el agua de entrada al cultivo no representó un riesgo de bacterias problemáticas para el cultivo, se ha visto que algunas bacterias patógenas son capaces de formar biopelículas en las tuberías de conducción de agua y en presencia de procesos deficientes de desinfección pueden constituir una fuente permanente de patógenos para el cultivo (Abraham y Palaniappan, 2004), que pueden integrarse a la biopelícula y desde allí infectar a los organismos (Karunasagar et al., 1996). A pesar de lo anterior, la remoción de las biopelículas de los tanques de cultivo podría no ser adecuada ya que algunos de los microorganismos que la constituyen pueden ejercer actividades importantes

favoreciendo la eliminación de componentes químicos dañinos a los organismos o servirles de alimento (Thompson et al., 2002; Tal et al., 2003).

La sobrevivencia en los tanques estudiados fue superior al 50%, por lo que estos resultados indican que una biopelícula estable, con bajo contenido de BTV (inferior a 10^2 UFC/cm^2) y de γ-Proteobacterias (inferior al 10% de hibridación), así como a porcentajes de BTV/BT≤1.0%, de BTV/BHV≤ 0.04% y de GAM42a/EUB338≤3%, a finales del cultivo, podrían dar como resultado una elevada sobrevivencia de los organismos cultivados. Por tal razón se establece la hipótesis de que las biopelículas formadas en tanques de producciones larvarias exitosas (biopelículas maduras) podrían proveer estabilidad para las siguientes producciones. Sin embargo, si la producción presenta problemas por infecciones bacterianas es recomendable desinfectar los tanques antes de volver a utilizarlos.

Los resultados obtenidos en el estudio indican que una biopelícula madura con bajo contenido de patógenos evaluados como BTV, GAM42a y bajos porcentajes de BTV con relación a BHV y BT deberá ser considerada como un factor de estabilidad para los tanques en cultivo más que una fuente de bacterias patógenas. De esta manera, los laboratorios comerciales de producción larvaria de organismos acuáticos deberían establecer un manejo adecuado y cuidadoso de las biopelículas generadas en tanques de producción exitosa en vez de eliminarlas al finalizar el cultivo, lo que podría ser una alternativa viable al uso de probióticos comerciales que a la fecha no han demostrado su eficiencia en el total de los estudios realizados (Moriarty, 1999; Gómez-Gil et al., 2000). Sin embargo, son necesarios estudios posteriores sobre el manejo de las biopelículas en dichos laboratorios para determinar el potencial de éstas en cuanto a su capacidad de mejorar los cultivos y además,

para establecer el tiempo máximo de permanencia de la biopelícula antes de que se convierta en un problema para el cultivo.

V.- CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el trabajo se puede concluir que:

- La formación de biopelículas ocurre durante las primeras horas de la preparación de los tanques para el cultivo, lo que se manifiesta por la presencia de BHV y concentraciones bajas de BTV, características en el agua de entrada al cultivo y el agua de la microalga.

- La densidad de siembra inicial de nauplios de camarón no tuvo un efecto importante sobre la conformación cualitativa y cuantitativa de las biopelículas.

- Las BTV y las γ-Proteobacterias no se incrementaron notablemente durante el transcurso del cultivo a pesar de su entrada continua a través de los nauplios de *Artemia*, por lo que se podría considerar que la biopelícula no aporta bacterias potencialmente patógenas al agua de cultivo.

- Bacterias con alto y bajo GC, α-Proteobacterias, β-Proteobacterias y δ-Proteobacterias no constituyeron poblaciones importantes en las biopelículas de taques de cultivo larvario de *L. vannamei.*

- El método molecular mostró coincidencias con las bacterias cultivables evaluadas por metodologías tradicionales.

- Los porcentajes de BTV/BHV pueden ser un buen indicador para detectar potenciales brotes infecciosos por bacterias vibrios en los cultivos larvarios.

V.1.- Recomendaciones

o Durante una producción exitosa no se deben eliminar en su totalidad las biopelículas establecidas en las paredes de los tanques, ya que pueden representar un factor de estabilidad para cultivos posteriores, por lo que se debe establecer un protocolo de manejo de éstas generado por estudios más específicos sobre el tiempo adecuado de permanencia de las biopelículas en los tanques de cultivo.

o Determinar el efecto de la colonización inicial de bacterias en las biopelículas y la estabilidad de los cultivos para establecer la posibilidad de promover biopelículas con microorganismos seleccionados (probióticos) en los tanques antes de su siembra.

o A pesar del éxito del cultivo, no se debe descartar la posibilidad de la presencia de bacterias potencialmente patógenas en biopelículas que podrían afectar cultivos posteriores cuando éstas no se eliminan, por lo que debe evaluar presencia y permanencia de ellas en biopelículas iniciales de cultivos subsecuentes.

o Al trabajar en el análisis de biopelículas por microscopía, el uso de ultrasonido podría mejorar el despegue y por lo tanto la observación de las bacterias al momento de realizar las observaciones, eliminando la interferencia de los exopolisacáridos.

VI.- LITERATURA CITADA

Abraham, T. J. y R. Palaniappan. 2004. Distribution of luminous bacteria in semi-intensive penaeid shrimp hatcheries of Tamil Nadu, India. Aquaculture. 232:81-90p.

Alabi, A.O., Z.C. Cob, D.A. Jones y J.W. Latchford. 1999. Influence of algal exudates and bacteria on growth and survival of white shrimp larvae fed entirely on microencapsulated diets. Aquacult. Int. 7 (3):137-158p.

Alatorre, F.M.R. 1998. La acuacultura en México: un sector del futuro. Panorama Acuícola, México. 175p.

Allison, D.G., B. Ruiz, C. San Jose, A. Jaspe y P. Gilbert. 1998. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilm. FEMS Microbiol. Lett. 167:179-184p.

Amann, R.L., L. Krumholz y D.A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. J. Bacteriol. 172:762-770p.

Amann, R.L., W. Ludwig y K.H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cell without cultivation. Microbiol. Rev. 59 (1):143-169p.

Amann, R.L., J. Snaidr, M. Wagner, W. Ludwing y K.H. Schleifer. 1996. *In situ* visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. J. Bacteriol. 178(12):3496-3500p.

Amann, R., B.M. Fuchs y S. Behrens. 2001. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hibridization. Curr. Opinion Biotech. 12:231-236p.

Angles, M.L., K.C. Marshall y A.E. Goodman. 1993. Plasmid transfer between marine bacteria in the aquos phase and biofilm in reactor microcosms. Appl. Environ. Microbiol. 59:843-850p.

Aoi, Y. 2002. Review. *In situ* identification of microorganisms in biofilm communities. J. Biosc. Bioeng. 94(6): 552-556p.

Austin, B. y J.G. Day. 1990. Inhibition of prawn pathogenic *Vibrio* spp. by a commercial spray-dried preparation of *Tetraselmis suecica*. Aquaculture. 90:389-392p.

Austin, B., L.F Stuckey, P.A.W Robertson, I. Effendi y D.R.W Griffith. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida, Vibrio anguillarum* y *Vibrio ordallli*. J. Fish. Dis. 18:93-96p.

Armstrong, E., L. Yan, K.G. Boyd, P.C.Wrigth y J.G. Burgess. 2001. The symbiotic role of marine microbes on living surfaces. Hidrobiología. 461:37-40p.

Baskar, N. y T.M.R. Setty. 1994. Incidence of vibrios of Public Health in the phase farming of tiger shrimp (*Penaeus monodon*). J. SCI. Food Agric. 66(2):225-231p.

Baticados, M.C.L. 1988. Control of luminous bacterial infection in prawns hatcheries. SEAFDEC Asian Aquaculture. 10 (1):9-10p.

Baticados, M.C.L., C.R. Lavilla-Pitogo, E.R. Cruz-Lacierda, L.D. De la Peña y N.A. Suñoz. 1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *V. harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. Dis. Aquat. Org. 9:133-139p.

Bouvier, T. y P.A. del Giorgio. 2003. Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence *in situ* hybridization (FISH): A quantitative review of published reports. FEMS Microbiol. Ecol. 44: 3-15p.

Brown, J.H. 1989. Antibiotics: their use and abuse in aquaculture. World Aquacult. 20 (2):34-43p.

Brock, J.A. y K.L. Main. 1994. A guide to the common problems and disease of cultured *Penaeus vannamei*. The Oceanic Institute. Honolulu, Hawaii. 234p.

Ceballos, F.C., J. Prado y A. Freire. 1996. Commercial management techniques for the control of vibriosis in South American shrimp farms. Abstracts of the Aquaculture'96. World Aquaculture Society. Baton Rouge, LI. 266p.

Comités de Sanidad Acuícola de México. 2006. Páginas de Internet: Sonora: http://www.cosaes.com; Sinaloa: http://www.cesasin.org; Nayarit: http://www.cesanay.com; Tamaulipas: http://www.cesatam.com., consultadas julio 2006.

Cottrel, M.T. y D.L. Kirchman. 2000. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence *in situ* hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 66:5116-5122p.

Costerton, J.W., K.J. Cheng, G.G. Geesey, T.I. Ladd, J.C. Nickel, M. Dasgupta y T.J. Marrie. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. Annu. Rev. Microbiol. 41:435-464p.

D'Agostino, A.S. y L. Provasoli. 1970. Dixenic culture of *Daphnia magna* Straus. Biol. Bull., 139:485-494p.

Davey, M.E. y G.A. O'toole. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64(4):847-867p.

Davies, D.G., M.R. Parsek, J.P. Pearson, B.H. Iglewski, J.W. Costerton y E.P. Greenberg. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science. 260:295-298p.

De Beer, D., R. Srinivasan y P.S. Stewart. 1994. Direct measurement of chlorine penetration into biofilm during disinfection. Appl. Environ. Microbiol., 60:4339-4344p.

De Long, E.F., G.S. Wickham y N.R. Pace. 1989. Phylogenetic strains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells. Science. 243:1360-1363p.

Eilers, H., J. Pernthaler, F.O. Glöckner y R. Amann. 2000. Culturability and *in situ* abundance of pelagic bacteria from the North Sea. Appl. Environ. Microbiol. 66:3044-3051p.

Evans, D.J., M.R.W. Brown y P. Gilbert. 1990. Susceptibility of bacterial biofilm to tobromycin: role of specific growth rate and phase in the division cycle. J. Antimicrob. Chemother. 25:585-591p.

Fleming, H.C. 1993. Biofilm and environmental protection. Water Sci. Technol. 27:1-10p.

Friedrich, A.B., I. Fischer, P. Proksc, J. Hacker y U. Hentschel. 2001. Temporal variation of the microbial community associated with the mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. FEMS Microbiol. Ecol. 38:105-113p.

Gacesa, P. 1998. Bacterial alginate biosynthesis-recent progress y future prospects. Microbiol. 144:1133-1143p.

Glöckner, F.O., B.M. Fuchs y R. Amann. 1999. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence *in situ* hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 65:3721-3726p.

Gómez Gil, R.S.B. 1993. Estudio bacteriológico de quistes y nauplios de la población de *Artemia* franciscana Kellog, 1906, del Gran Lago Salado. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 75p.

Gómez Gil, B., A. Roque y J.F. Turnbull. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. Aquaculture. 191:259-270p.

Hausner, M. y S. Wuertz. 1999. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative *in situ* analyisis. Appl. Environ. Microbiol. 65:3710-3713p.

Hodson, R.E., W.A. Dustman, R.P. Garg y M.A. Moran. 1995. *In situ* PCR for visualization of microscale distribution of specific gene and gene products in prokaryotic communities. Appl. Environ. Microbiol. 61:4074-4082p.

Jackson, C.R. 2003. Changes in community properties during microbial succession. FORUM, OIKOS. 101(2):444-448p.

James, S.G., C. Holmström y S. Kjelleberg. 1996. Purification and characterization of a novel antibacterial protein from the marine bacterium D2. Appl. Environ. Microbiol. 62:2783-2788p.

Jorquera, M.A., M. Lody, Y. Leyton y C. Riquelme. 2004. Bacteria of subclase γ-proteobacteria associated with commercial *Agropecten purpuratus* (Lamark, 1819) hatcheries in Chile. Aquaculture. 236:37-51p.

Karunasagar, I., S.K. Otta e I. Karunasagar. 1996. Biofilm formation by *Vibrio harveyi* on surfaces. Aquaculture. 140:241-245p.

Kavouras, J.H. y J.S. Maki. 2003. The effect of natural biofilms on the reattachment of young adult zebra mussel to artificial substrata. Biofouling. 19:247-256p.

Kenzaka, T., N. Yamaguchi, K. Tani y M. Nasu. 1998. rRNA-targeted fluorescent *in situ* hybridization analysis of bacterial community structure in river water. Microbiol. 144, 2085-2093p.

Keren, I., N. Kaldalu, A. Spoering, Y. Wang y K. Lewis. 2004. Persister cells and tolerance to antimicrobials. FEMS Microbiol. Lett. 230:13-18p.

Keyhani, N.O. y S. Roseman. 1996. The chitin catabolic cascade in the marine bacterium *Vibrio furnissii*. J. Biol. Chem. 271:33414-33424p.

Kirchman, D.S., S. Graham, D. Reish y R. Mitchel. 1982. Lectin may mediate in the settlement and metamorphosis of *Janua brasiliensis* Grube. Mar. Biol. Lett. 3 :131-142p.

Kuo-Kau, L., Y. Shu-Ru, C. Ferng-Ruey, Y. Tun-I y L. Ping-Chung. 1996. Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn, *Penaeus monodon*. Curr. Microbiol. 66(2):225-231p.

Kwei-Lin, C. 1989. Prawn cultured in Taiwan. What went wrong?. World Aquacult. 20:19-20p.

Lane, D.J., D.A. Stahl, G.S. Olsen, D.J. Heller y N.R. Pace. 1985. Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S rRNA sequence. J. Bacteriol. 163:75-81p.

Lau, S.C.K., V. Thiyagarajan, S.C.K. Cheung y P.Y. Qian. 2005. Roles of bacterial community composition in biofilms as a mediator for larval settlement of three marine invertebrates. Aquatic Microbial Ecol. 38, 41-51p.

Lavilla Pitogo, C.R. 1988. Isolation and identification of luminous bacteria causing mortalities in *Penaeus monodon* hatcheries in Panay. SEAFDEC Asian Aquacult. 10(1):9p.

Lavilla Pitogo, C.R. 1995. Bacterial disease of penaeid shrimps: an Asian view. En: Diseases in Asian Aquaculture II. Shariff, M., Arthur, R. y R.P. Subasinge (eds.) Fish Health Section. Asian Fisheries Society. Manila, 107-121p.

Lavilla Pitogo, C.R., M.C.L. Baticados, E.R. Cruz Lacierda y L.D. de la Peña. 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. Aquaculture. 91:1-13p.

Lee, N., P.H. Nielsen, K.H. Andreasen, S. Juretschko, J.L. Nielsen, K.H. Shleifer y M. Wagner. 1999. Combination of fluorescent *in situ* hybridization and microautoradiography- a new tool for structure-function analysis in microbial ecology. Appl. Environ. Microbiol. 65:1289-1297p.

Lewis, K. 2001. Riddle of biofilm resistance. Antimicrob. Agents Chemoth. 45(4):999-1007p.

Lightner D.V. 1993. Diseases in cultured penaeid shrimp. En: Handbook of Mariculture, Vol. 1: Crustacean Aquaculture. J.P. McVey (ed.), CRC Press, Boca Raton, FL. USA. pp. 393-486p.

Ligthner, D.V. 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for disease of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LI. Sección 4, 1-27p.

Ligthner, D.V. 1998. Shrimp disease and current diagnostic methods. Aquaculture. 146:201-220p.

Lizárraga Partida, M.L., L. Montoya Rodríguez y V. Gendrop Funes. 1997. The use of bacterial counts in two mexican shrimp hatcheries. Cienc. Mar. 23 (1):29-140p.

Lizárraga Partida, M.L., C. Anguiano Beltrán, R. Searcy Bernal y E. Vázquez Moreno. 1998. Bacterial water quality in abalone farms of Baja California. J. Shellf. Res. 17(3):689-692p.

López Torres, M.A. y L.A. Pérez Alvídrez. 1999. Efecto de los recambios de agua y antibióticos en las concentraciones de bacterias presentes en el cultivo larvario camarones pendidos. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico. SEMARNAP, México. 2 (8):6-8p.

López Torres, M.A., A. Murguía López y L.A. Pérez Alvídrez. 2000. Concentración de bacterias crecidas en el medio TCBS durante el cultivo larvario de camarones peneidos. Biociencia. 2(1):19-24p.

López Torres, M.A. y M.L. Lizárraga Partida. 2001. Bacteria isolated on TCBS media associated with hatched *Artemia* cysts of commercial brands. Aquaculture. 194:11-20p.

López Torres, M.A., P. Macías Montes de Oca y M.L. Lizárraga Partida. 2001. Evaluación de la calidad bacteriológica de dispositivos para limpieza de agua utilizados en acuicultura. Biotecnia. 3(1):59-63p.

Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner y K. Schleifer. 1992. Phylogenetic oligodeoxinucleotide probes for the major subclasses of Proteobacterias: problems and solutions. Syst. Appl. Microbiol. 15:593-600p.

McIntosh, D., T.M. Samocha, E.R. Jones, A.L. Lawrence, D.A. McKee, S. Horowitz y A. Horowitz. 2000. The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. Aquacult. Eng. 21:215-227p.

Moriarty, D.J.W. 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. Microbial biosystems: New frontiers. En: Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Bell, C.R., Brylinsky M., Johnson Green (Eds). Atlantic Canada Society for Microbiol Ecology. Halifax, Canadá. 231-238p.

Naviner, M., J.P. Bergé, P. Durand y H. Le Bris. 1999. Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. Aquaculture. 174:15-24p.

Neff, A., R. Amann, H. Schlesner y K.H. Schleifer. 1998. Monitoring a widespread bacterial group: *in situ* detection of *Planctomycetes* with 16S rRNA-tageted probes. Microbiology. 144:3257-3266p.

Olsen, G.S., D.J. Lane, S.J. Giovannoni, N.R. Pace y D.A. Stahl. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. Annu. Rev. Microbiol. 40:337-365p.

Panorama Acuícola Magazine. 2002. Producción de camarón en el noroeste de México. Acuicultura y pesca, dos actividades que se complementan. Panorama Acuícola Magazine. 8(1):58-59p.

Parsek, M.R. y C. Fuqua. 2004. Biofilm 2003: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. J. Bacteriol. 186(14):4427-4440p.

Prayitno, S.B. y J.W. Latchford. 1995. Experimental infections of crustacean with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. Aquaculture. 132:105-112p.

Puga López, D., M.E. González Corona y M.A. López Torres. 2002. Recambios de agua y carga bacteriana en el cultivo larvario de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*. Biotecnia. 4(1):9-14p.

Peña, L. 1998. Bancomext: programa de apoyo integral al sector acuícola. II Simposium Internacional de Acuicultura. Mazatlán, Sinaloa, México. 65-73p.

Pinhassi, J. y T. Berman. 2003. Differential growth response of colony-forming α-and-γ-Proteobacteria in dilution culture and nutrient addition experiments from Lake Kinneret (Israel), the Eastern Mediterranean Sea and the Gulf of Eilat. Appl. Environ. Microbiol. 69(1):199-211p.

Ramsing, N.B., M. Khul y B.B. Jorgensen. 1993. Distribution of sulfate-reduction bacteria, O_2 and H_2S in photosinthetic biofilm determined by oligonucleotide probes and microelectrode. Appl. Environ. Microbiol. 59:3840-3849p.

Ramsing, N.B., H. Fossing, T.G. Ferdelman, F. Andersen y B. Thamdrup. 1996. Distribution of bacterial populations in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) quantified by *in situ* hybridization and related to chemical gradients in the water column. Appl. Environ. Microbiol. 62:1391-1404p.

Rodríguez, C. y N.B. Bhosle. 1991. Exopolysaccharide production by *Vibrio fishery*, a fouling marine bacterium. Biofouling. 4(4):301-308p.

Roller, C., M. Wagner, R. Amann, S. Ludwig y H. Schleifer. 1994. *In situ* probing of gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. Microbiol. 140:2849-2858p.

Shanker, K.M. y C.V. Mohan. 2001. The potential biofilm in aquaculture. World Aquaculture. Junio 2001. 62-67p.

Sinderman, C.S. y D.V. Ligthner. 1988. Diseases Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture. Develop. Aqua. Fish Sci. Elsevier, Amsterdam. 431p.

Skjermo, J. y O. Vadstein. 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. Aquaculture 177:333-343p.

Sorgeloos, P., P. Lavens, P. Léger, W. Tackaert y D. Verishele. 1986. Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. The Belgian Administration for Development Cooperation. United Nations Food and Agriculture Organization, Belgium. 319 p.

Sutherland, I. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and stickly framework. Microbiology. 149:1095-1102p.

Tal, Y., J.E.M. Watts, S.B. Scherier, K.R. Sowers y H.J. Scherier. 2003. Characterization of the microbial community and nitrogen transformation processes associated with moving bed bioreactors in a closed recirculated mariculture system. Aquaculture. 215:187-202p.

Thompson, F.L., P.C. Abreu y R.O. Cavalli. 1999. The use of microorganisms as food source for *Penaeus paulensis* larvae. Aquaculture 174:139-153p.

Thompson, F.L., P.C. Abreu y W. Wasielesky. 2002. Importance of biofilm for quality and nourishment in intensive shrimp culture. Aquaculture. 203:163-278p.

Vandenberghe, J., Y. Li, L. Verdonck, J. Li, P. Sorgeloos, H.S. Xu y J. Swings. 1998. Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. Aquaculture. 169:121-132p.

Vargas Cárdenas, G., M.L. Lizárraga Partida y A. Portillo López. 1999. Manual de prácticas de laboratorio del curso:"Bacteriología Marina". Comunicaciones Académicas. Serie acuicultura. 3ra. Edición. CICESE. Ensenada, B.C. México. 86p.

Vinatea, L. y E.R. Andreatta. 1997. Comparative study of continuous and static water renewal strategies in the larviculture of *Penaeus paulensis* (Pérez Farfante, 1967) associated with high stocking densities and different water renewal rates. Aquaculture. 154:247-259p.

Watnick, P. y R. Kolter. 2000. Biofilm, city of microbes. J. Bacteriol. 182(10):2675-2679p.

Weiner, R., A.M. Segall y R.R. Colwell. 1985. Characterization of the marine bacterium associated with *Crassostrea virginica* (the eastern oyster). Appl. Environ. Microbiol. 49:83-90p.

Weiner, R.M., M. Walch, M.P. Labare, D.B. Bonar y R.R. Colwell. 1989. Effect of biofilms of the marine bacterium, *Alteromonas colwelliana* (LST) on the set of the oysters *Crassostrea gigas* (Hunberg, 1793) y *C. virginica* (Gmelin, 1791). J. Shell. Res. 8(1):117-123p.

Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51(2):221-271p.

Yildiz, F.H. y G. K. Schoolnik. 1999. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharides production, chlorine resistance and biofilm formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:4028-4033p.

Zar, J.H. 1984. Biostatistical analysis. Prentice-Hall Inc., segunda edición. Englewood Cliffs, N.J.,USA.718p.