

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN  
SUPERIOR DE ENSENADA**



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
BIOTECNOLOGÍA MARINA**

---

**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS EN CULTIVO LARVARIO DE  
CAMARÓN (*Litopenaeus vannamei*) MEDIANTE LA TÉCNICA DE  
FISH**

**TESIS**

Que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

Presenta:

**Antonio García Triana**

Ensenada, Baja California. México, Octubre del 2005.

TESIS DEFENDIDA POR  
**Antonio García Triana**  
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

---

Dr. Jorge Olmos Soto  
*Director del Comité*

---

Dr. José de Jesús Paniagua Michel  
*Miembro del Comité*

---

Dr. Jaime Färber Lorda  
*Miembro del Comité*

---

Dr. Facundo Joaquín Márquez Rocha  
*Coordinador del programa de posgrado en  
Acuicultura y Biotecnología Marina*

---

Dr. Raúl Ramón Castro Escamilla  
*Director de Estudios de Posgrado*

Ensenada, Baja California, México, Octubre del 2005.

**RESUMEN** de la tesis de **Antonio García Triana**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con orientación en BIOTECNOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California, México. Octubre del 2005.

## **IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS EN CULTIVO LARVARIO DE CAMARÓN (*Litopenaeus vannamei*) MEDIANTE LA TÉCNICA DE FISH**

Resumen aprobado por:

---

Dr. Jorge Olmos Soto  
Director de Tesis

En este trabajo nos interesó conocer específicamente los grupos bacterianos dominantes que se encuentran en los estadios larvarios nauplio, zoea, misis y postlarva del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* usando las técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por lo tanto, se estudió la composición estructural bacteriana en un cultivo larvario de *L. vannamei* de la Unidad Experimental Peñasco (UEP) de la Universidad de Sonora en Puerto Peñasco, México. La técnica de FISH usando sondas de oligonucleótidos específicos para rRNA nos indicó los grupos metabólicamente activos, para ello usamos sondas marcadas con fluorocromos y de esta manera identificar y enumerar bacterias relacionadas a cultivo larvario de *L. vannamei*. La técnica de PCR permitió comparar la presencia de poblaciones en los diferentes estadios del *L. vannamei* con poblaciones de bacterias metabólicamente activas y de esta manera identificar grupos bacterianos que puedan servir para un efecto a los diferentes estadios larvarios de *L. vannamei*.

Los experimentos cuantitativos de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) muestran que en la mayoría de las muestras, las bacterias observadas representan del  $69.3 \pm 9.7$  a  $20.8 \pm 3.4$  % del total de las bacterias teñidas con 4\*,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Las bacterias Gram positivas altas en G+C y las *Proteobacterias* Gama predominaron desde el estadio larvario de nauplio hasta misis en los cultivos larvarios de *L. vannamei*.

**Palabras clave:** Hibridación *in situ* Fluorescente, *Litopenaeus vannamei*, larvas, comunidad bacteriana

**ABSTRACT** of the thesis presented by **Antonio García Triana** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in MARINE BIOTECHNOLOGY. Ensenada, Baja California, Mexico. October 2005.

**FLUORESCENT *in situ* HYBRIDIZATION (FISH)  
IDENTIFICATION OF BACTERIA ASSOCIATED WITH  
*Litopenaeus vannamei* LARVAE CULTURE.**

**ABSTRACT**

We applied Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and Polimerase Chain Reaction (PCR) to identify *Litopenaeus vannamei* nauplii, zoea, mysis and postlarvae related bacteria. The bacterial structure composition in the hatchery at Unidad Experimental Peñasco (UEP) of the Sonora University at Puerto Peñasco, Mexico was studied. FISH experiments using rRNA-specific oligonucleotide probes were used to identify and enumerate *L. vannamei* larvae metabolically active related bacteria. PCR experiments were used to identify and compare previously metabolically active identified bacteria.

Quantitative whole-cell hybridization experiments using  $\alpha$ ,  $\gamma$  and  $\delta$  *Proteobacteria*, and high and down GC gram positive bacteria accounted for  $69.3 \pm 9.7$  to  $20.8 \pm 3.4$  % of the total 4\*,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-stained cells in most samples. Marine high GC and gamma *Proteobacteria* predominated from nauplii to mysis life substages.

**Key words:** Fluorescent *in situ* Hibridization, *Litopenaeus vannamei*, larvae, bacterial community

La presente Tesis se realizó en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California bajo la dirección del Dr. Jorge Olmos Soto. Durante el desarrollo de este trabajo se contó con el apoyo económico de una beca de Maestría en Ciencias otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y con el proyecto 34035-V de CONACyT.

## ***DEDICATORIA***

*A María Araceli Triana Tejas, mi mamá y ejemplo a seguir.*

*A Norma García Lagunas, el amor de mi vida.*

*A Erik García Triana, mi hermanito a quien tanto quiero.*

*A Ofelia Tejas Roque, mi abuelita, por su cariño y sabios consejos.*

*A Manuel Triana Ibarra, mi abuelito, por su cariño y sabios consejos.*

*A Eima Santiago Bautista, mi nana, por su cariño.*

## AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento a todos los que participaron de alguna manera en este trabajo.

Principalmente al Dr. Jorge Olmos Soto, por su incesante guía, enseñanzas, consejos, paciencia, compromiso y apoyo brindado.

Al Dr. José de Jesús Paniagua Michel y al Dr. Jaime Färber Lorda, por sus comentarios, compromiso y apoyo brindado.

Al CICESE, por brindarme la oportunidad de superarme.

Al CONACYT, por apostarle al conocimiento e invertir en mí persona.

A la M. en C. Rosalía Contreras Flores, a la M. en C. Maribel Padilla Sánchez, a la M. en C. Galdy Hernández Zárate y al M. en C. José Leonel Ochoa Solano por su amistad, consejos y apoyo brindado.

A mis compañeros de la Maestría por su amistad, en especial a mi amigo Raúl Leal Navarro.

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		<b>Página</b>
1	Diagrama de flujo de la técnica de FISH para el análisis de muestras larvarias de nauplios, zoeas, misis y postlarvas de <i>L. vannamei</i> para identificar y cuantificar grupos bacterianos asociados al cultivo.....	10
2	Método de conteo de frecuencia de observación de campos positivos de bacterias con señal de fluorescencia. Las flechas indican la dirección de conteo de los diez campos dentro del pozo de la laminilla mediante el microscopio.....	14
3	Método de conteo de bacterias fluorescentes en campos obtenidos de los pozos de la laminilla. Los puntos dentro de los pozos de la laminilla en la figura representan los campos microscópicos obtenidos al azar dentro de diferentes pozos de diferentes laminillas.....	16
4	Diagrama de flujo de la técnica de aislamiento y purificación de DNA para el análisis de muestras larvarias de <i>L. vannamei</i> .....	18
5	Diagrama de flujo de la técnica de PCR para el análisis de muestras larvarias.....	20
6	Promedio e intervalos de confianza (n = 3) de frecuencia de observación de las subdivisiones y subgrupos bacterianos analizados de las muestras obtenidas en el primer muestreo (22/Jul/03).....	27
7	Promedio e intervalos de confianza (n = 10) de conteo de bacterias fluorescentes de las subdivisiones y subgrupos bacterianos analizados de las muestras obtenidas en el primer muestreo (22/Jul/03).....	29
8	Promedio e intervalos de confianza (n = 50) de las subdivisiones y subgrupos bacterianos contados en campos con DAPI, obtenidos de los estadios larvarios colectados en tres diferentes muestreos.....	31
9	Promedio e intervalos de confianza (n=30) de bacterias contadas con FISH de Subdivisión o Subgrupo para los estadios larvarios nauplio, zoea, misis, Pl 1 y Pl 16, en campos de muestras obtenidas a partir de tres diferentes muestreos.....	34



## LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		<b>Página</b>
10	Promedio de conteo de bacterias en campos de las muestras obtenidas en tres muestreos diferentes. Donde N= Nauplio, Z= Zoea, M=Misis, P11= Postlarva 1, y P116= Postlarva 16.....	35
11	Promedio e intervalos de confianza (n=10) de porcentaje de conteo de bacterias contadas (bacterias/ml) con FISH con respecto a DAPI, en campos de muestras obtenidas a partir de tres diferentes muestreos, cinco diferentes grupos y la suma de grupos para los cinco estadios larvarios estudiados en el presente trabajo. Donde N= Nauplio, Z= Zoea, M=Misis, P11= Postlarva 1, y P116= Postlarva 16.....	36
12	Gel de electroforesis de productos de PCR de 16S rDNA de grupos bacterianos asociados a larvas de <i>L. vannamei</i> en 1.5% de agarosa. Carril M, marcador de peso molecular; carril (1) <i>Proteobacterias</i> $\gamma$ (1400 pb); carril (2) Bacterias Gram positivas bajas en G+C (1200 pb); carril (3) Gram positivas altas en G+C (700 pb).....	42

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Secuencias de oligonucleótidos, tipo de fluorocromo y longitudes de onda empleados en la técnica de FISH.	12
II	<b>Secuencia de los oligonucleótidos empleados en la técnica de PCR.</b>	21
III	Programa para las reacciones de amplificación por PCR.	22
IV	Mezcla de reactivos para llevar a cabo la reacción de PCR.	22
V	<b>DNAs totales extraídos y la proporción promedio de absorbancia para las longitudes de onda medidas a 260 nm y 280 nm. * Promedio de la proporción de absorbancia (r) de las longitudes de onda medidas a 260 nm y 280 nm.</b>	41

## CONTENIDO

		<b>Página</b>
<b>I</b>	<b>Introducción</b> .....	1
<b>II</b>	<b>Antecedentes</b> .....	3
<b>III</b>	<b>Justificación</b> .....	7
<b>IV</b>	<b>Objetivos</b> .....	8
<b>V</b>	<b>Metodología</b> .....	9
	<b>V.1</b> Obtención y almacenamiento de muestras.....	9
	<b>V.2</b> Análisis de FISH de las muestras de estadios larvarios.....	9
	<b>V.2.1</b> Preparación de portaobjetos gelatinizados.....	10
	<b>V.2.2</b> Metodología de FISH aplicada a bacterias asociadas a larvas de <i>L. vannamei</i> .....	11
	<b>V.2.3</b> Densidad óptica de los cultivos bacterianos.....	12
	<b>V.2.4</b> Preparación de la solución de hibridación .....	13
	<b>V.2.5</b> Comparación de cuantificación de grupos bacterianos dominantes.....	13
	<b>V.2.5.1</b> Método de “conteo de frecuencia de observación de campos positivos de bacterias con señal de fluorescencia”.....	13
	<b>V.2.5.2</b> Método de “conteo de bacterias fluorescentes en campos obtenidos de los pozos de las laminillas”.....	14
	<b>V.2.6</b> Metodología de conteo con DAPI de bacterias totales asociadas a larvas.....	16
	<b>V.3</b> Aislamiento y purificación de DNA.....	17
	<b>V.3.1</b> Lisis de tejido, extracción y precipitación del DNA.....	18
	<b>V.4</b> Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	20
	<b>V.5</b> Análisis estadístico.....	23
<b>VI</b>	<b>Resultados</b> .....	25
	<b>VI.1</b> <i>Obtención y almacenamiento de muestras</i> .....	25
	<b>VI.2</b> Análisis de FISH de las muestras de estadios larvarios.....	25
	<b>VI.2.1</b> Metodología de FISH aplicada a bacterias asociadas a larvas de <i>L. vannamei</i> .....	25
	<b>VI.2.2</b> Comparación de cuantificación de grupos bacterianos dominantes.....	26
	<b>VI.2.2.1</b> Método de “conteo de frecuencia de observación de campos positivos de bacterias con señal de fluorescencia”.....	26
	<b>VI.2.2.2</b> Método de “conteo de bacterias fluorescentes en campos obtenidos de los pozos de las laminillas”.....	28
	<b>VI.2.3</b> Metodología de conteo con DAPI de bacterias totales asociadas a larvas.....	30

## \* CONTENIDO (continuación)

	<b>Página</b>
	<b>a</b>
<b>VI.2.4</b> Conteos con DAPI de bacterias totales asociadas a larvas.....	30
<b>VI.2.5</b> Aplicación de FISH para identificar grupos bacterianos específicos.....	31
<b>VI.2.6</b> Relación de grupos específicos identificados con FISH con respecto a bacterias identificadas con DAPI.....	34
<b>VI.2.6.1</b> Aplicación de FISH para identificar bacterias del grupo <i>Proteobacteria</i> .....	37
<b>VI.2.6.2</b> Aplicación de FISH para identificar bacterias Gram-positivas de los subgrupos altas en G+C y bajas en G+C.....	38
<b>VI.2.6.3</b> Suma de grupos identificados por FISH.....	40
<b>VI.3</b> Aislamiento y purificación de DNA.....	40
<b>VI.3.1</b> Lisis de tejido, extracción y precipitación del DNA.....	40
<b>VI.4</b> Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	41
<b>VII</b> <b>Discusión</b> .....	43
<b>VII.1</b> <i>Obtención y almacenamiento de muestras</i> .....	43
<b>VII.2</b> Análisis de FISH de las muestras de estadios larvarios.....	45
<b>VII.2.1</b> Metodología de FISH aplicada a bacterias asociadas a larvas de <i>L. vannamei</i> .....	45
<b>VII.2.2</b> Comparación de cuantificación de grupos bacterianos dominantes.....	45
<b>VII.2.3</b> Metodología de conteo con DAPI de bacterias totales asociadas a larvas.....	46
<b>VII.2.4</b> Conteos con DAPI de bacterias totales asociadas a larvas.....	46
<b>VII.2.5</b> Aplicación de FISH para identificar grupos bacterianos específicos.....	47
<b>VII.2.6</b> Relación de grupos específicos identificados con FISH con respecto a bacterias identificadas con DAPI.....	48
<b>VII.2.6.1</b> Aplicación de FISH para identificar bacterias del grupo <i>Proteobacteria</i> .....	51
<b>VII.2.6.2</b> Aplicación de FISH para identificar bacterias Gram-positivas de los subgrupos altas en G+C y bajas en G+C.....	52
<b>VII.2.6.3</b> Suma de grupos identificados por FISH.....	53
<b>VII.2.6.4</b> Relación de grupos identificados por FISH.....	54
<b>VII.3</b> Aislamiento y purificación de DNA.....	57
<b>VII.3.1</b> Lisis de tejido, extracción y precipitación del DNA.....	57
<b>VII.4</b> Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	57

## \* CONTENIDO (continuación)

	<b>Página</b>
<b>VII.5</b> Bacterias asociadas a cultivos larvarios de <i>L. vannamei</i> y metodologías de FISH y PCR.....	<b>a</b>
<b>VIII</b> Conclusiones.....	58
<b>IX</b> Perspectivas.....	60
<b>X</b> Referencias.....	62
	63

## I. INTRODUCCIÓN

La camaronicultura es la actividad económicamente más importante dentro del ámbito de la acuicultura en México. Dentro de la camaronicultura, el cultivo de *Litopenaeus vannamei* es una actividad altamente rentable no solo en México, sino en muchos países de Latinoamérica, por esta razón, se ha convertido en la especie cultivada más importante de México. Desde el 2001, en la industria camaronera Mexicana, el cultivo de camarón (48,014 toneladas) produce más camarón en peso vivo que la captura de altamar (37,107 toneladas) y la de esteros y bahías (20,401 toneladas) (Fuente: SAGARPA, Anuario Estadístico de Pesca, 2003).

Debido al acelerado incremento de producción de camarón, es necesario asegurar fuentes de larvas que cubran los requerimientos que la producción requiere, por ello, es importante incrementar al máximo las tasas de supervivencia y la salud de las larvas cultivadas. Algunos de los factores que afectan fuertemente a los puntos mencionados anteriormente son la desnutrición y la presencia de microorganismos patógenos, ya que estos pueden ocasionar la pérdida total de un cultivo larvario.

En México existen aproximadamente 52 laboratorios de producción larvaria comerciales de camarón (Asociación Nacional de Productores de Larvas de Camarón, [www.anplac.com](http://www.anplac.com)), que producen aproximadamente 6,300 millones de postlarvas que representan el 99% de las larvas sembradas en el país, actualmente, por ley y ecológicamente hablando, la tendencia creciente es usar más larvas cultivadas que capturadas.

Aunque los laboratorios de producción larvaria de camarón son una actividad económicamente rentable, la producción intensiva de larvas genera condiciones estresantes en el cultivo que a menudo resultan en brotes de enfermedades de origen infeccioso y no infeccioso (Lightner, 1993), este factor obviamente afecta la producción del camarón, y en algunos casos es un punto clave para su viabilidad comercial.

## II. ANTECEDENTES

### **Bacterias patógenas asociadas a cultivo de camarón.**

Las enfermedades bacterianas de camarones peneidos son una de las mayores causas de mortalidad en la larvicultura (Wyban y Sweeney, 1991; Wilkenfeld, 1992), y son un factor muy importante que afecta la producción confiable de larvas (Daniels, 1993).

La vibriosis es una enfermedad causada por bacterias del género *Vibrio*, genera mortalidades hasta del 100%, particularmente en postlarvas, se ha observado reducción en la tasa de supervivencia y crecimiento de larvas (Yasuda y Kitao, 1980; Aguirre-Guzmán y Ascencio-Valle, 2000; Aguirre Guzmán *et al*, 2001; Abraham y Palaniappan, 2004).

La enfermedad por bacterias filamentosas aqueja mayormente a la producción larvaria y de estanques de cría de camarón; se piensa que el agente causal son principalmente bacterias de los géneros *Leucothrix*, *Thiotrix*, *Flexibacter*, *Cytopaga* y/o *Flavobacterium* (Lightner, 1993; Aguirre-Guzmán y Ascencio-Valle, 2000).

Actualmente, las tecnologías usadas para el diagnóstico de bacterias marinas relacionadas con enfermedades de cultivos larvarios de camarón son:

1. Examinación microscópica directa, técnicas histológicas
2. Cantidad de bacterias con capacidad de crecer en el medio de cultivo selectivo Tiosulfato-Citrato Sal biliar-Sacarosa (TCBS) (López-Torres *et al.*, 2000),
3. Polimorfismo de fragmentos amplificados (AFLP) (Vandenbergh *et al.*, 1999) y
4. PCR de DNA polimórfico amplificado azarosamente (RAPD-PCR) (Sudheesh *et al.*, 2002).



Existen otro tipo de pruebas usadas en la identificación de bacterias asociadas a cultivos de camarón, entre ellas tenemos, pruebas bioquímicas (Alsina y Blanch 1994; West y Colwell, 1984; Soto *et al.*, 2003), ELISA (Robertson *et al.*, 1998), PCR y RAPD-PCR (Hernández y Olmos, 2004). Estas metodologías en algunos casos consumen mucho tiempo y generalmente no se tiene la certidumbre de que los microorganismos identificados son verdaderamente los agentes patogénicos, por lo tanto, es necesario buscar metodologías que nos permitan identificar de manera rápida y precisa bacterias patógenas asociadas a cultivo de camarón.

#### **Bacterias asociadas a cultivos saludables de camarón.**

Existen pocos trabajos enfocados al estudio de la flora bacteriana asociada a cultivos larvarios saludables, la mayoría están relacionados a probióticos en cultivos larvarios (Gómez-Gil *et al.* 2000). El estudio efectuado por López-Torres *et al.* (2000), que es muy parecido al presente estudio, menciona que bacterias crecidas en medio de cultivo TCBS, presumiblemente *Vibrio* sp., crecidas a partir de larvas de laboratorio de producción larvaria no causan mortalidades importantes en *P. vannamei*.

Abraham y Palaniappan (2004) descubrieron que aunque los conteos viables totales (TVC) incrementaron de huevos a postlarvas, los conteos promedio de bacterias luminosas (LBC) aumentaron de huevos a misis, pero posteriormente disminuyeron.

Se han realizado trabajos encaminados a identificar bacterias asociadas a camarones adultos, tal es el caso del trabajo presentado por Lau *et al.* (2002), quienes mencionan que la colonización microbiana de los intestinos de invertebrados es muy común, pero en

general, no se conoce el rol que juegan estas bacterias en los hospederos. En su estudio encontraron que el 40% de los grupos bacterianos estudiados en el camarón *Neotrypaea californiensis* pertenecían al grupo de las *Proteobacterias* Alfa. Por lo tanto, es de gran interés conocer las comunidades bacterianas que puedan influenciar en forma favorable el estado de salud de los camarones, porque trabajos como el anteriormente mencionado, indican que ciertos grupos son predominantes en órganos específicos de camarones saludables.

Un ejemplo de una de las múltiples maneras en que las bacterias asociadas a camarones pueden beneficiarlos es el descrito por Gil-Turnes *et al.*, (1989) quienes indican que una cepa bacteriana de *Alteromonas* sp. aislada de la superficie de los embriones del camarón *Palaemon macrondactylus*, al producir 2,3-indolinediona (isatin), es capaz de conferirles resistencia ante el hongo *Lagenidium callinectes*, el cual es un patógeno reconocido de muchos crustáceos, entre los que se encuentra *L. vannamei*.

Aunque existen varios trabajos que estudian bacterias asociadas a laboratorios de producción larvaria de camarón y algunos de ellos identifican la presencia de bacterias en el medio (López-Torres *et al.*, 2000; Gómez-Gil *et al.* 2000; Abraham y Palaniappan 2004), existen pocos trabajos enfocados a deducir la estructura de la comunidad (López-Torres *et al.*, 2000; Abraham y Palaniappan 2004). Las sondas para Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH) enfocadas a rRNA intracelular se han convertido en una herramienta ampliamente usada, como por ejemplo, para estudiar microorganismos de aguas residuales (Amann *et al.* 1995). Esta metodología ha sido aplicada exitosamente para la

identificación filogenética en diversos hábitats (DeLong *et al.*, 1999) y sobre todo, se puede deducir la estructura de la comunidad bacteriana a partir de ella y el estado metabólico de la misma (Amann *et al.* 1995).

La mayoría de los probióticos aplicados hasta el momento, no son de origen marino, y mucho menos están relacionados con el cultivo de camarón o con el medio natural en donde se desarrollan los camarones, muy probablemente debido a que se conoce poco sobre la microbiota de estos ambientes (Bechteler y Holler, 1995; Vandenberghe *et al.*, 1998; Dalmin *et al.*, 2001; Vaseeharan y Ramasamy, 2003).

Los estadios larvarios tempranos de camarón, tales como nauplio, zoea y misis, son los más susceptibles a las enfermedades (Vandenberghe *et al.*, 1998; Bohnel *et al.*, 1999), por lo tanto, es de gran interés conocer los microorganismos que se encuentren metabólicamente activos y en mayor cantidad en nauplios, zoeas, misis y postlarvas del camarón blanco *L. vannamei*.

Aguirre-Guzmán, *et al.* (2001) hicieron un estudio comparativo de la susceptibilidad de subestadios larvarios de *L. vannamei* con cuatro especies del género *Vibrio*, de lo cual, *V. alginolyticus* genero una alta tasa de supervivencia en los camarones cultivados.

En el presente trabajo identificamos grupos bacterianos utilizando la técnica de PCR y usamos FISH para examinar cuantitativamente la comunidad bacteriana en un laboratorio de producción larvaria comercial de *L. vannamei* en Puerto Peñasco, Sonora, México, de esta manera se identificaron bacterias metabólicamente activas en larvas sanas de camarón.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

Debido a que las enfermedades bacterianas son la mayor causa de mortalidad en larvicultura de *L. vannamei*, y a que se cuenta con poca información sobre bacterias benéficas para dicha especie; es necesario caracterizar la relación grupos bacterianos Gram-positivos y *Proteobacterias* con diferentes estadios larvarios de camarón *L. vannamei* para intentar inferir el estado de salud de las larvas.

## IV. OBJETIVOS

### Objetivo general.

Identificar grupos bacterianos en diferentes estadios de cultivos larvarios del camarón *L. vannamei* usando las técnicas de Hibridación *in situ* Fluorescente y Reacción en Cadena de la Polimerasa.

### Objetivos específicos

- Identificar grupos bacterianos dominantes en muestras de nauplio V, zoea II, misis III y postlarvas de *L. vannamei* mediante la técnica de FISH.
- Identificar los grupos bacterianos mas representados por FISH en muestras de nauplio V, zoea II, misis III y postlarvas de *L. vannamei* mediante la técnica de 16S rDNA PCR.
- Establecer un método cuantitativo para analizar bacterias identificadas por FISH en cultivo larvario de *L. vannamei*.

## **V. METODOLOGÍA**

### **V.1 Obtención y almacenamiento de muestras.**

Se obtuvieron muestras aleatorias de nauplios, zoeas, misis y postlarvas de *L. vannamei* del laboratorio de producción larvaria perteneciente a la empresa Acuícola AREMAR S.A. de C. V., la cual se encuentra en coordinación y ubicada en las instalaciones de la Unidad Experimental Peñasco, perteneciente al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS), en Puerto Peñasco, Sonora, México.

Para las muestras que se analizaron con FISH se tomaron aproximadamente de 10 a 100 organismos y se colocaron en tubos cónicos (15 ml) con 10 ml de formaldehído al 6%, esta metodología fue tomada de Braun *et al.* (1992) con modificaciones realizadas por Hernández (2000) y adecuaciones del presente trabajo. Para las muestras que se analizaron con PCR, se tomaron aproximadamente de 10 a 100 organismos y se colocaron en tubos cónicos (15 ml) con 10 ml de etanol al 99% (v/v). Una vez que se obtuvieron todas las muestras, se colocaron los tubos con las muestras en un vaso de precipitados con hielo y se almacenaron a 4 °C.

### **V.2 Análisis de FISH de las muestras de estadios larvarios.**

Con el fin de identificar y cuantificar bacterias metabólicamente activas, se aplicó la metodología de FISH, en la figura 1 se muestra un diagrama de flujo de dicha metodología aplicada a nauplios, zoeas, misis y postlarvas de *L. vannamei* de laboratorios de producción larvaria, y a continuación se hace una descripción detallada de la misma.

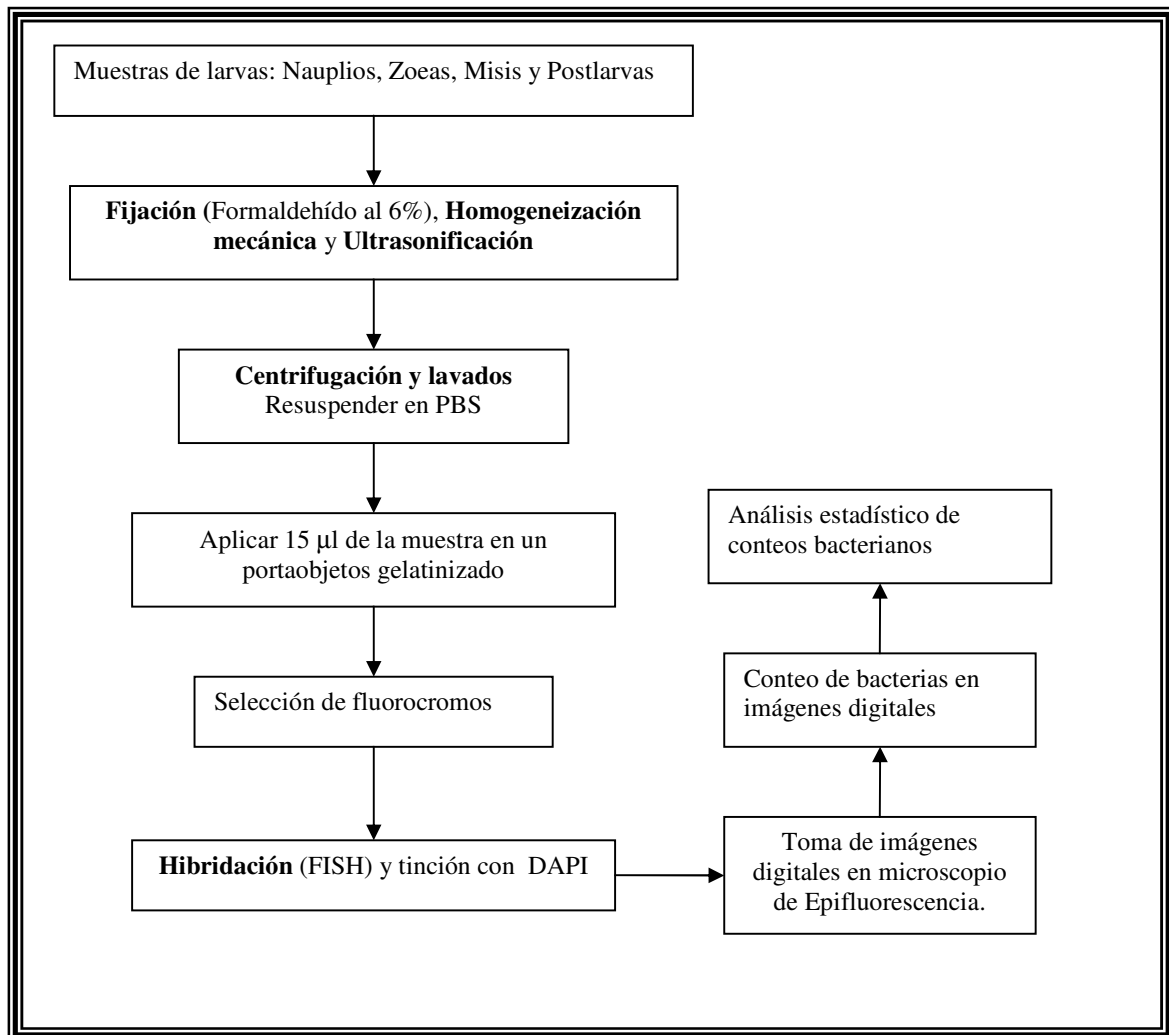


Figura 1. Diagrama de flujo de la técnica de FISH para el análisis de muestras larvarias de nauplios, zoeas, misis y postlarvas de *L. vannamei* para identificar y cuantificar grupos bacterianos asociados al cultivo.

### V.2.1 Preparación de portaobjetos gelatinizados.

Se lavaron y secaron los portaobjetos especiales (Cel-Line Associates, Newfield, NJ).

Posteriormente, se preparó un baño María entre 60 y 70 °C y se preparó la solución de gelatinizado con 0.01 % (w/v) de gelatina, y sulfato de cromo y potasio al 1% (w/v).

Finalmente, se sumergieron los portaobjetos en la solución de gelatinizado y se dejaron gelatinizar por aproximadamente 3 horas.

### **V.2.2 Metodología de FISH aplicada a bacterias asociadas a larvas de *L. vannamei*.**

Se separaron de 20 a 50 mg de larvas y se sonicaron a 20 W por 30 seg con pulsaciones cada 3 seg. Enseguida se centrifugaron a 10, 000 g por 8 min. Posteriormente se lavó el botón 2 veces con PBS frío filtrado mediante decantación y centrifugación a 10, 000 g por 8 min y se resuspendió el botón con 1 ml de PBS frío, se realizó una dilución 1:4 (v/v) y se homogeneizó. A continuación se colocó una alícuota de 15 µl de la dilución así como de los controles bacterianos positivos y negativos en seis pozos de los portaobjetos gelatinizados, se incubaron a 37 °C hasta que se secaron y el resto de la muestra se almacenó a -20 °C. Una vez secas las muestras se trataron con etanol/formaldehído 90/10 (v/v) por 1 hora, transcurrido este tiempo se enjuagaron los portaobjetos dos veces en agua destilada por 2 min cada lavado.

Se aplicaron 40 µl de la solución de hibridación (1 ng/µl) con su correspondiente sonda fluorescente (Tabla I) (Frisher *et al.*, 1996) y se incubaron en la oscuridad a 37 °C toda la noche. Transcurrido este tiempo, en dos ocasiones se les agregó solución de lavado (SET 1X) precalentado a 37 °C y se colocó a 32 °C por 20 min, finalmente se secaron en incubadora a 37 °C en la oscuridad. Una vez secos se colocaron 5 µL de fluido de montaje (10X SET buffer, 50% glicerol, 0.1% *p*-phenilenediamina HCl) y se cubrieron con un portaobjetos para su análisis en un microscopio BX60 OLYMPUS AMERICA, Inc., N.Y., LTD, acoplado con una lámpara de fluorescencia BXFLA utilizando los filtros WU (395-440 nm) y MF (400-700 nm). El procesamiento de las imágenes se realizó con un paquete de software ImagePro® Plus versión 4.1.



Tabla I. Secuencias de oligonucleótidos, tipo de fluorocromo y longitudes de onda empleados en la técnica de FISH.

<b>Grupo Bacteriano</b>	<b>Oligonucleótido</b>	<b>Fluorocromo Color Emitido (Ex/Em) Longitudes de onda en nm.</b>
<i>Proteobacterias</i> $\gamma$	TCA-CCC-GAA-CGT-TCG	Carboxi-X-Rodamina: Anaranjado (576/601)
<i>Proteobacterias</i> $\alpha$	CGG-GGC-CGA-TTG-AGA-GC	Cianina: Rojo (643/667)
<i>Proteobacterias</i> $\delta$	GGA-GAA-CGA-TAC-GTT-TCG	Carboxirodamina: Rojo (524/557)
Gram positivas bajas en G+C	ACG-GTC-TAT-AGT-CCC	Carboxirodamina: Rojo (524/557)
Gram positivas altas en G+C	ATA-CTG-GAA-CCC-GAT-GT	Carboxi-X-Rodamina: Anaranjado (576/601)

### V.2.3 Densidad óptica de los cultivos bacterianos.

Con el fin de generar controles positivos y negativos para los experimentos realizados, se sembraron las bacterias en una caja con un medio rico (TCBS o LB), por lo menos 12 horas antes de iniciar el experimento y se incubaron a 37 °C. Posteriormente se inoculó una azada en 3 ml del mismo medio y se incubó a 300 rpm y 37 °C. Después de 2 o 3 horas se tomó una muestra de cultivo y se leyó en el espectrofotómetro a 600 nm contra un blanco, en bacterias como *E. coli* y *B. subtilis* el cultivo debió presentar una densidad óptica aproximada de 1. A continuación se tomaron 2 ml de este cultivo, y se adicionaron a 18 ml del mismo medio. Después de 2 horas, se siguió la curva de crecimiento, cada hora se leyó a 600 nm contra un blanco, esto es, con el fin de obtener una grafica para identificar la D.O. que pudiera asociarse a la mitad de la fase de crecimiento exponencial, lo cual es muy importante, porque se debe obtener la mayor cantidad de ribosomas en las bacterias.

#### **V.2.4 Preparación de la solución de hibridación.**

Cada pozo de los portaobjetos debió ser cubierto con 40 µl de la solución de hibridación, por lo tanto, se contó el número de pozos que se iba a utilizar y se calculó el volumen total de solución que se iba preparar con 50 µl de exceso.

La solución de hibridación contuvo cuatro constituyentes:

(ABS/PAA): [Albumina de suero bovina al 2% (w/v) y ácido polyA al 0.1% (w/v) (1:1)]; SET 10X (1.5 M de NaCl, 200 mM Trizma pH 7.8 y 10 mM EDTA disódico) y Dextran sulfato al 33%. A esta solución se le agregó la sonda fluorescente, los µl que se adicionan dependieron del volumen total de la solución de hibridación, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

Donde:

$C_1$ = Concentración de solución de trabajo del oligonucleótido, 200 ng/µl

$V_1$ = X Volumen que se desea calcular

$C_2$ = Concentración que se desea obtener en la solución, 1 ng/µl

$V_2$ = Volumen total que se desea preparar de solución de hibridación.

#### **V.2.5 Comparación de cuantificación de grupos bacterianos dominantes.**

##### **V.2.5.1 Método de “conteo de frecuencia de observación de campos positivos de bacterias con señal de fluorescencia”.**

El método de conteo de frecuencia de observación de campos positivos de bacterias con señal de fluorescencia (Padilla, 2005) se muestran en la figura 2, este método consistió en realizar 10 observaciones de campos dentro de campos positivos de bacterias con señal de

fluorescencia del pozo estudiado con el patrón de dirección que se muestra en la figura 2. El método se basa en presencia o ausencia de bacterias dentro del campo observado, de manera tal que a cada campo en donde se observó presencia de bacterias se le asignó el valor correspondiente al 10% de presencia de bacterias, así por ejemplo, cuando se observó presencia de bacterias en 10 pozos se tuvo un 100% de frecuencia de observación, y cuando se observó la presencia de bacterias en 5 pozos se tuvo un 50% de frecuencia de observación. El valor final reportado de frecuencia de observación es el promedio de 3 porcentajes obtenidos.

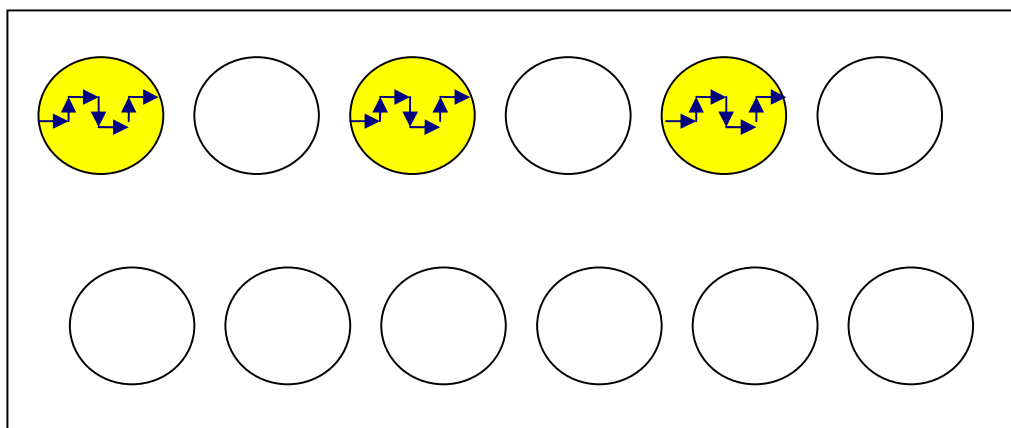


Figura 2. Método de conteo de frecuencia de observación de campos positivos de bacterias con señal de fluorescencia. Las flechas indican la dirección de conteo de los diez campos dentro del pozo de la laminilla mediante el microscopio.

#### **V.2.5.2 Método de “conteo de bacterias fluorescentes en campos obtenidos de los pozos de las laminillas”.**

En la figura 3 se muestra el método de conteo de bacterias fluorescentes en campos obtenidos de los pozos de las laminillas, este método consiste en tomar fotografías con el microscopio BX60 OLYMPUS AMERICA, Inc., N.Y., LTD, y procesar y contar las imágenes con el paquete de software ImagePro® Plus versión 4.1. Las imágenes se

obtuvieron de 10 campos escogidos al azar, dentro de 10 pozos diferentes para cada sonda, en cada estadio larvario y fecha de colecta de muestra. En las imágenes procesadas, solo se contaron las bacterias que hibridan con las sondas grupo-específicas.

El número de Bacterias/ml se determinó a partir de los valores del área del pozo, área de la fotografía tomada, volumen y dilución de la muestra aplicada, y el volumen original de la muestra usada para la hibridación o tinción con DAPI de acuerdo a las siguientes fórmulas modificadas de Dang y Lovell (2002):

$$\text{Bacterias/ml} = \frac{\{[\text{Conteo de bacterias (campos por pozo)}]\} * 1000 \mu\text{l de PBS}}{15 \mu\text{l de dilución aplicada a portaobjetos}}$$

$$\text{Campos por pozo} = \frac{\text{Área de pozo}}{\text{Área de fotografía}}$$

Donde:

- Conteo de bacterias = Bacterias contadas con el paquete de software ImagePro® Plus versión 4.1 en una fotografía
- Área de pozo = 19,635,000  $\mu\text{m}^2$
- Área de fotografía = 18,469  $\mu\text{m}^2$

El porcentaje de bacterias positivas se calculó como la proporción del número de bacterias positivas en la sonda (*Proteobacterias*  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  y bacterias Gram positivas bajas en G+C y altas en G+C) con respecto al número total de bacterias teñidas con DAPI para cada muestra; los valores de autofluorescencia fueron restados a los valores de las muestras, pero no fueron significativos. La suma de porcentajes de grupos se obtuvo sumando los

porcentajes de detección promedio de las cinco sondas estudiadas para cada estadio y fecha de muestreo.

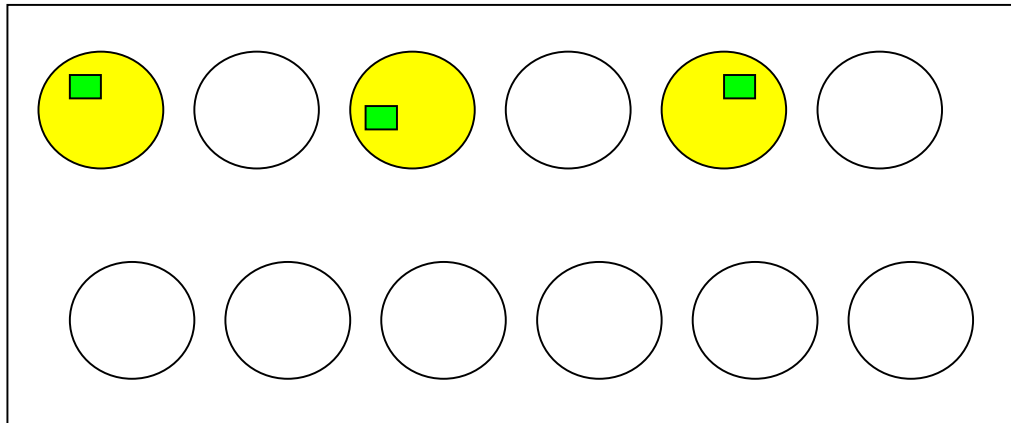


Figura 3. Método de conteo de bacterias fluorescentes en campos obtenidos de los pozos de la laminilla. Los puntos dentro de los pozos de la laminilla en la figura representan los campos microscópicos obtenidos al azar dentro de diferentes pozos de diferentes laminillas.

### V.2.6 Metodología de conteo con DAPI de bacterias totales asociadas a larvas.

Se aplicó la metodología de DAPI a muestras de nauplios, zoeas, misis y postlarvas de *L. vannamei* de laboratorios de producción larvaria para cuantificar bacterias totales en dichas muestras, a continuación se hace una descripción detallada de la misma.

Se separaron de 20 a 50 mg de larvas y se ultrasonificaron a 20 W por 30 seg con pulsaciones cada 3 seg. Enseguida se centrifugaron a 10, 000 g por 8 min. Posteriormente se lavó el botón 2 veces con PBS frío filtrado mediante decantación y centrifugación a 10,000 g por 8 min y se resuspendió el botón con 1 ml de PBS frío, se realizó una dilución 1:4 (v/v) y se homogeneizó. A continuación se colocó una alícuota de 15  $\mu$ l de la dilución así como de los controles bacterianos positivos y negativos en seis pozos de los portaobjetos gelatinizados, se incubaron a 37 °C hasta que se secaron y el resto de la

muestra se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Una vez secas las muestras se trataron con etanol/formaldehído 90/10 (v/v) por 1 hora, transcurrido este tiempo se enjuagaron los portaobjetos dos veces en agua destilada por 2 min cada lavado.

Se aplicaron 40  $\mu\text{l}$  de la solución DAPI (1 ng/ $\mu\text{l}$ ) y se incubaron en la oscuridad a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se retiró la solución DAPI con micropipeta y se eliminó el remanente por capilaridad con papel secante. Una vez secos se colocaron 5  $\mu\text{L}$  de fluido de montaje (10X SET buffer, 50% glicerol, 0.1% *p*-phenilenediamina HCl) y se cubrieron con un portaobjetos para su análisis en un microscopio BX60 OLYMPUS AMERICA, Inc., N.Y., LTD, acoplado con una lámpara de fluorescencia BXFLA utilizando los filtros WU (395-440 nm) y MF (400-700 nm). El procesamiento de las imágenes se realizó con un paquete de software ImagePro® Plus versión 4.1.

### **V.3 Aislamiento y purificación de DNA.**

Para efecto de estudiar bacterias asociadas a larvas de laboratorios de producción larvaria de *L. vannamei*, se aplicó la metodología de extracción de DNA, en la figura 4 se muestra un diagrama de flujo de dicha metodología aplicada a nauplios, zoeas, misis y postlarvas de *L. vannamei*.

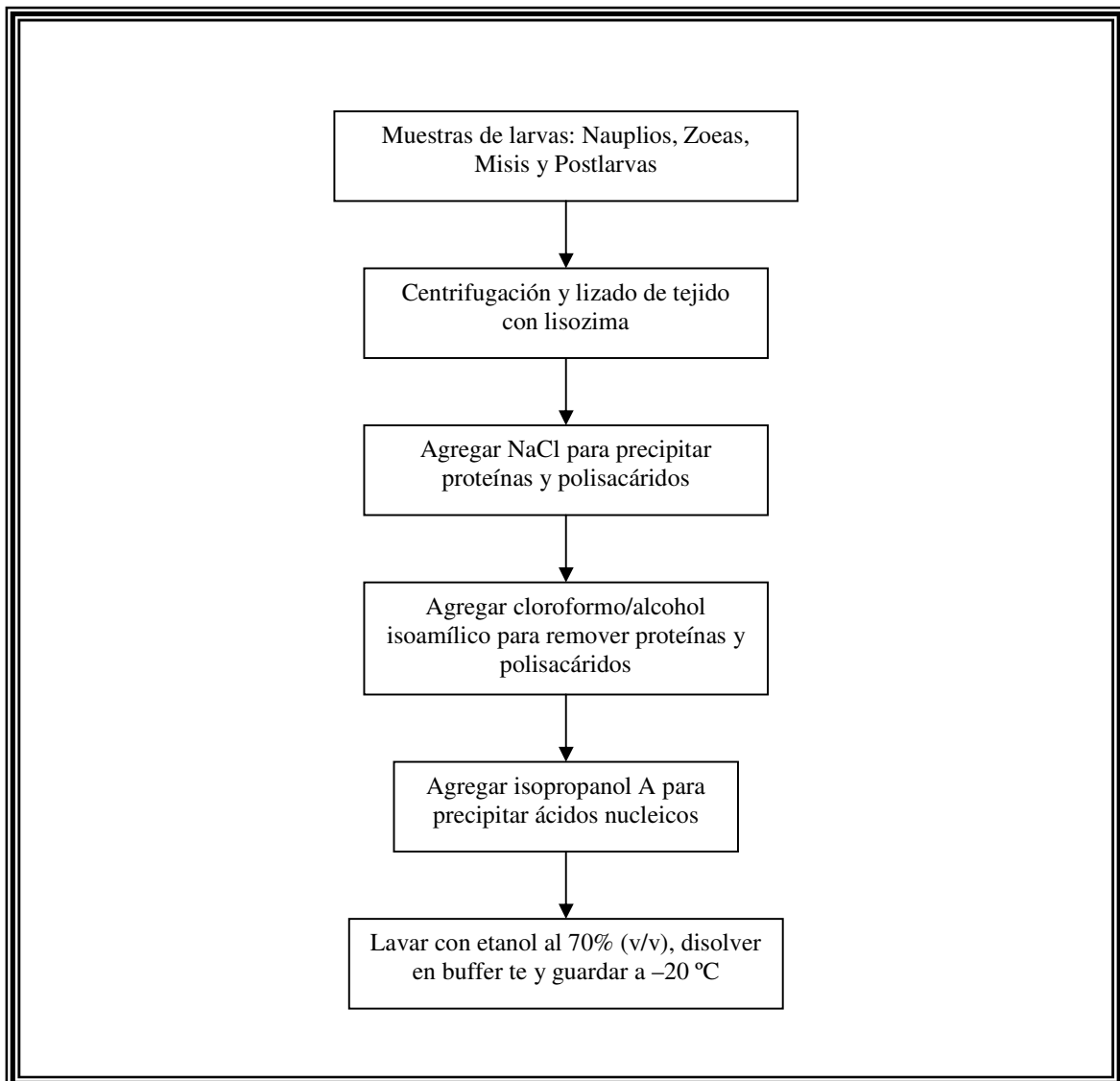


Figura 4. Diagrama de flujo de la técnica de aislamiento y purificación de DNA para el análisis de muestras larvianas de *L. vannamei*.

### V.3.1 Lisis de tejido, extracción y precipitación del DNA.

Con el fin de extraer el DNA del tejido larvario, se aplicó la metodología de Sambrook *et al.*, (1989) con modificaciones para el presente trabajo, a continuación se describe dicha metodología. Inicialmente se centrifugaron las larvas en microcentrífuga a 9,000 g durante 3 min. A continuación se resuspendió el pellet de macerado de larvas en 567  $\mu$ l de buffer

TE, se agregaron 5  $\mu$ l de lisozima y se incubó a 37 °C, a los 10 min se agregaron 10  $\mu$ l de RNAsa, y se incubó por 20 min. Posteriormente se adicionaron 30  $\mu$ l de SDS y 3  $\mu$ l de proteinasa K para obtener una concentración final de 100  $\mu$ g/ml de proteinasa K y de 0.5% de SDS y se incubó 1 h a 37 °C.

Con el fin de lograr la precipitación de complejos proteína-CTAB/polisacáridos, se añadieron 100  $\mu$ l de NaCl 5M lo cual se hizo mezclando, posteriormente se agregaron 80  $\mu$ l de CTAB/NaCl, se mezcló e incubó 10 min a 65 °C. El propósito fue remover residuos de la pared celular, proteína desnaturalizada y polisacáridos que formaron complejos con el CTAB, mientras el DNA cromosomal se mantuvo soluble en el sobrenadante. Posteriormente, para remover los complejos proteína-CTAB/polisacáridos, se agregaron 0.7 ml de cloroformo absoluto: alcohol isoamílico (24/1 v/v), se agitó y centrifugó por 5 min.

A continuación se transfirió el sobrenadante acuoso-viscoso a un tubo nuevo, dejando atrás la interfase y se agregó un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1 v/v), se agitó y centrifugó por 5 min. Después, para precipitar los ácidos nucleicos, se transfirió el sobrenadante (600  $\mu$ l) a un tubo nuevo, se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol (360  $\mu$ l), se agitó el tubo y se centrifugó por 10 min. Finalmente, se lavó con etanol al 70%, se disolvió en buffer TE y se guardó a -20 °C.

#### **V.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa.**

Con el fin de identificar grupos bacterianos asociados a larvas de laboratorios de producción larvaria de *L. vannamei*, se aplicó la metodología de amplificación del 16S



rDNA por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a partir del DNA total extraído de muestras de larvas, en la figura 5 se muestra un diagrama de flujo de dicha metodología aplicada a nauplios, zoeas, misis y postlarvas de *L. vannamei*.

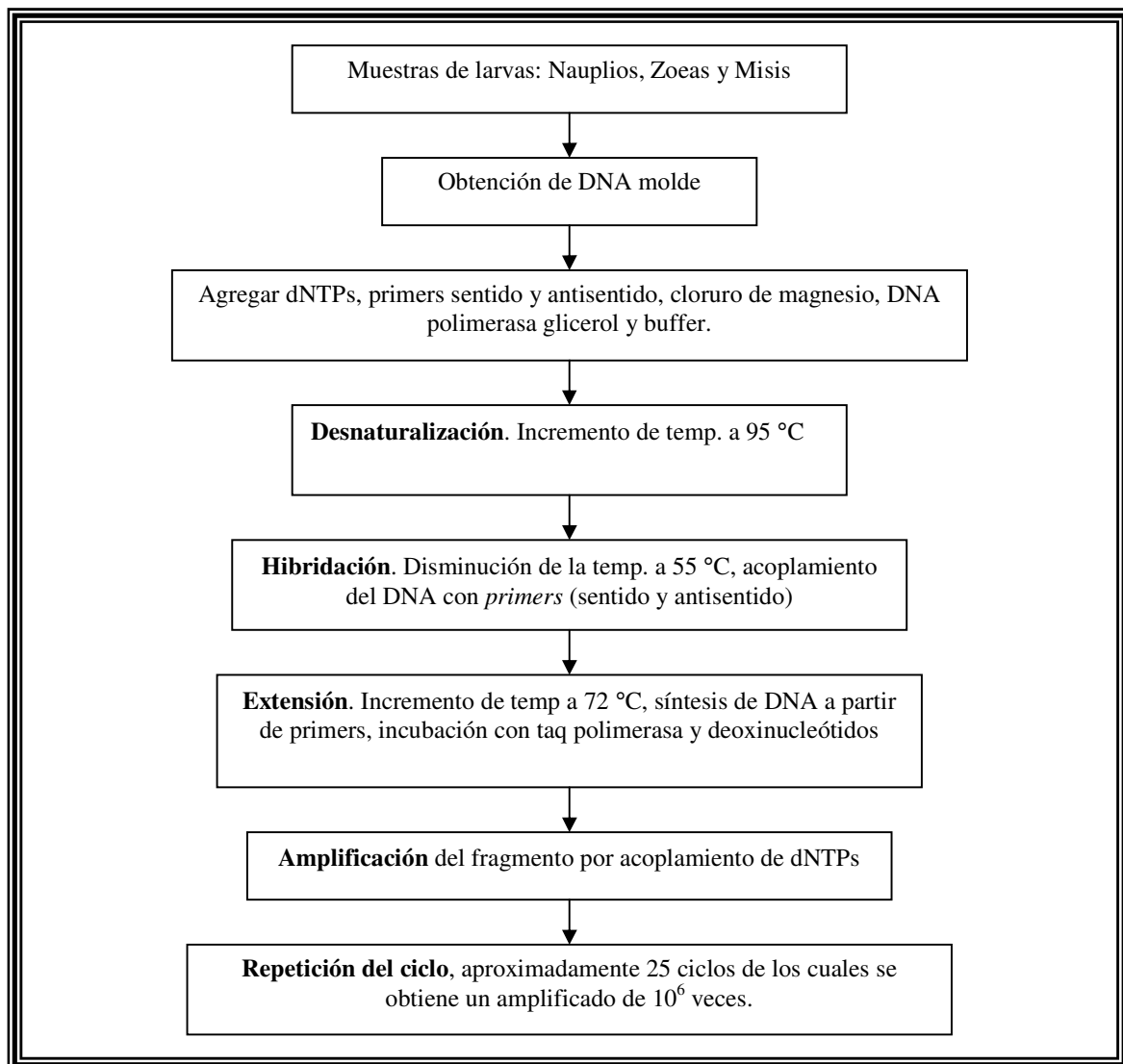


Figura 5. Diagrama de flujo de la técnica de PCR para el análisis de muestras larvarias.

A continuación se hace una descripción de la metodología de PCR. Se usaron los *primers* universales *forward* y uno de los *primers* grupos específicos descritos en la tabla II como

*reverse*. Las reacciones de amplificación se hicieron con base a las instrucciones del Kit para PCR marca Invitrogen, en un termociclador marca GeneE (Techne, Inc) con el programa de la tabla III y de acorde a la reacción de la tabla IV, terminado el programa se colocaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Los productos amplificados se analizaron en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio ( $25\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ) a través de un transluminador (302 nm, LMS-20E, UVP, INC.).

Tabla II. Secuencia de los oligonucleótidos empleados en la técnica de PCR. Donde: Tm = temperatura de hibridación; pb = pares de bases.

<b>Grupo Bacteriano</b>	<b>Oligonucleótido</b>	<b>Tm °C</b>	<b>Longitud (pb)</b>
	<i>(Reverse)</i>	52-54	15
<i>Proteobacterias</i> $\gamma$	TCA-CCC-CAR-TTG-CCT		
<i>Proteobacterias</i> $\alpha$	CGG-GGC-CGA-TTG-ARG-C	45	16
<i>Proteobacterias</i> $\delta$	GGA-GAC-GAA-CGT-TCG		15
Gram positivas bajas en G+C	ACG-CGT-CTA-TAG-TCC	52-56	15
Gram positivas altas en G+C	ATA-CTG-GAC-CCG-ATG-T	46	16

Tabla III. Programa para las reacciones de amplificación por PCR. Donde:  
 $T_mE^*$  = Temperatura de alineación para cada oligonucleótido específico.

<b>Programa</b>	<b>Temperatura y tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	95 °C, 5 min	1
Desnaturalización	95 °C (constante), 1 min	25
Hibridación	$T_mE^*$ (variable), 1 min	
Polimerización	72 °C (constante), 1 min	
Extensión final	72 °C, 10 min	1
	30 °C, 1 min	

Tabla IV. Mezcla de reactivos para llevar a cabo la reacción de PCR.

DNA molde	1 a 5 $\mu$ l
Taq DNA polimerasa	1 $\mu$ l
Oligo 5'	1 $\mu$ l
Oligo 3'	1 $\mu$ l
dNTP's	1 $\mu$ l
Buffer 10X*	5 $\mu$ l
Agua destilada	c.b.p. 50 $\mu$ l

### V.5 Análisis estadístico.

En las secciones de descripción de los métodos: “método de conteo de frecuencia de observación de campos positivos de bacterias con señal de fluorescencia” (Padilla, 2005) y “método de conteo de bacterias fluorescentes en campos obtenidos de los pozos de las laminillas” se menciona la manera en que fueron obtenidos los datos para los análisis estadísticos.

Los diseños experimentales y análisis estadísticos se hicieron en base a lo descrito por Montgomery (1991) y Daniel (1999). Inicialmente se compararon el “método de conteo de frecuencia de observación de campos positivos de bacterias con señal de fluorescencia” (Padilla, 2005) y el “método de conteo de bacterias fluorescentes en campos obtenidos de los pozos de las laminillas” (presente estudio), para este efecto se aplicaron los dos métodos a las muestras del 22 de Julio del 2003.

Para comparar los resultados, se aplicó un Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías al “métodos de conteo de frecuencia de observación de campos positivos de bacterias con señal de fluorescencia” en las muestras de 22/Julio/2003. Para este caso las variables independientes fueron: “estadio larvario” y “grupo bacteriano”, y la variable dependiente fue “frecuencia de observación (%)”. Posteriormente se aplicaron pruebas *a posteriori* tales como la de Duncan y Neuman-Keuls.

De la misma manera, se aplicó un Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías al “método de conteo de bacterias fluorescentes en campos obtenidos de los pozos de las laminillas” en las muestras de 22/Julio/2003; para este caso las variables independientes fueron:

“estadio larvario” y “grupo bacteriano”, y la variable dependiente fue “conteo de bacterias en campo de observación”. Posteriormente se aplicaron pruebas *a posteriori* tales como la de Duncan y Neuman-Keuls.

De los métodos mencionados anteriormente, el “método de conteo de bacterias fluorescentes en campos microscópicos obtenidos al azar dentro del pozo de la laminilla” mostró patrones mas definidos de comportamiento de los grupos bacterianos y tuvo mayor grado de exactitud para poder diferenciar el comportamiento de los grupos bacterianos, por lo tanto, se decidió analizar las muestras posteriores (03/Feb/04 y 14/Abr/04), en conjunción con las muestras del 22/Julio/2003 con el “método de conteo de bacterias fluorescentes en campos microscópicos obtenidos al azar dentro del pozo de la laminilla”.

## **VI. RESULTADOS**

### **VI.1 Obtención y almacenamiento de muestras.**

Se obtuvieron muestras en tres diferentes cultivos larvarios independientes (22/Julio/2003, 03/Febrero/2004 y 14/Abril/2004), las condiciones generales mantenidas en los cultivos fueron temperatura: 30 °C, Salinidad: 33 ppm y supervivencia: 60%.

El almacenamiento de muestras de larvas de *L. vannamei* para FISH fue de 30 minutos a 1 hora en formaldehído al 6% (v/v) y el posterior almacenamiento a 4 °C fue durante 15 días a seis meses, dicho almacenamiento presentó condiciones aptas para el desarrollo de la técnica.

El almacenamiento de muestras de larvas de *L. vannamei* para extracción de DNA en un periodo de 30 minutos a 1 hora en etanol al 99% (v/v), y el posterior almacenamiento a 4 °C durante un mes hasta seis meses, no generó condiciones aptas para la obtención de DNA; dicho almacenamiento provoco la liberación de pigmentos hacia el alcohol que no se había observado anteriormente, los que al parecer inhiben la reacción de PCR.

### **VI.2 Análisis de FISH de las muestras de estadios larvarios.**

#### **VI.2.1 Metodología de FISH aplicada a bacterias asociadas a larvas de *L. vannamei*.**

Cuando se usaron de 20 a 50 mg de larvas (10 a 100 larvas dependiendo del estadio larvario) y posteriormente se diluyeron 4X en conjunción con el proceso de homogeneizado por agitación y ultrasonificación, se obtuvieron densidades adecuadas para la identificación, segregación y realización de conteo de bacterias por medio de la metodología de FISH.

## **VI.2.2 Comparación de la cuantificación de grupos bacterianos dominantes.**

Inicialmente se compararon el “método de conteo de frecuencia de observación de campos positivos de bacterias con señal de fluorescencia” (Padilla, 2005) y el “método de conteo de bacterias fluorescentes en campos obtenidos de los pozos de las laminillas” (presente estudio), para este efecto se aplicaron los dos métodos a las muestras de 22/Julio/2003. Dando mejores resultados el método de conteo de bacterias fluorescentes en campos microscópicos obtenidos al azar dentro del pozo de la laminilla.

### **VI.2.2.1 Método de “conteo de frecuencia de observación de campos positivos de bacterias con señal de fluorescencia”.**

Se identificaron bacterias pertenecientes a los grupos Alfas, altas en G+C, bajas en G+C, Deltas y Gamas. El mayor porcentaje de campos observados perteneció a las bacterias de los grupos altas en G+C y Gamas. Los grupos de bacterias bajas en G+C, Alfas y Deltas mostraron un menor porcentaje de campos observados. Con los conteos de frecuencia de observación, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para comparar las medias de los datos obtenidos, dicho análisis confirmó que existen diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ) en los promedios de campos observados entre los diferentes oligonucleótidos utilizados. Confirmado lo anterior, se procedió a realizar comparaciones *a posteriori* para identificar diferencias específicas entre los diferentes grupos de oligonucleótidos estudiados. Las pruebas de Duncan y Neuman-Keuls ( $\alpha = 0.05$ ), nos indicaron que las medias de los campos observados con las Bacterias altas en G+C y Gamas para todos los estadios analizados, fueron significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ ) a todas las medias de los campos observados en las bacterias Alfas, bajas en G+C y Deltas. Por lo tanto, enfocamos

los análisis *a posteriori* a identificar diferencias entre los grupos bacterianos altas en G+C y Gamas. En los estadios de Nauplio, Misis y Pl 16 existieron diferencias significativas entre el porcentaje de bacterias altas en G+C y Gamas observadas, en Zoea y Pl 1 no existieron diferencias significativas entre dichos grupos.

En la figura 6 se muestran el promedio y las barras de 95% de confiabilidad de frecuencia de observación para los cinco estadios larvarios y cinco sondas de oligonucleótidos usadas. Al observar la figura 6 se podría pensar que existen diferencias entre bacterias Alfas y bacterias Gram positivas bajas en G+C en los estadios de Nauplio y Zoea, siendo en el primer caso mayor el promedio del grupo Alfas y en el segundo caso mayor el de bajas en G+C, pero, la robustez de los datos no tuvo la suficiente exactitud (pruebas *a posteriori* de Duncan y Neuman-Keuls), para identificar diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ) entre dichos grupos.

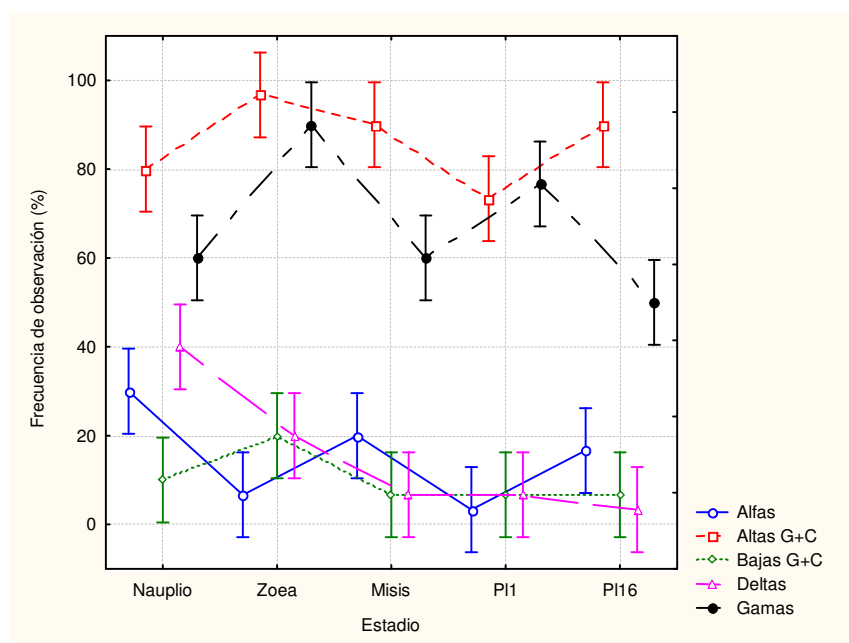


Figura 6. Promedio e intervalos de confianza ( $n = 3$ ) de frecuencia de observación de las subdivisiones y subgrupos bacterianos analizados de las muestras obtenidas en el primer muestreo (22/Jul/03).



### **VI.2.2.2 Método de “conteo de bacterias fluorescentes en campos obtenidos de los pozos de las laminillas”.**

Al igual que en el método de conteo de frecuencias de observación, se identificaron bacterias pertenecientes a los grupos Alfas, altas en G+C, bajas en G+C, Deltas y Gamas. En este caso también, la mayor cantidad de bacterias contadas en diferentes campos perteneció a los grupos altas en G+C y Gamas, los grupos de bacterias bajas en G+C, Alfas y Deltas mostraron una menor cantidad de bacterias contadas. En la figura 7 se muestran el promedio y las barras de 95% de confiabilidad de los datos obtenidos. Debido a que los datos no cumplían con el supuesto de homocedasticidad, se aplicó la conversión de Logaritmo de base diez ( $\text{Log}_{10}$ ), una vez aplicada la conversión, los datos cumplieron con el supuesto y se prosiguió a realizar un análisis de varianza (ANOVA) para comparar las medias de los datos obtenidos. Al igual que en el caso de conteo de frecuencia de observación, el análisis confirmó lo observado anteriormente, donde existieron diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ) en los promedios de campos observados entre los diferentes grupos específicos. Se procedió a realizar comparaciones *a posteriori* para identificar diferencias específicas entre los diferentes grupos de fluorocromos estudiados. Las pruebas de Duncan y Neuman-Keuls ( $\alpha = 0.05$ ), nos indicaron que las medias de los campos observados de las Bacterias altas en G+C y Gamas para todos los estadios analizados fueron significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ ) a todas las medias de los campos observados en las bacterias Alfas, bajas en G+C y Deltas. Por lo tanto, también enfocamos los análisis *a posteriori* a identificar diferencias entre los grupos bacterianos altas en G+C y Gamas. En esta ocasión se observó que en todos los estadios, con

excepción de Zoea, existieron diferencias significativas entre el porcentaje de bacterias altas en G+C y Gammas.

Si retomamos la comparación entre grupos bacterianos Alfas y bajas en G+C para los estadios de Nauplio y Zoea, se puede observar a simple vista que existen diferencias entre bacterias Alfas y bajas en G+C en los estadios de Nauplio y Zoea (Figura 7), siendo mayor en el primer caso el promedio del grupo Alfas y en el segundo caso mayor el de bajas en G+C. En este sentido, a diferencia del método de conteo de frecuencia de observación, aplicando las mismas pruebas (Duncan y Neuman-Keuls), los datos obtenidos en el método de conteo de bacterias fluorescentes en campos microscópicos obtenidos al azar dentro del pozo de la laminilla, nos permite identificar diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ) entre dichos grupos.

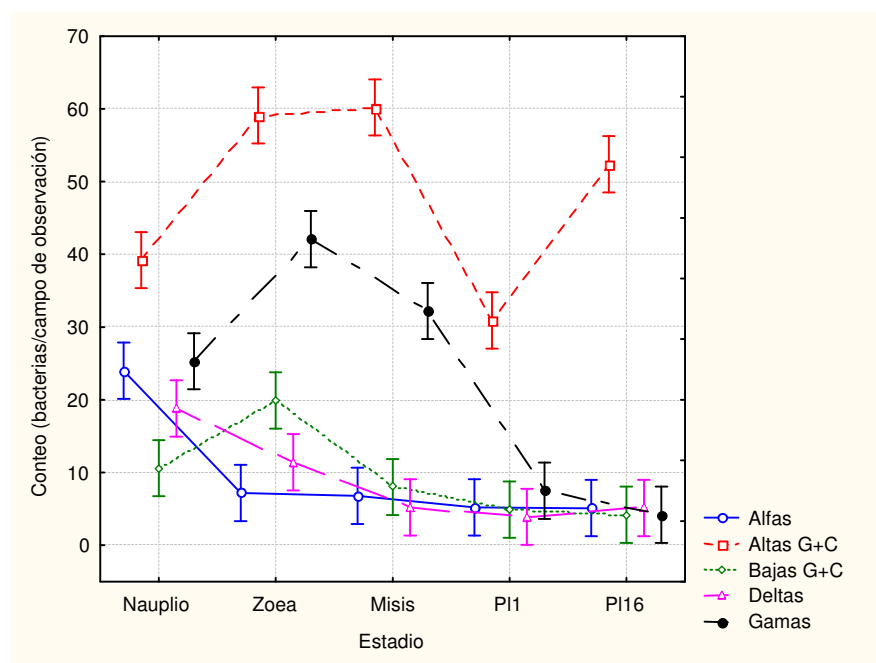


Figura 7. Promedio e intervalos de confianza ( $n = 10$ ) de conteo de bacterias fluorescentes de las subdivisiones y subgrupos bacterianos analizados de las muestras obtenidas en el primer muestreo (22/Jul/03).

Debido a que el método de conteo de bacterias fluorescentes en campos obtenidos de los pozos de las laminillas mostró patrones mas definidos y a que este método tiene mayor grado de exactitud para poder diferenciar grupos bacterianos, se decidió analizar las muestras subsiguientes con el método de conteo de bacterias fluorescentes en campos obtenidos de los pozos de las laminillas.

### **VI.2.3 Metodología de conteo con DAPI de bacterias totales asociadas a larvas.**

Cuando se usaron de 20 a 50 mg de larvas (10 a 100 larvas dependiendo del estadio larvario) y se trataron con el método de conteo de bacterias fluorescentes en campos microscópicos obtenidos al azar dentro del pozo de la laminilla, fue posible contar adecuadamente bacterias por medio de la metodología de DAPI.

### **VI.2.4 Conteos con DAPI de bacterias totales asociadas a larvas.**

El número de bacterias totales fue determinado por tinción con DAPI e imágenes digitales capturadas. Los conteos bacterianos promedio se encontraron en el rango de  $4.3 \times 10^7$  a  $1.0 \times 10^8$  cel/ml de muestra de larvas. Los conteos directos para bacterias totales en cultivos larvarios de *L. vannamei* mostraron diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ) con respecto al muestreo y estadio larvario, al ser analizados con un Análisis de varianza (ANOVA) factorial. Se debe observar que aunque los tres cultivos larvarios mostraron el mismo patrón de incremento en conteo total de bacterias, las pruebas a posteriori de Duncan, Tukey, Scheffé y Newman-Keuls mostraron que el muestreo del 14/Apr/04 es significativamente mas pequeño en cuanto a conteos bacterianos que las otras fechas de muestreo, dando valores promedio de  $4.9 \times 10^7$  cels/ml en nauplio,  $5.9 \times 10^7$  cels/ml en

zoea,  $6.0 \times 10^7$  cels/ml en misis,  $7.1 \times 10^7$  cels/ml en PI 1 y  $9.5 \times 10^7$  cels/ml en PI 16. La figura 8 muestra las medias y los intervalos del 95% de confiabilidad de los conteos totales de DAPI, en los diferentes estadios larvarios analizados para cada fechas de colecta.

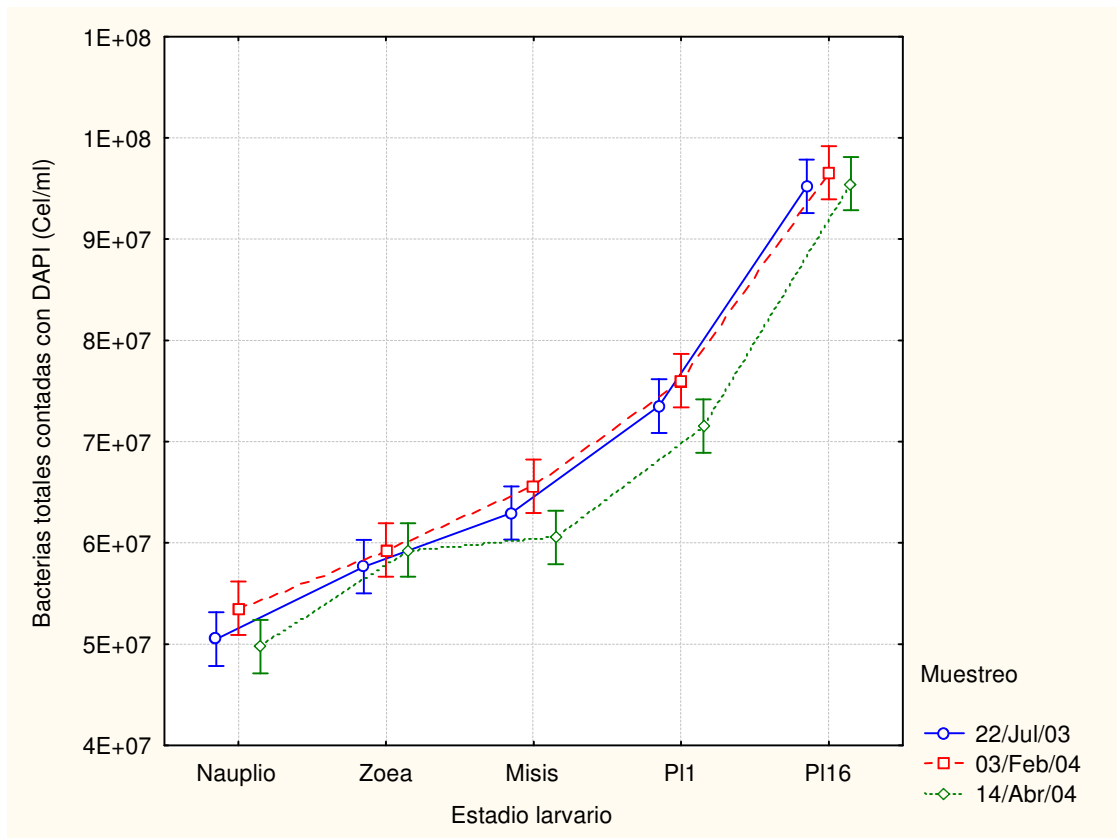


Figura 8. Promedio e intervalos de confianza ( $n = 50$ ) de las subdivisiones y subgrupos bacterianos contados en campos con DAPI, obtenidos de los estadios larvarios colectados en tres diferentes muestreos.

### VI.2.5 Aplicación de FISH para identificar grupos bacterianos específicos.

Se usaron sondas diseñadas para identificar y determinar relaciones con mayor precisión en cinco subdivisiones filogenéticas de bacterias en larvas, las cuales son importantes en sistemas de cultivo de camarones peneidos, las subdivisiones son: *Proteobacterias*  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ ; y bacterias Gram positivas bajas en G+C y altas en G+C. Debido a que los conteos

celulares con FISH (cel/ml) no cumplieron con el supuesto de homocedasticidad, se aplicó la conversión de Logaritmo de base diez ( $\text{Log}_{10}$ ), una vez aplicada la conversión, los datos cumplieron con el supuesto y se prosiguió a realizar un Análisis de varianza (ANOVA) para comparar las medias de los datos obtenidos. El análisis confirmó que existían diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ) en los promedios de los conteos celulares con FISH (cel/ml), entre los diferentes grupos específicos con respecto a estadio larvario y subdivisión. Confirmado lo anterior, se procedió a realizar comparaciones *a posteriori* para identificar diferencias específicas entre los diferentes grupos bacterianos estudiados.

La figura 9 muestra el promedio y las barras de 95% de confiabilidad de los conteos celulares por FISH (cel/ml) en los grupos bacterianos analizados para cada estadio larvario, también se muestra la suma de grupos; los valores promedio fueron obtenidos a partir de tres muestreos diferentes. El número de bacterias obtenido por FISH se determinó a partir de oligonucleótidos específicos para grupos. Los conteos bacterianos promedio se encontraron en el rango de  $1.3 \times 10^6$  a  $1.5 \times 10^7$  cel/ml en las muestras larvarias. Los Log de los conteos de bacterias por FISH (cel/ml) en los cultivo larvario de *L. vannamei* analizado con un ANOVA factorial, mostraron diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ) con respecto a oligonucleotidos grupo específicos y estadio larvario. Debe mencionarse que los cinco estadios larvarios tuvieron patrones similares de incremento en los conteos bacterianos detectados a partir de FISH para cada uno de los oligos estudiados (fig. 10). Las pruebas *a posteriori* de Duncan y Tukey mostraron que si no tomamos en cuenta la variable muestreo, el grupo Alfas fue significativamente mas alto en los conteos bacterianos de nauplio al compararlo con los grupos Alfas de los demás estadios larvarios,

con valores promedio de  $6.8 \times 10^6$  cel/ml. El grupo altas en G+C fue igual ( $\alpha = 0.05$ ) en los conteos bacterianos de zoea, misis y Pl 16 y fue mayor que los conteos bacterianos de los otros estadios larvarios analizados, con valores promedio de 1.5, 1.6 y  $1.4 \times 10^7$  cel/ml respectivamente. El grupo bajas en G+C fue significativamente ( $\alpha = 0.05$ ) mayor en conteos bacterianos de zoea en comparación con los otros estadios larvarios, con valores promedio de  $6.0 \times 10^6$  cel/ml. El grupo Deltas fue significativamente ( $\alpha = 0.05$ ) mayor en conteos bacterianos de nauplio en comparación con los otros estadios larvarios, con valores promedio de  $5.6 \times 10^6$  cel/ml. También se observó que con respecto a Deltas, los conteos bacterianos de zoea fueron mayores que en los estadios larvarios de misis, Pl 1 y Pl 16. El grupo Gamas fue significativamente ( $\alpha = 0.05$ ) mayor en los conteos bacterianos de zoea y misis en comparación con los otros estadios larvarios, con valores promedio de  $1.0 \times 10^7$  y  $9.6 \times 10^6$  cel/ml. Los conteos bacterianos de nauplio fueron mayores que en Pl 1 y Pl 16. Las diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ) de la suma de grupos se muestran a continuación: conteos bacterianos de zoea > nauplio > misis > Pl 16 > Pl 1, con valores promedio de  $3.8 \times 10^7$ ,  $3.4 \times 10^7$ ,  $3.1 \times 10^7$ ,  $2.0 \times 10^7$  y  $1.5 \times 10^7$  cel/ml respectivamente.

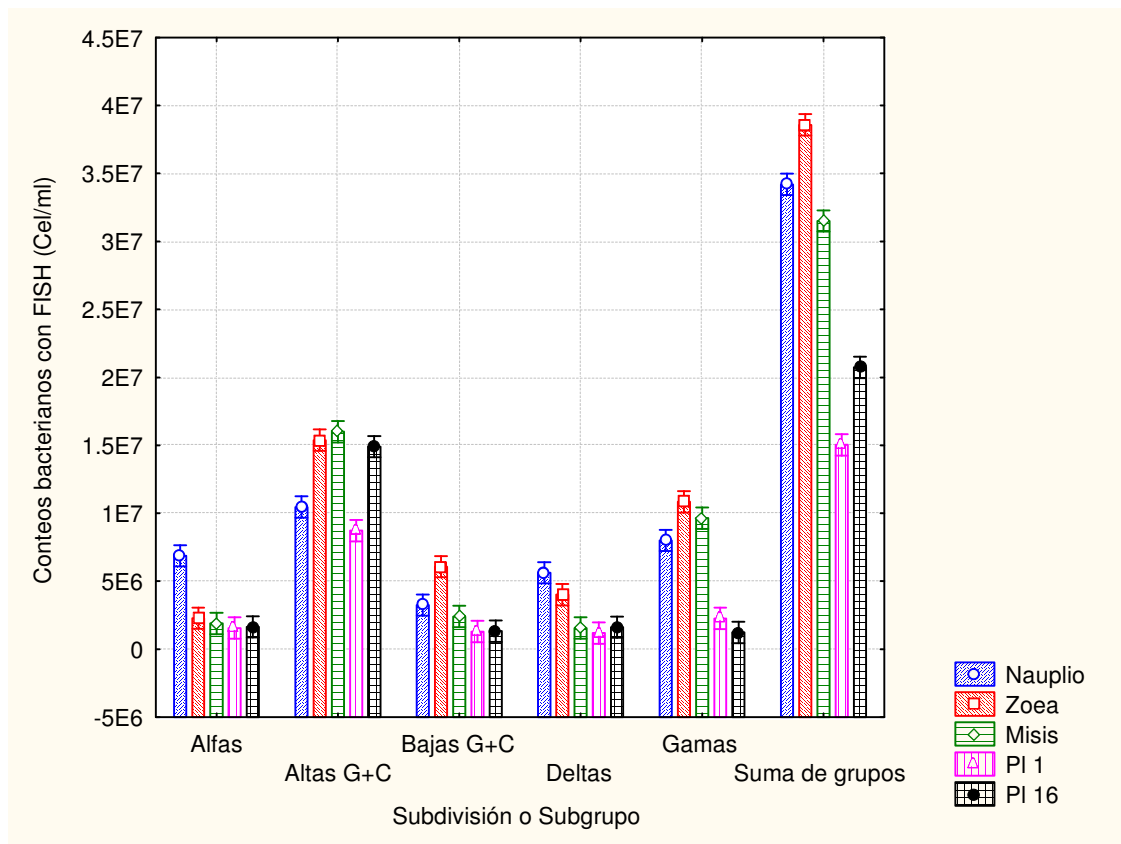


Figura 9. Promedio e intervalos de confianza ( $n=30$ ) de bacterias contadas con FISH de Subdivisión o Subgrupo para los estadios larvarios nauplio, zoea, misis, PI 1 y PI 16, en campos de muestras obtenidas a partir de tres diferentes muestreos.

### VI.2.6 Relación de grupos específicos identificados con FISH con respecto a bacterias identificadas con DAPI.

Los datos de conteos bacterianos con FISH y DAPI (cel/ml) no cumplieron con el supuesto de homocedasticidad y a pesar de realizar diversas transformaciones, continuaron no cumpliendo dicho supuesto (Daniel, 1999). Por tal motivo, no se aplicó ANOVA a datos de conteos celulares con FISH y DAPI (cel/ml).

En la figura 10 se muestran el promedio de subdivisiones y subgrupos bacterianos contados con FISH, y de bacterias totales contadas con DAPI. También se muestra la

suma de los conteos de grupos obtenidos para cada estadio larvario y en cada fecha de muestreo.

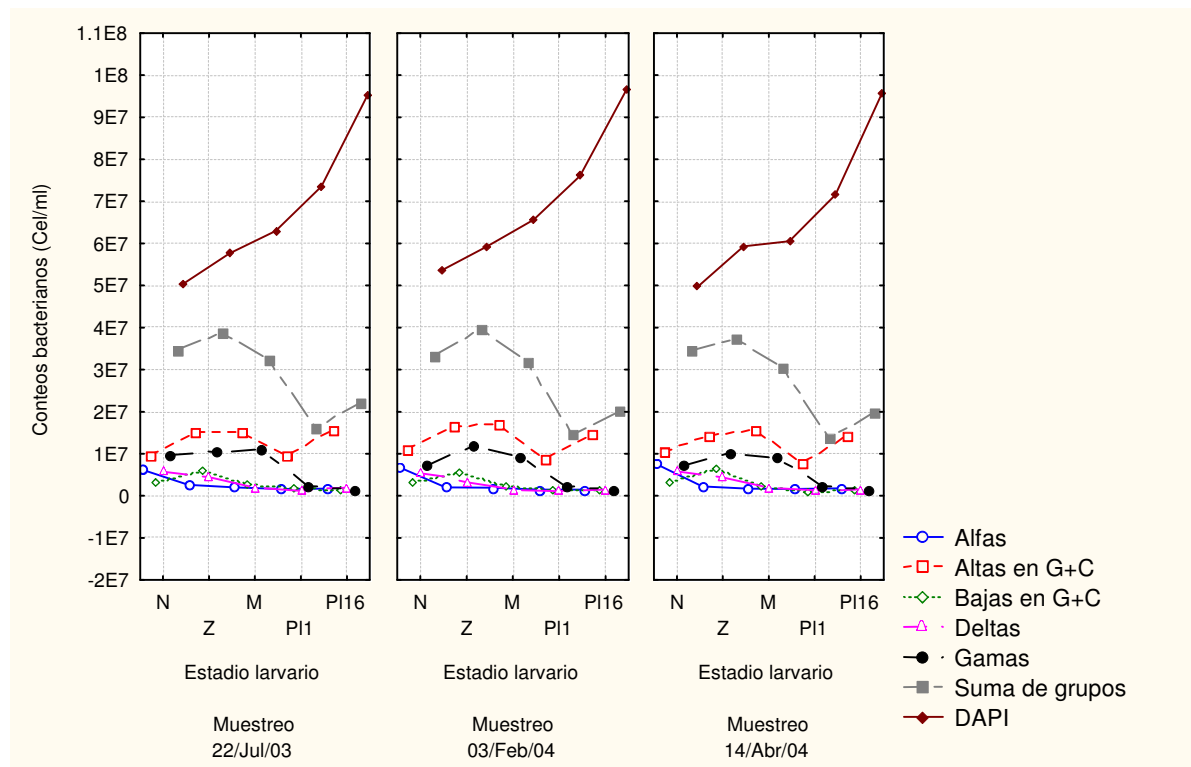


Figura 10. Promedio de conteo de bacterias en campos de las muestras obtenidas en tres muestreos diferentes. Donde N= Nauplio, Z= Zoea, M=Misis, P11= Postlarva 1, y P116= Postlarva 16.

Debido a que los datos de conteos celulares de sondas de grupo/conteos directos con DAPI (%), no cumplieron con el supuesto de homocedasticidad, se aplicó la conversión de Logaritmo de base diez por porcentaje+1 [ $\text{Log}_{10} (\%+1)$ ], una vez aplicada la conversión, los datos cumplieron con el supuesto y se prosiguió a realizar un Análisis de varianza (ANOVA) para comparar las medias de los datos obtenidos. El análisis confirmó que existieron diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ) en los promedios de campos observados entre los diferentes grupos específicos con respecto a la fecha de muestreo, estadio



larvario y subdivisión. Confirmado lo anterior, se procedió a realizar comparaciones *a posteriori* para identificar diferencias específicas entre los diferentes grupos de oligonucleótidos estudiados.

En la figura 11 se muestran el promedio y las barras de 95% de confiabilidad del porcentaje de subdivisiones y subgrupos de bacterias contadas con FISH, con respecto al conteo con DAPI de los diferentes grupos bacterianos analizados. También se muestra la suma de los porcentajes de grupos obtenidos para cada estadio larvario y los datos representativos del 100% de bacterias contadas para cada estadio y en cada fecha de muestreo.

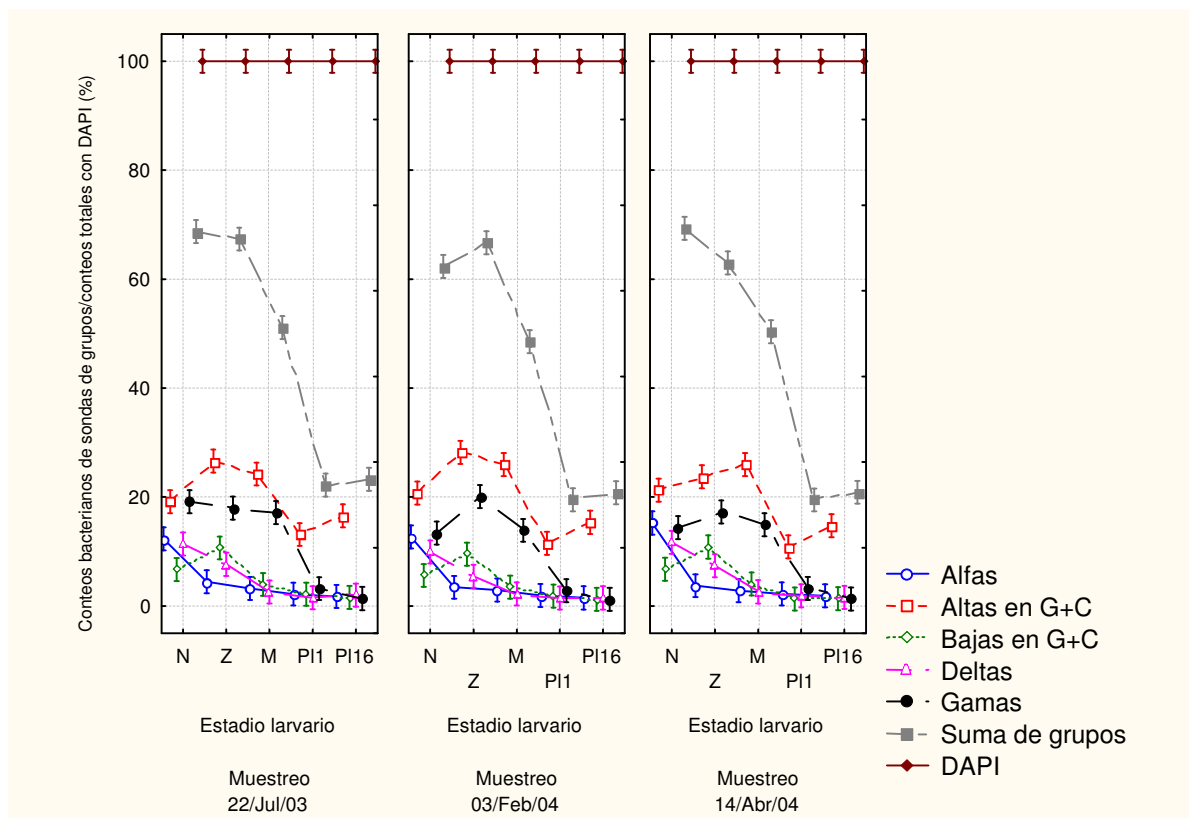


Figura 11. Promedio e intervalos de confianza ( $n=10$ ) de porcentaje de conteo de bacterias contadas (bacterias/ml) con FISH con respecto a DAPI, en campos de muestras obtenidas a partir de tres diferentes muestreos, cinco diferentes grupos y la suma de grupos para los cinco estadios larvarios estudiados en el presente trabajo. Donde N= Nauplio, Z= Zoea, M=Misis, PI1= Postlarva 1, y PI16= Postlarva 16.

### VI.2.6.1 Aplicación de FISH para identificar bacterias del grupo *Proteobacteria*.

Las *Proteobacterias*  $\alpha$  mostraron conteos de  $7.59 \times 10^6$  cel/ml en el estadio de nauplio del muestreo correspondiente al 14 de Abril del 2004 a  $1.44 \times 10^6$  cel/ml en el muestreo del 03 de Febrero del 2004 (Fig. 11), estas bacterias representaron del  $15.2 \pm 4.7$  al  $1.8 \pm 0.7\%$  de las bacterias totales (Fig. 11). Las comparaciones *a posteriori* de Duncan y Tukey mostraron que los porcentajes relativos de *Proteobacterias*  $\alpha$  fueron significativamente mayores ( $\alpha = 0.05$ ) en el estadio larvario de nauplio que en cualquier otro, y que zoea, misis, Pl 1 y Pl 16 no mostraron diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ) en esta subdivisión. Acorde a la comparación *a posteriori* de Duncan y Tukey, los porcentajes relativos fueron significativamente menores ( $\alpha = 0.05$ ) en las *Proteobacteria*  $\alpha$ , en comparación a las bacterias Gram positivas altas en G+C y *Proteobacteria*  $\gamma$ , y fueron iguales a las de las Gram positivas bajas en G+C y *Proteobacteria*  $\delta$  en el estadio larvario de nauplio.

Las *Proteobacterias*  $\delta$  mostraron conteos de  $5.8 \times 10^6$  cel/ml en el estadio de nauplio del muestreo correspondiente al 14 de Abril del 2004 y de  $1.10 \times 10^6$  cel/ml en el muestreo del 03 de Febrero del 2004 (Fig. 11). Las *Proteobacteria*  $\delta$  representaron del  $11.7 \pm 3.4$  al  $1.6 \pm 0.7\%$  de las bacterias totales detectadas con DAPI (Fig. 11). Los porcentajes relativos de *Proteobacteria*  $\delta$  disminuyeron significativamente ( $\alpha = 0.05$ ) durante los estadios larvarios. Las comparaciones *a posteriori* de Duncan y Tukey mostraron que los porcentajes relativos de *Proteobacterias*  $\delta$  en los estadios larvarios fueron significativamente mayores ( $\alpha = 0.05$ ) en nauplio con respecto a cualquier otro. De acuerdo con la prueba *a posteriori* de Duncan, los porcentajes relativos fueron significativamente menores ( $\alpha = 0.05$ ) en las *Proteobacterias*  $\delta$  con respecto a las bacterias

Gram positivas altas en G+C y las *Proteobacterias*  $\gamma$  y  $\alpha$ , y fueron mayores que las bacterias Gram positivas bajas en G+C en el estadio larvario de nauplio.

Las *Proteobacterias*  $\gamma$  mostraron conteos de  $1.19 \times 10^7$  cel/ml en el estadio de zoea del muestreo correspondiente al 03 de Febrero del 2004 y de  $1.19 \times 10^6$  cel/ml en el muestreo del 03 de Febrero del 2004 (Fig. 11). Las *Proteobacteria*  $\gamma$  identificadas representaron del  $20.1 \pm 3.3$  al  $1.2 \pm 0.7$  % de las bacterias totales detectadas con DAPI (Fig. 11). A excepción de las muestras del 22/Jul/03, los porcentajes relativos de *Proteobacteria*  $\gamma$ , incrementaron ( $\alpha = 0.05$ ) de nauplio a zoea e incrementaron de zoea a Pl 16. La comparación *a posteriori* de Tukey mostró que los estadios larvarios de nauplio y misis fueron ( $\alpha = 0.05$ ) iguales, y que ambos fueron significativamente menores ( $\alpha = 0.05$ ) que el estadio larvario de zoea. Las comparaciones *a posteriori* de Duncan y Tukey, mostraron que los porcentajes relativos fueron significativamente ( $\alpha = 0.05$ ) menores en las *Proteobacterias*  $\gamma$  en comparación a las bacterias Gram positivas altas en G+C, y fueron mayores que las *Proteobacterias*  $\alpha$ ,  $\delta$  y las bacterias Gram positivas bajas en G+C en el estadio larvario de zoea.

#### **VI.2.6.2 Aplicación de FISH para identificar bacterias Gram-positivas de los subgrupos altas en G+C y bajas en G+C.**

La sonda altas en G+C se uso para determinar la abundancia de estas bacterias en el cultivo larvario de *L. vannamei*. El subgrupo altas en G+C mostró conteos de  $1.7 \times 10^7$  cel/ml en el estadio de misis del muestreo correspondiente al 03 de Febrero del 2004, y  $7.76 \times 10^6$  cel/ml en el muestreo del 14 de Abril del 2004 (Fig. 11). El subgrupo altas en

G+C representó del  $28.2 \pm 5.4$  al  $10.8 \pm 3.2$  % de los conteos bacterianos totales determinados con DAPI (Fig. 11). La prueba de Duncan mostró que los porcentajes relativos de bacterias altas en G+C detectadas fueron ( $\alpha = 0.05$ ) iguales en los estadios larvarios de zoea y misis, y que ambos fueron mayores que nauplio. La prueba de Duncan mostró que los niveles de bacterias altas en G+C relativos a los conteos bacterianos por DAPI fueron significativamente menores ( $\alpha = 0.05$ ) en las muestras obtenidas el 14/Abr/04 que las del 03/Feb/04; y que las muestras obtenidas el 22/Jul/03 fueron estadísticamente iguales a las del 03/Feb/04 y a las del 14/Abr/04. Las comparaciones *a posteriori* de Duncan y Tukey, mostraron que los porcentajes relativos fueron significativamente ( $\alpha = 0.05$ ) mayores en las bacterias Gram positivas altas en G+C en comparación con las *Proteobacterias*  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  y las bacterias Gram positivas bajas en G+C, en los estadios larvarios de zoea y misis.

La sonda bajas en G+C se usó para determinar la abundancia de estas bacterias en el cultivo larvario de *L. vannamei*. El subgrupo bajas en G+C mostró conteos de  $6.14 \times 10^6$  cel/ml en el estadio de misis del muestreo correspondiente al 22 de Julio del 2004 y  $9.34 \times 10^5$  cel/ml en el muestreo del 14 de Abril del 2004 (Fig. 11). El subgrupo bajas en G+C representó del  $10.8 \pm 3.7$  a  $1.3 \pm 0.5$  % de los conteos celulares totales determinados por DAPI (Fig. 11). Las pruebas de Duncan y Tukey mostraron que los porcentajes relativos de las bacterias bajas en G+C detectables fueron significativamente ( $\alpha = 0.05$ ) mayores en el estadio larvario de zoea en comparación con nauplio, misis, Pl 1 y Pl 16. La comparación *a posteriori* de Duncan mostró que los porcentajes relativos fueron significativamente ( $\alpha = 0.05$ ) mayores en las bacterias Gram positivas bajas en G+C en

comparación con las *Proteobacterias*  $\alpha$  y  $\delta$ , y menores que las bacterias Gram positivas altas en G+C y las *Proteobacterias*  $\alpha$  en el estadio larvario de zoea.

### **VI.2.6.3 Suma de grupos identificados por FISH.**

La suma de grupos mostró conteos de  $3.95 \times 10^7$  cel/ml en el estadio de zoea del muestreo correspondiente al 03 de Febrero del 2004 y  $1.39 \times 10^7$  cel/ml en el muestreo del 14 de Abril del 2004 (Fig. 11). La suma de grupos representó del  $69.3 \pm 9.7$  a  $20.8 \pm 3.4$  % de las bacterias totales detectadas por DAPI (Fig. 11). Los números absolutos de bacterias de la suma de grupos, incrementaron de nauplio a zoea y disminuyeron de zoea a Pl 16 (Fig. 11). A excepción de las muestras del 03/Feb/04, en las cuales las bacterias detectadas por DAPI incrementaron de nauplio a zoea, los niveles comparados a las bacterias detectadas por DAPI, disminuyeron de nauplio a Pl 16. De nauplio a misis la suma de grupos represento del  $69.3 \pm 9.7$  a  $48.5 \pm 3.8$  %.

## **VI.3 Aislamiento y purificación de DNA.**

### **VI.3.1 Lisis de tejido, extracción y precipitación del DNA.**

En todas las extracciones, se observó un ligero barrido a lo largo del área por donde migraron las muestras de DNA, las muestras fueron tratadas con RNAsa y en la mayoría de los casos la intensidad del barrido disminuía, aunque nunca se eliminó por completo.

En la Tabla V se muestra el resumen de los DNAs totales extraídos y la proporción promedio de absorbancia (r) para las longitudes de onda medidas a 260 nm y 280 nm.

Tabla V. DNAs totales extraídos y la proporción promedio de absorbancia para las longitudes de onda medidas a 260 nm y 280 nm. \* Promedio de la proporción de absorbancia (r) de las longitudes de onda medidas a 260 nm y 280 nm.

Tipo de tejido y cantidad (mg)	DNA Total (mg)	Proporción de absorbancias (r)*
Nauplio (750)	0.573	1.03 ± 0.07
Zoea (750)	0.508	1.11 ± 0.03
Misis (750)	0.431	1.15 ± 0.02
Pl 1 (750)	0.376	1.22 ± 0.08
Pl 16 (750)	0.315	1.20 ± 0.02

#### VI.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Se amplificaron segmentos correspondientes al 16S rDNA de las *Proteobacterias*  $\gamma$  y de bacterias Gram positivas altas y bajas en G+C en nauplios, zoeas y misis de larvas de *L. vannamei* (figura 12).

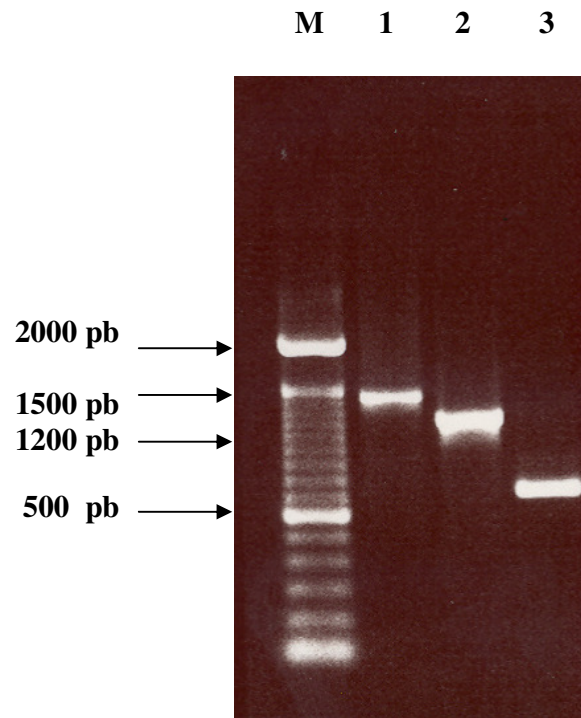


Figura 12. Gel de electroforesis de productos de PCR de 16S rDNA de grupos bacterianos asociados a larvas de *L. vannamei* en 1.5% de agarosa. Carril M, marcador de peso molecular; carril (1) *Proteobacterias*  $\gamma$  (1400 pb); carril (2) bacterias Gram positivas bajas en G+C (1200 pb); carril (3) bacterias Gram positivas altas en G+C (700 pb).

No fue posible amplificar segmentos correspondientes al 16S rDNA de *Proteobacterias*  $\alpha$  y  $\delta$  en todos los estadios larvarios; y no se pudieron amplificar segmentos correspondientes al 16S rDNA de *Proteobacterias*  $\gamma$  y de bacterias Gram positivas altas y bajas en G+C en P11 y P1 16.

## VII. DISCUSIÓN

### VII.1 Obtención y almacenamiento de muestras.

Los factores fisicoquímicos y la comunidad bacteriana asociada a tasas de sobrevivencia del 60% en laboratorios de producción larvaria de *L. vannamei*, provee características apropiadas para cultivos larvarios saludables de esta especie.

En lugar de bacterias asociadas a agua o a tanques de los laboratorios de producción larvaria, escogimos trabajar con bacterias epibiontes asociadas a larvas. En la superficie de las larvas se encuentra una gran cantidad de bacterias, esto se debe a que es un ambiente adecuado para la fijación y crecimiento bacteriano; dicha superficie provee un área muy grande para la adhesión bacteriana como son el exoesqueleto, tracto digestivo y branquias. Los epibiontes bacterianos juegan un papel importante en la salud del camarón, tanto benéfica (Gil-Turnes y Fenical, 1992; Abraham et al., 2001) como perjudicialmente (Lavilla-Pitogo et al., 1990; Lightner, 1993). Por tal motivo se decidió analizar la comunidad bacteriana presente en nauplios, zoeas, misis, Pl 1 y Pl 16 de *L. vannamei*.

El hecho de capturar las larvas, fijarlas en formaldehído al 6%, guardarlas en hielo y almacenarlas a 4 °C, genera condiciones adecuadas para almacenar las muestras hasta por 6 meses, dicho almacenamiento no genera cambios en la estructura e identificación de bacterias asociadas al cultivo larvario por el método de FISH.

Los tejidos y exoesqueleto de las larvas no permitieron filtrar y contar apropiadamente las muestras, aun aquellas que habían sido diluidas, por este motivo, decidimos no utilizar el método tradicional de filtrar un volumen de agua conocido para calcular la densidad



celular, y por lo tanto, calculamos la densidad celular con base en las imágenes digitales capturadas. Usando este método, las densidades celulares obtenidas mostraron distribuciones normales y homocedásticas.

Fijar larvas en etanol al 99%, guardarlas en hielo y almacenarlas a 4 °C, no generó condiciones adecuadas para la extracción de DNA de bacterias asociadas al cultivo larvario, en este caso debimos determinar la densidad celular para conocer la concentración de etanol optima. El resultado de este trabajo no concuerda con lo obtenido en investigaciones previas de nuestro grupo de trabajo (Hernández, 2000; Padilla, 2005). Esto se puede deber a que probablemente a nivel larvario existen más enzimas que en los adultos, y estas enzimas actúan mas rápidamente sobre el DNA de los grupos bacterianos estudiados en el presente trabajo. También se puede deber a que el metabolismo larvario es mucho más activo y degradó más rápidamente el DNA de los grupos bacterianos estudiados.

Por otra parte, es importante mencionar que durante el almacenamiento el etanol se fue coloreando de un pigmento rojo, lo cual no sucedió en los otros trabajos mencionados debido a que los animales no fueron almacenados por tanto tiempo. En este sentido, esta reportado que pigmentos del camarón inhiben la reacción de PCR por inactivación de la polimerasa (Lindqvist, 1999).

## **VII.2 Análisis de FISH de las muestras de estadios larvarios.**

### **VII.2.1 Metodología de FISH aplicada a bacterias asociadas a larvas de *L. vannamei*.**

En la presente investigación se corroboró que el proceso de dilución 4X en conjunción con el proceso de homogeneizado por agitación y ultrasonificación, genera condiciones adecuadas para la identificación de bacterias por medio de la metodología de FISH, esto ya se había observado en trabajos previos (Hernández, 2000; Padilla, 2005). Por otro lado, se observó que el procesado de las muestras genera densidades adecuadas para la segregación y realización de conteo de bacterias por medio de la metodología de FISH en larvas de *L. vannamei*.

### **VII.2.2 Comparación de cuantificación de grupos bacterianos dominantes.**

En el método de frecuencia de observación la “n” solo es de 3 y en el método de conteo de bacterias en campos la “n” es de 10, esto es debido a que en el primero, para obtener la n de 3 en realidad se necesitan 30 campos, y en el segundo solo se necesitan 10 fotografías. Sin embargo, estas 10 fotografías explican mejor el comportamiento de la comunidad bacteriana debido a que se obtiene de manera aleatoria, no siendo así el caso del método de frecuencia de observación, donde el patrón de observación de los campos tiene una trayectoria definida y por lo tanto, no aleatoria. Por otro lado, en el método de frecuencia de observación, el resultado se obtiene de la distribución de la muestra de solo tres pozos, esto definitivamente no es bueno para el estudio de las bacterias de interés porque los resultados pueden ser más fácilmente alterados debido a errores en la metodología experimental. En contraste, en el método de conteo de bacterias en campos, el resultado se

obtiene de la distribución de las muestras en diez campos diferentes, esto ayuda a disminuir los posibles errores en la metodología experimental.

El método de frecuencia de observación permite identificar cuantitativamente los grupos dominantes. Esto se debe a que basados en las fotografías capturadas en el microscopio, es posible cuantificar las bacterias que se observaron en un campo microscópico, teniendo de esta manera, una base numérica comparativa para definir los grupos bacterianos dominantes en muestras de larvas de *L. vannamei*.

### **VII.2.3 Metodología de conteo con DAPI de bacterias totales asociadas a larvas.**

Cuando se usan de 20 a 50 mg de larvas (10 a 100 larvas dependiendo del estadio larvario) y la posterior dilución 4X en conjunción con el proceso de homogeneizado por agitación y ultrasonificación, se obtienen densidades adecuadas para la identificación, segregación y realización de conteo de bacterias por medio de la metodología de DAPI.

### **VII.2.4 Conteos con DAPI de bacterias totales asociadas a larvas.**

En este estudio, usamos DAPI para identificar y enumerar grupos bacterianos cultivables y no cultivables asociados al cultivo larvario de *L. vannamei*. Se observó un incremento gradual y significativo ( $\alpha = 0.05$ ) en los conteos totales de bacterias identificadas con DAPI asociadas a *L. vannamei*, desde el estadio de nauplio hasta postlarvas. Los conteos totales promedio sugieren cantidades cuatro veces menores en el estadio larvario de nauplio en comparación con Pl 16. La abundancia promedio de nauplio a Pl 16 fue de  $4.3 \times 10^7$  a  $1.0 \times 10^8$  cel/ml, dicha abundancia es mayor que la reportada en trabajos anteriores

de bacterias asociadas a cultivos larvarios de camarón (Lopez-Torres *et. al.*, 2000; Abraham y Palaniappan, 2004) en donde se usaron cultivos celulares para determinar la cantidad de bacterias, lo cual no es muy adecuado, ya que una gran mayoría de bacterias de muestras biológicas no son cultivables. Los resultados del presente trabajo difieren de lo obtenido por Yasuda y Kitao (1980), quienes observaron un incremento en los conteos totales de bacterias viables desde huevos hasta misis en *P. japonicus* y posteriormente un decremento en dichos conteos. Como era de esperarse, los conteos bacterianos obtenidos con la técnica de DAPI mostraron diferencias en el número obtenido de bacterioplancton en los diferentes cultivos larvarios de *L. vannamei*, los conteos del 14/Abr/04 son menores a los conteos de los otros dos muestreos, esto podría indicar que probablemente la disponibilidad de nutrientes del sistema fue menor en dicha fecha de cultivo. De cualquier manera, aunque son estadísticamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ ), el patrón de incremento bacteriano es similar, con base en esto, se puede pensar que la manipulación del crecimiento bacteriano bajo condiciones controladas en laboratorios de producción larvaria de *L. vannamei* es factible, y representa una gran posibilidad en el futuro de la producción de larvas de *L. vannamei* ya que se puede controlar la comunidad bacteriana asociada al mismo.

#### **VII.2.5 Aplicación de FISH para identificar grupos bacterianos específicos.**

Con objeto de estudiar cuantitativamente la dominancia numérica de bacterias asociadas a larvas de *L. vannamei* en laboratorios de producción larvaria, se realizaron conteos celulares con FISH. Debido a la gran heterogeneidad de bacterias en los estadios larvarios, se obtuvieron valores diferentes tanto para los números absolutos de bacterias

identificadas con FISH, como para los niveles relativos de las mismas. Se obtuvieron imágenes de diez campos en diez diferentes pozos, dichas imágenes se tomaron como réplicas. Un área relativamente grande de la superficie del pozo fue muestreada ( $19,635,000 \mu\text{m}^2$ ) para cada sonda, en cada estadio larvario y fecha de muestreo. Korber *et al.* (1993) indica que se requiere un área mínima de  $10^5 \mu\text{m}^2$  para determinaciones estadísticas válidas de números de células. Nuestra área de muestreo total de la superficie del pozo fue de dos órdenes de magnitud más grande que el mínimo requerido.

Los controles negativos mostraron consistentemente muy pocas o ninguna célula marcada fluorescentemente, lo cual indica la gran proporción señal/ruido de la metodología. Como se había observado anteriormente (Hernández, 2000; Padilla, 2005), la hibridación en portaobjetos de 12 pozos fue adecuada y facilita el procesamiento rápido de muestras de larvas de *L. vannamei*; en el presente trabajo se observó que esta metodología permite la realización de análisis cuantitativos de diferentes muestras de larvas de *L. vannamei*.

#### **VII.2.6 Relación de grupos específicos identificados con FISH con respecto a bacterias identificadas con DAPI.**

No existen trabajos previos usando oligonucleótidos marcados fluorescentemente para identificar y enumerar comunidades bacterianas asociadas a cultivos larvarios de camarón. Los descubrimientos realizados en el presente trabajo representan una base para el mejor entendimiento de la dinámica microbiana en los cultivos larvarios de camarón. Las figuras 9, 10 y 11 muestran claramente que los conteos bacterianos de Alfas en el estadio larvario

de nauplio, fueron mayores que cualquier otro estadio larvario en relación a este mismo grupo.

Las bacterias altas en G+C fueron el grupo más observado, obteniendo los mayores conteos celulares en todos los estadios larvarios; el incremento de nauplio a zoea y misis, el posterior decremento en números celulares y finalmente, el incremento de Pl 1 a Pl 16 a niveles estadísticamente iguales ( $\alpha = 0.05$ ) que zoea y misis, indican un comportamiento cíclico en el crecimiento de dichas bacterias Gram positivas. Sería interesante observar si dicho ciclo continúa al continuar el cultivo de las postlarvas bajo las mismas condiciones.

Las bacterias bajas en G+C se observaron en grandes cantidades durante el estadio de zoea en comparación con otros estadios larvarios, esto se puede deber a que durante esa etapa se comienza a proporcionar alimento vivo y se inoculan constantemente con el alimento vivo. El posterior decremento de estas bacterias pudo estar determinado por factores ambientales, por antibióticos naturales; y por antibióticos artificiales, ya que se aplicaron los antibióticos cloranfenicol en nauplio, Enroqueen en zoea, y furazolidona en misis.

El decremento gradual pero significativo ( $\alpha = 0.05$ ) de *Proteobacterias* Deltas de nauplio a Pl 16, es muy similar al de las *Proteobacterias* Alfa, bajo esta premisa, podría ser posible que el crecimiento de estos dos grupos bacterianos este definido por los mismos factores ambientales.

Se identificaron grandes cantidades de *Proteobacterias* Gama durante los primeros estadios larvarios, y posteriormente, no se observó un incremento significativo de este grupo, por lo tanto, se puede deducir claramente de dicha observación, que las

*Proteobacterias* Gama son numérica y fisiológicamente muy importantes durante los primeros estadios larvarios. Esta observación es muy interesante, debido a que aunque los conteos celulares de *Proteobacterias* Gama son verdaderamente altos ( $1.0 \cdot 10^7$  cels/ml), las larvas relativamente vulnerables no solamente pudieron sobrevivir si no que además, el cultivo se desarrolló bajo condiciones saludables, indicando que no todas las *Proteobacterias* Gama son dañinas como algunos autores han mencionado (Yasuda y Kitao, 1980; Karunasagar *et al.*, 1994; Aguirre-Guzmán y Ascencio-Valle, 2000), sino benéficas para el cultivo larvario de camarón (Gómez-Gil *et al.*, 2002). Lo anterior se puede deber a los antimicrobianos secretados por otros simbiontes de las larvas como cianobacterias, a la presión que los antibióticos ejercen sobre la comunidad bacteriana, o, a la respuesta del desarrollo larvario hacia las bacterias patógenas, en este sentido, Prayitno y Latchford (1995) sugirieron que los animales mayores como misis y postlarva podrían desarrollar mayor resistencia a la vibriosis luminosa, una enfermedad causada por miembros de la subdivisión de *Proteobacterias* Gama.

En los cultivos larvarios analizados se usaron regularmente los antibióticos: cloranfenicol en nauplio ( $1\text{g}/\text{m}^3$ ), Enroqueen en zoea ( $4.5\text{ ml}/\text{m}^3$ ) y furazolidona en misis ( $1.5\text{ g}/\text{m}^3$ ) (AREMAR, tablas diarias, comunicación personal), para prevenir enfermedades bacterianas. Debido a que varios estudios han observado que ciertas especies bacterianas en cultivos larvarios de *L. vannamei* son controladas por antibióticos (Hameed y Rao, 1994; Abraham *et al.*, 1997), seguramente, la adición de antibióticos en el agua alteró la estructura de la comunidad bacteriana de los cultivos.

Aunque observamos que las bacterias totales identificadas con DAPI gradualmente incrementan en densidad con el cultivo, no fue así con la suma de grupos de bacterias contadas, en dicho caso, los mayores conteos de suma de grupos fueron observados durante el estadio de zoea. Los estadios larvarios de nauplios y misis mostraron suma de conteos celulares estadísticamente ( $\alpha = 0.05$ ) similares, indicando que en el estadio zoea, se observó un pico de la suma de los grupos bacterianos estudiados en el presente trabajo.

#### **VII.2.6.1 Aplicación de FISH para identificar bacterias del grupo *Proteobacteria*.**

El porcentaje de *Proteobacterias* Alfa observadas en el estadio larvario nauplio, varío mucho en comparación con zoea, de tal manera que la proporción de *Proteobacterias* Alfa disminuyó el doble en zoea con referencia al estadio de nauplio. Al comparar los nauplios y zoea con misis y postlarvas, se observa que estos últimos mostraron poblaciones bacterianas menores a los primeros. El descubrimiento que las *Proteobacterias* Alfa fuera un grupo bacteriano dominante en el estadio nauplio es consistente con los datos obtenidos previamente en primeras colonizaciones de sistemas marinos (Dang y Lovell, 2002). También es interesante mencionar que algunas bacterias pertenecientes al grupo Alfa como *Pseudomonas*, han sido utilizadas exitosamente como probióticos en estudios previos relacionados a cultivo de camarón (Chynthanya *et al.*, 2002).

Los resultados del presente trabajo difieren de lo obtenido por Abraham y Palaniappan (2004), ya que ellos mencionan que las condiciones eutróficas de los cultivos larvarios favorecen el crecimiento selectivo de bacterias luminosas; tomando en cuenta que un gran número de bacterias luminosas que crecen en cultivos bacterianos pertenecen a las



*Proteobacterias* Gama, nuestros resultados indican que aunque las condiciones de cultivo evidentemente incrementaban en cuanto a acumulación de nutrientes, se observó el pico de crecimiento de *Proteobacterias* Gama durante el estadio zoea.

Las muestras larvarias examinadas en este trabajo muestran que los conteos de *Proteobacterias* Gama se encontraron en los rangos de  $11.7 \pm 3.4$  a  $1.6 \pm 0.7$  %. El porcentaje de la concentración de *Proteobacterias* Gama fue mayor ( $\alpha = 0.05$ ) en el estadio de zoea comparado con los estadios de nauplio y misis. Lo anterior muestra claramente que el incremento de *Proteobacterias* Gama, se puede llevar a cabo en los cultivos larvarios de *L. vannamei* en las primeras etapas larvarias sin presencia de enfermedades, sin embargo, bajo condiciones estresantes, las bacterias oportunistas que se encuentren adheridas a las larvas o postlarvas, pueden causar enfermedades y finalmente la muerte.

#### **VII.2.6.2 Aplicación de FISH para identificar bacterias Gram-positivas de los subgrupos altas en G+C y bajas en G+C.**

Al usar la sonda altas en G+C, se demostró una abundancia de hasta  $1.6 \times 10^7$  cels/ml en los cultivos larvarios de *L. vannamei*, lo cual representa  $28.2 \pm 5.4\%$  de los conteos celulares realizados con DAPI. Resultados previos sugieren que las altas densidades celulares de bacterias altas en G+C son una característica común de los cultivos marinos de *L. vannamei* (Padilla, 2005). Si esto es cierto, el subgrupo de bacterias Gram positivas altas en G+C registradas en este trabajo, aparentemente representa una fracción muy grande y significativa de la biomasa del picoplancton en los cultivos de *L. vannamei* en condiciones controladas. Mas del 20.3%, 26.1% y 25.3% de las bacterias detectadas con

DAPI en las larvas, se encontraban afiliadas al grupo Gram positivas de bacterias altas en G+C en los estadios larvarios de nauplio, zoea y misis respectivamente.

Es muy importante recordar que en promedio, el porcentaje de supervivencia de los cultivos larvarios fue del 60%, esta es una tasa de supervivencia considerablemente buena y rentable para cultivos larvarios de *L. vannamei*. La identificación consistente de grupos bacterianos específicos como son las bacterias Gram positivas altas en G+C en larvas que tienen altas tasas de supervivencia y crecimiento larvario, es un dato muy prometedor e indica nuevas vías en la búsqueda de probióticos asociados a cultivos larvarios marinos de *L. vannamei*. Sin embargo, son necesarios estudios funcionales de bacterias Gram positivas altas en G+C, como determinación de concentración profiláctica en agua y/o alimento, para verificar si estas bacterias pueden actuar como probióticos.

#### **VII.2.6.3 Suma de grupos identificados por FISH.**

El hecho de que el porcentaje de la suma de grupos (sondas de *Proteobacterias*  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ , y de bacterias Gram positivas altas y bajas en G+C) obtenidos con la técnica de FISH fuera del  $69.3 \pm 3.3$  al  $48.5 \pm 3.9$  % de las bacterias asociadas a larvas desde nauplios a misis, indica que los grupos que estamos estudiando representan una fracción importante del picoplancton. El presente resultado se encuentra dentro de los rangos descritos para numerosos estudios, en los cuales la sonda universal para Eubacterias fue usada y produjo tasas de detección similares o menores para sistemas naturales, tanto marinos como dulceacuícolas (DeLong *et al.*, 1999, Amann *et al.* 1995). De cualquier manera, los altos porcentajes de hibridación en la suma de grupos en los estadios larvarios de nauplio, zoea

y misis, se pueden deber a diferencias en el estado fisiológico, ya que en los primeros estadios larvarios, seguramente las bacterias estudiadas presentaban una mayor actividad metabólica, lo cual se reflejaría en una mayor cantidad de ribosomas, y por lo tanto, en mayor cantidad de RNA para que se hibriden las sondas usadas en la metodología de FISH. Los resultados referentes a disminuciones en el porcentaje de suma de grupos detectados por FISH después del estadio larvario de zoea, concuerdan con lo observado por Yasuda y Kitao (1980), quienes observaron un incremento en las UFC de huevos a misis de *P. japonicus* y su posterior disminución.

#### **VII.2.6.4 Relación de grupos identificados por FISH.**

Las sondas de polinucleótidos diseñadas para identificar bacterias asociadas a larvas de *L. vannamei*, mostraron de manera consistente gran intensidad de señal emitida para los grupos bacterianos que representaron cantidades significativamente grandes de las bacterias detectadas por DAPI en los primeros estadios larvarios. Es importante mencionar que en los estadios larvarios de nauplio, zoea y misis, las bacterias de las subdivisiones  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ , y los subgrupos altas en G+C y bajas en G+C detectadas con la sondas, representaron un gran porcentaje de las bacterias identificadas por DAPI ( $69.34 \pm 9.7$  a  $48.5 \pm 3.8$ ).

Los incrementos o disminuciones de porcentajes de bacterias de nauplio a zoea en las diferentes fechas de muestreo se debieron principalmente a las bacterias Gram positivas altas en G+C y *Proteobacterias*  $\alpha$  y  $\gamma$ . Nuestros resultados sugieren fuertemente que las bacterias que pertenecen a otros grupos filogenéticos que no fueron examinados en este

estudio, no fueron muy importantes en términos numéricos determinados por FISH, al menos durante los primeros estadios larvarios. Los resultados también muestran que la mayoría de las bacterias del picoplancton asociado a cultivos larvarios de *L. vannamei* visualizadas a través de conteos directos por epifluorescencia, se encuentran intactas y con gran cantidad de ribosomas. Con base a lo anterior, se piensa que dichas bacterias son viables y que están en la etapa de crecimiento exponencial (fisiológicamente activas).

La abundancia de *Proteobacterias*  $\gamma$  y bacterias Gram positivas altas y bajas en G+C en los estadios zoea y mysis del laboratorio de producción larvaria estudiado, sugieren que entre los factores que hubieran contribuido con una gran cantidad de estos grupos bacterianos, se encuentran los nauplios de *Artemia* y las microalgas suministradas durante la alimentación, así como también los recambios de agua efectuados. Nuestros resultados concuerdan con los presentados por Abraham y Palaniappan (2004), quienes mencionan que los nauplios de *Artemia* fueron el principal alimento durante los estadios de mysis y postlarva, y que se observaron altos niveles de bacterias luminosas durante dichos estadios. El incremento de los grupos bacterianos mencionados anteriormente puede ser atribuido al hecho de que las larvas de *L. vannamei* están expuestas internamente a comunidades microbianas por primera vez durante la muda de nauplio 5 a zoea 1 (Jones *et al.*, 1997). El incremento en los conteos celulares totales de estos grupos bacterianos, pudo haber sido solo el reflejo del incremento del área superficial específica que se dio por la apertura del tracto intestinal. Por otro lado, es posible que el sistema inmunológico de las larvas comience a jugar un rol importante en la colonización bacteriana, ya sea fomentando el crecimiento de bacterias probióticas como posiblemente son las bacterias

altas en G+C o *Proteobacterias* Gama, o desfavoreciendo el crecimiento de otros grupos bacterianos perjudiciales.

Con excepción del estadio nauplios, las *Proteobacterias*  $\alpha$  y  $\delta$  se identificaron invariablemente como no dominantes en todas las fechas de muestreo y estadios larvarios posteriores; esto se puede atribuir a los tipos de alimento suministrados a estas larvas, la comida que se suministró durante el estadio de zoea en los laboratorios de producción larvaria estudiados fueron nauplios de *Artemia* y microalgas (*Chaetoceros* sp. e *Isochrysis* sp.). La baja prevalencia de *Proteobacterias*  $\alpha$  y  $\delta$  en el estadio larvario de zoea puede indicar que estas microalgas, o las bacterias asociadas a ellas, pudieran ejercer actividad antibacteriana contra las subdivisiones anteriormente mencionadas por efecto de antibióticos naturales secretados por las mismas. Es importante mencionar que en promedio se usaban 1g/m<sup>3</sup> de cloranfenicol en nauplio, 4.5 ml/m<sup>3</sup> de Enroqueen en zoea, o 1.5 g/m<sup>3</sup> de furazolidona en misis (AREMAR, tablas diarias, comunicación personal). Por otro lado, es posible que el sistema inmune de zoeas y misis inhiba el crecimiento de las *Proteobacterias*  $\alpha$  y  $\delta$ . Las observaciones sobre la presencia de *Proteobacterias*  $\alpha$  y  $\delta$  en el estadio nauplio, sugieren que la fuente primaria de estas especies en laboratorios de producción larvaria de *L. vannamei* son las bacterias asociadas al agua o los reproductores en el momento del desove y que las condiciones ambientales al inicio del cultivo son las adecuadas para el crecimiento de estos dos grupos bacterianos.

Los miembros de grupos bacterianos como *Proteobacterias*  $\delta$  y bacterias Gram positivas como bajas en G+C, nunca exhibieron gran abundancia en los cinco estadios larvarios

durante las tres fechas de muestreo. El bajo porcentaje de hibridación de los oligonucleótidos usados con de *Proteobacterias*  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ , y de bacterias Gram positivas altas y bajas en G+C en las postlarvas 1 y 16 de *L. vannamei*, nos lleva a la conclusión de que existió dominancia de otros grupos bacterianos como cianobacterias, Arquea u otros durante dichos estadios. Descartamos la posibilidad de que las sondas no hibridaron de manera adecuada por factores inherentes a la metodología de FISH, porque se ha comprobado su eficiencia en trabajos previos (Hernández, 2000; Padilla, 2005).

### **VII.3 Aislamiento y purificación de DNA.**

#### **VII.3.1 Lisis de tejido, extracción y precipitación del DNA.**

La proporción de absorbancia de las longitudes de onda 260/280 del DNA extraído de larvas de *L. vannamei* no fue buena, esto nos indica que es posible mejorar las condiciones de aislamiento y purificación del mismo.

El ligero barrido a lo largo del carril puede ser indicio de degradación de DNA o de presencia de RNA, en este caso se piensa que dicho barrido corresponde a degradación de DNA porque aun después de tratar nuevamente con RNAsa el DNA obtenido, se mantenía la presencia del mismo.

### **VII.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa**

Probablemente la degradación parcial de DNA observada en las muestras de larvas de *L. vannamei* haya influido en la ausencia de amplificación por PCR de los segmentos correspondientes al 16S de *Proteobacterias*  $\alpha$  y  $\delta$  en todos los estadios larvarios; y los

segmentos correspondientes al rDNA16S de *Proteobacterias*  $\gamma$  y de bacterias Gram positivas altas y bajas en G+C en P11 y P1 16.

Es posible que algunos compuestos pertenecientes a un pigmento naranja liberado en las muestras almacenadas por un mes, pudieran haber persistido durante la extracción de DNA e interferido en la amplificación de los oligonucleótidos correspondientes a los grupos estudiados en el presente trabajo, pero no se tiene información suficiente para asegurarlo.

También es probable que el DNA de las muestras almacenadas en el presente trabajo se digirió debido a que la proporción enzimas/peso de camarones sea mayor en las larvas en comparación con los organismos adultos, o a que se tenga una mayor cantidad de enzimas degradadoras de DNA en larvas en comparación con adultos de *L. vannamei*. Lo que si es seguro, es que el almacenar a los animales a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  en vez de etanol absoluto, genera DNA de mayor calidad, el cual es posible de ser amplificado.

Por lo tanto, para obtener una mejor calidad de DNA, se recomienda fijar los organismos en nitrógeno líquido y almacenarlos a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Padilla, 2005), o, extraer el DNA inmediatamente después de fijar las muestras con etanol.

#### **VII.5 Bacterias asociadas a cultivos larvarios de *L. vannamei* y metodologías de FISH y PCR.**

Las enfermedades bacterianas en la fase de crianza de cultivo de camarón se han vuelto uno de los problemas más grandes de la camaronicultura, los laboratorios de producción

larvaria siguen siendo el punto más débil en el ciclo de producción, ya que, en algunos casos, el alimento que se proporciona en los diferentes estadios larvarios genera complicaciones para el cultivo debido a que contiene diferentes comunidades bacterianas que pueden influir de manera desfavorable en el mismo (Aguirre Guzmán y Ascencio Valle, 2000; Aguirre Guzmán *et al.*, 2001; Esteve M. y Herrera F. C. 2000; Abraham y Palaniappan, 2004). De cualquier manera, el alimento vivo sigue siendo la mejor fuente de proteína en los cultivos larvarios de camarón y no será fácilmente reemplazado por alimentos artificiales. Bajo este enfoque, para asegurar el éxito de laboratorios de producción larvaria en la camaronicultura, se necesita estudiar bacterias asociadas a cultivos larvarios saludables, de manera tal que tengamos la capacidad de emular dichas condiciones y controlar de manera eficiente los laboratorios de producción larvaria comerciales.

Las metodologías novedosas de la biología molecular como FISH y PCR son de gran ayuda en el entendimiento de sistemas relativamente complejos, tal es el caso de la estructura e interacción de la población bacteriana de laboratorios de producción larvaria de *L. vannamei*. Se requieren estudios posteriores para investigar la contribución cuantitativa de diferentes grupos filogenéticos en las comunidades bacterianas asociadas al cultivo larvario de *L. vannamei*. El presente estudio reporta la primera identificación bacteriana cuantitativa usando oligonucleótidos grupo específicos con la metodología de FISH en laboratorios de producción larvaria de *L. vannamei*.



## VIII. CONCLUSIONES

El método de conteo de bacterias en campos presenta mayor resolución ( $\alpha = 0.05$ ) en comparación con el método de frecuencia de observación.

Los datos del método de conteos bacterianos mediante DAPI y FISH cuantitativo fueron eficientes para cuantificar la comunidad bacteriana.

Aunque los cultivos larvarios presentan crecimientos bacterianos determinados por DAPI significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ ) en una fecha de muestreo, muestran el mismo comportamiento de crecimiento bacteriano.

El grupo de bacterias altas en G+C presentó la mayor cantidad de bacterias observadas ( $\alpha = 0.05$ ).

Tanto en frecuencia de porcentaje como en conteo de bacterias, se observa una mayor cantidad ( $\alpha = 0.05$ ) de bacterias altas en G+C y *Proteobacterias* Gama.

Las *Proteobacterias* Alfas y Deltas son más abundantes ( $\alpha = 0.05$ ) en el estadio larvario de nauplio que en estadios subsecuentes.

Las bacterias Gram positivas bajas en G+C se encuentran en mayor cantidad ( $\alpha = 0.05$ ) en el estadio de Zoea en comparación a otros estadios.

El porcentaje de la suma de los grupos estudiados con respecto al total de bacterias determinadas por DAPI disminuye ( $\alpha = 0.05$ ) a lo largo del cultivo larvario.

Las cianobacterias incrementan conforme madura el cultivo ( $\alpha = 0.05$ ).

Es posible comprobar por 16S PCR los grupos de bacterias asociadas a cultivo larvario de *L. vannamei* numéricamente más representativos encontrados por FISH.

## IX. PERSPECTIVAS

Clonar los productos amplificados del rDNA 16S PCR de bacterianas asociadas a cultivos larvarios de *L. vannamei*, para generar bibliotecas genómicas de los grupos bacterianos estudiados e identificar géneros y especies de bacterias pertenecientes a dichos grupos.

Elaborar experimento de cultivo larvario de *L. vannamei* en donde no se apliquen antibióticos, y estudiar la comunidad bacteriana para determinar el efecto que tuvieron los antibióticos en el desarrollo de la misma.

Identificación, aislamiento y exposición de primeros estadios larvarios de *L. vannamei* a especies de bacterias pertenecientes al subgrupo altas en G+C por inmersión o adición al alimento, para determinar su posible actividad como probióticos.

Aislar e identificar cianobacterias predominantes asociadas al cultivo larvario de *L. vannamei*, para posteriormente exponerlas a primeros estadios larvarios y estudiar la tasa de supervivencia de las larvas y el efecto en la comunidad bacteriana asociada al cultivo larvario.

## X. REFERENCIAS

- Abraham, T. J. y Palaniappan, R. 2004. Distribution of luminous bacteria in semi-intensive penaeid shrimp hatcheries of Tamil Nadu, India. *Aquac.* 232: 81–90 p.
- Aguirre Guzmán, G. y Ascencio Valle, F. 2000. Infectious disease in shrimp species with aquaculture Potential. *Resent Res. Devl. Microbiol.* 4: 333-348 p.
- Aguirre Guzmán G, Vázquez Juárez R. y Ascencio Valle, F. 2001. Differences in the susceptibility of american white shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* species. *J Inv Phat.* 78: 215-219 p.
- Alsina M y Blanch, A.R. 1994. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J Appl Bacteriol.* 76: 79–85 p.
- Amann, R. I., Ludwig, W., y Schleifer, K. H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143–169 p.
- Bechteler, C. y Holler, D. 1995. Preliminary studies of the immunization of shrimp (*Penaeus monodon*) against *Vibrio* infections. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 108(12): 462-5 p.
- Bohnel H., Lohavanijaya P., Rungin S., Schnug C. y Seifert H.S. 1999. Active immunisation of black tiger prawn (*Penaeus monodon*) against vibriosis in Thailand. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 112(8): 289-95 p.
- Braun, E., Danielsen, S. y Nierzwichi, S. 1992. Development of a rapid method for detecting bacterial cells *in situ* using 16S rRNA-Targeted probes. *Biotechniques* 13 (6): 928-933 p.
- Chynthanya, R., Karunasagar, Indrani y Karunassagar, Iddya. 2002. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquac.* 208: 1-10 p.

Dalmin, G., Kathiresan, K. y Purushothaman, A. 2001. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian J Exp Biol.* 39(9): 939-42 p.

Dang, H. y Lovell, C. R. 2002. Numerical Dominance and Phylotype Diversity of Marine *Rhodobacter* Species during Early Colonization of Submerged Surfaces in Coastal Marine Waters as Determined by 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis and Fluorescence In Situ Hybridization *Apl Env Microbiol.* 496–504 p.

Daniel, W. W. 1999. Bioestadística, bases para el análisis de las ciencias de la salud. Noriega editores. Quinta reimpresión. Tercera edición. 878 pp.

Daniels, H.V. 1993. Disease control in shrimp ponds and hatcheries in Ecuador. *Associação Brasileira de Aquicultura. IV simposio brasileiro sobre cultivo de camarao, 22–27 November, Brasil.* 175–184 p.

DeLong, E. F., Trent-Taylor, L., Marsh, T. L., y Preston, C. M. (1999). Visualization and Enumeration of Marine Planktonic Archea and Bacteria by using Polyribonucleotide Probes and Fluorescent *in situ* Hybridization. *Appl and enviro Microbiol.* 5554-5563 p.

Esteve, M. y Herrera, F. C. 2000. Hepatopancreatic Alterations in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1939) (Crustacea: Decapoda: Penaeidae) Experimentally Infected with a *Vibrio alginolyticus* Strain *J Invert Path.* 76: 1–5 p.

Frisher, M., Floriani, P., and Nierzwicki A. 1996. Differential sensitivity of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes used for fluorescent in-situ hybridization is a result of ribosomal higher order structure. *Can. J. Microbiol.* 64: (9) 336-334 p.

Gil-Turnes, M. S, Hay, M. E. y Fenical, W. 1989. Symbiotic marine bacteria chemically defend crustacean embryos from a pathogenic fungus. *Science.* 246(4926):116-8 p.

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

Gómez-Gil B., Roque, A. y Velasco-Blanco, G. 2002. Culture of *Vibrio alginolyticus* C7b, a potential probiotic bacterium, with the microalga *Chaetoceros muelleri*. *Aquac.* 211: 43-48 p.

- Hernández, Z. G., 2000. Estandarización de las metodologías de FISH y PCR y su uso en la identificación filogenética de comunidades bacterianas en ostiones (*Crassostrea gigas*). Tesis de Maestría. CICESE. 81 pp.
- Hernández, G. y J. Olmos. 2004. Molecular identification of pathogenic and nonpathogenic strains of *Vibrio harveyi* using PCR and RAPD. *Appl Microbiol Biotechnol.* 63: 722–727 p.
- Jones, D. A., Yule, A. B. y Holland, D. L., 1997. Larval nutrition. En: L.R.D'Abramo, D.E.Conclin & D.M.Akiyama (eds.) *Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture*. World Aquaculture Society. Baton Rouge Press, 328-363 pp.
- Korber, D. R., Lawrence J. R., Hendry, M. J. y Caldwell D. E. 1993. Analysis of spatial variability within mot and mot *Pseudomonas fluorescens* biofilms using representative elements. *Biofouling.* 7:339–358 p.
- Lau, W. W., Jumars, P. A. y Armbrust, E. V. 2002. Genetic diversity of attached bacteria in the hindgut of the deposit-feeding shrimp *Neotrypaea* (formerly *Callinassa*) *californiensis* (decapoda: thalassinidae). *Microb Ecol.* 43(4): 455-66 p.
- Lightner, D.V. 1993. Diseases of cultured penaeid shrimp. En: McVey, J.P. (ed.), *CRC Handbook of Mariculture*, 2nd ed. *Crustacean Aquaculture*, vol. 1. CRC Press, Boca Raton, FL, 393– 486 pp.
- Lindqvist R. 1999. Detection of *Shigella* spp. in food with a nested PCR method-sensitivity and performance compared with a conventional culture method. *J Appl Microbiol.* 86(6): 971-8 p.
- López Torres, M. A., Murguía, L. A. y Pérez, A. L. A. 2000. Concentración de Bacterias Crecidas en el Medio TCBS Durante el Cultivo Larvario de Camarones Peneidos. *Biociencia. Revista de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad de Sonora.* 2 (1): 19-24 p.
- Montgomery, D. C. 1991. *Diseño y Análisis de Experimentos*, 3a. ed. Editorial Iberoamérica, México, D. F. 495 pp.
- Padilla S. 2005. Caracterización de la Comunidad Bacteriana Presente en Cultivo de Camarón *L. vannamei*, Utilizando Hibridación *In Situ* Fluorescente (FISH) y PCR. Tesis de Maestría. CICESE. 73 pp.

- Robertson, P. A. W., Xu, H. S. y Austin, B. 1998. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Vibrio harveyi* in penaeid shrimp and water. *J Microbiol Meth.* 34: 31-39 p.
- Sambrook, J. E. F., Fritsch y Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Second edition. Cool Spring Harbor Laboratory Press. Tomo III, New York, USA. 723 pp.
- Soto, R. S., Roque, A., Lizarraga, P. L., Guerra, F. L. y Gomez, G. B. 2003. Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana* nauplii. *Dis Aquat Org.* 53: 231–240 p.
- Sudheesh, P. S., Kong, J. y Huai-Shu, X. 2002. Random amplified polymorphic DNA-PCR typing of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* isolated from cultured shrimps. *Aquac.* 207: 11-17 p.
- Vandenberghe, J., Li, Y., Verdonck, L., Li, J., Sorgeloos, P., Xu, H. S. y Swings, J. 1998. Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. *Aquac.* 169: 121-132 p.
- Vandenberghe, J., Verdonck, L., Robles-Arozarena, R., Rivera, G., Bolland, A., Balladares, M., Gómez-Gil, B., Calderon, J., Sorgeloos, P. y Swings, J. 1999. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Appl Environ Microbiol.* 65(6): 2592-7 p.
- Vaseeharan, B. and Ramasamy, P. 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Lett Appl Microbiol.* 36(2): 83-7 p.
- West, P. A. y Colwell, R. R. 1984. Identification and classification of Vibrionaceae an overview. En: Colwell RR(ed), *Vibrios in the environment.* Wiley, New York, NY, 285–363 p.
- Wilkenfeld, J.S. 1992. Commercial hatchery status report: an industry panel viewpoint. En: Wyban, J. Ed. *Proceedings of the special session on shrimp farming.* April, Los Angeles, World Aquac Soc, Baton Rouge, 71–86 pp.

Wyban, J.A. y Sweeney, J.N. 1991. Intensive Shrimp Production Technology. The Oceanic Institute, Honolulu, 158 pp.

Yasuda, K. y Kitao T. 1980. Bacterial flora in the digestive tract on prawns, *Penaeus japonicus* Bate. Aquac. 19: 229-234 p.