

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS DE AMBIENTES NATIVOS Y SU APLICACIÓN BIORREMEDIADORA EN EL CULTIVO DEL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus Vannamei*

Isolation and Identification of Bacterial Strains native bioremediation Environments and their Application in the Cultivation of Litopenaeus Vannamei White Shrimp.

Milviana Maldonado Bassantes¹, Roberto Retamales Gonzalez² *

Recibido el 15 de mayo de 2012; recibido en forma revisada 18 de octubre 2012, aceptado 5 de noviembre 2012

Resumen

En el presente trabajo tuvo como objetivo aislar e identificar bacterias con potencial biorremediadora a partir del suelo de dos piscinas de la Camaronera A en la Provincia del El Oro. Catorce morfotipos de bacterias fueron identificadas por técnica bioquímica.

La capacidad biorremediadora de los siete morfotipos en el cultivo de camarón en las piscinas pruebas fue evaluada con la aplicación de dos probióticos elaborados con las bacterias BSM1 (*Bacillus sp*), BSM2 (*Bacillus sp*), BSM3 (*Pseudomonas sp*), BSM7 (*Lactobacillus plantarum*), BMS8 (*Pseudomonas sp*), BMS10 (*Lactobacillus plantarum*), BMS11 (*Bacillus sp*) y la levadura (*Sacharomyces serevisae*). Los resultados obtenidos mostraron que la biorremediación del suelo, agua y camarón de las piscinas pruebas de las Camaroneras Uno y Dos en la primera producción fue igual que las piscinas control, en la segunda y tercera producción fueron superiores. La presencia de bacterias patógenas, no se evidenció en ninguno de los controles realizados en las piscinas en estudio. La aplicación de los probióticos nativos influyó positivamente sobre el incremento de supervivencia, ganancia de peso, conversión alimentaria y libras de camarón por hectárea a cosecha, que mostró diferencias estadísticas significativas para los días de evaluación que duró la investigación.

Palabras Clave: probióticos; BSM; camarón

Abstract

This study aimed to isolate and identify potential bacteria from soil bioremediadora two Shrimp pools A in the Province of El Oro.

Bioremediadora capacity of seven morphotypes in shrimp farming in the pools was evaluated by testing the application of two probiotic bacteria made with BSM1 (*Bacillus sp*), BSM2 (*Bacillus sp*), BSM3 (*Pseudomonas sp*), BSM7 (*Lactobacillus plantarum*), BMS8 (*Pseudomonas sp*), BMS10 (*Lactobacillus plantarum*), BMS11 (*Bacillus sp*) and yeast (*Sacharomyces serevisae*). The results showed that the bioremediation of soil, water and shrimp pools testing of Shrimp pools One and Two in the first production was the same as the pools control, in the second and third production were higher. The presence of pathogenic bacteria, there was no evidence in any of the controls in the study pools. The application of probiotics native positively influenced the increase in survival, weight gain, feed conversion and shrimp pounds per acre at harvest, which showed statistically significant differences for the days of evaluation period of the investigation.

Key words: Probiotics; BSM; shrimp

¹ Bióloga, Tesis de Grado para la obtención del Título de Magíster en Ciencias con Énfasis en Manejo Sustentable de Recursos Bioacuáticos y el Medio Ambiente – Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Naturales – sede Mapasingue.

² Doctor of Philosophy, Licenciado en Ciencias con Mención en Biología, Director Instituto de Investigaciones Científicas Desarrollo y Transferencia Tecnológica, Universidad Técnica de Manabí.

* rretamales@utm.edu.ec

1. Introducción

La acuicultura ha sido identificada como una actividad productiva de gran importancia para el desarrollo de amplias zonas rurales del Ecuador y de Latinoamérica.

Ecuador está situado en la costa del Pacífico, al noroeste de Sudamérica, ocupa las posiciones de latitud y longitud del 2 ° S y 77 ° 30 ° W. . Tiene una superficie de 256.370 km² y cuenta con un perfil costanero irregular que posee numerosas entrantes y salientes, comprende aproximadamente unos 2.860 Km. de Norte a Sur, con una extensión de 205.000 hectáreas de manglar, convirtiéndolo en un país con un alto potencial acuícola. (FAO, 2005).

En el litoral ecuatoriano se asientan alrededor de 3295 predios que en conjunto suman un total de 202.382,15 has, destinados al cultivo de camarón. (Subsecretaria de acuicultura/SIG-ACUA.2008).

La evolución en las exportaciones de camarón tiene una tendencia ascendente desde el año 2003, aunque en el año 2009, debido a la recesión económica mundial, presenta una caída (-6,8%). Es interesante también observar que en el período 2003-2010, las exportaciones de camarón crecen un 284,2% al pasar de 298,9 millones de dólares en exportaciones FOB a 849,7 millones de dólares. (Varela. 2011). Esto muestra el dinamismo que ha tenido el sector, lo que representa un proceso productivo que cubre las expectativas del mercado externo. Hay que recordar que este sector está desarrollado y encaminado para el sector externo. La participación de las exportaciones de camarón sobre el total de las exportaciones ecuatorianas representa al año el 4,9%, una tendencia que se ha mantenido en los últimos años. La participación sobre el total de productos primarios también representa una tendencia que bordea el 6% en todos los años analizados, constituyéndose en uno de los principales productos tradicionales de exportación del Ecuador, al año 2010 representa el 22,9% del total de productos tradicionales. (Varela. 2011).

El riesgo de las enfermedades aumenta, a menudo, en cultivos semi-intensivos e intensivos y cuando un monocultivo es reemplazado por un

policultivo. La escasez de agua limpia y la insuficiente remoción de desechos conducen a la sobrecarga en metabolitos, a la degradación ambiental, por lo cual el camarón es estresado por la mala calidad de agua y es susceptible a las enfermedades. Las fluctuaciones excesivas de los factores abióticos tales como el oxígeno, salinidad y temperatura pueden también aumentar el estrés y la sensibilidad a enfermedades favoreciendo la diseminación de los patógenos. A parte de los factores mencionados anteriormente, que son todos dependientes del cultivo mismo, las contaminaciones por pesticidas y contaminantes provenientes de la agricultura y de actividades industriales, pueden bajar la resistencia a enfermedades del camarón, especialmente cuando son combinados con otros factores ambientales (FAO.2005).

El beneficio potencial de probióticos en acuicultura en piscinas incluye el incremento en la descomposición de materia orgánica, reducción en la concentración de nitrógeno y fósforo control de amonio, nitrito, y sulfatos, bajo incidencia de enfermedades y alta sobrevivencia, incrementado la producción de peces y camarones. (Boyd & Massaaut, 1999).

La identificación de microorganismos depende de la obtención de cultivos puros mediante la utilización de técnicas de aislamiento y purificación. Desgraciadamente, el organismo mejor adaptado en los cultivos de laboratorio a menudo es solo un componente minoritario del ecosistema microbiano. (Amann., 2005), se estima que en la mayoría de los casos solo se cultiva un 1% del total de los organismos unicelulares de un sistema.

Este proyecto de tesis persigue desde una perspectiva ecológica buscar una solución frente a ciertos patógenos o disminuir las ocurrencias más comunes de enfermedades mediante la utilización de bacterias propias de su campo de acción.

Justificación

El uso indiscriminado de antibióticos y otros químicos, en el cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei*, provocaron el desequilibrio del ecosistema, para restablecer dicho equilibrio los

productores camaroneros, implementaron sistemas de control y manejo para incrementar la producción. Se plantearon varias alternativas como medidas de prevención, la utilización de probióticos importados, los mismos que no garantizan una producción sostenible, debido a que son microorganismos introducidos, llegando estos a desplazar la flora bacteriana nativa, de ahí la necesidad de poder obtener probióticos de ambientes nativos.

Hipótesis

Las cepas bacterianas de ambientes nativos como probióticos tienen acción biorremediadora en el cultivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Objetivo general

1. Demostrar la acción biorremediadora de probióticos de cepas bacterianas nativas en cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Objetivo específicos

1. Aislar cepas de bacterias nativas del suelo de las piscinas del cultivo de camarón, de la Camaronera Uno.
2. Identificar las bacterias aisladas del suelo de la Camaronera Uno, que puedan presentar una actividad biorremediadora en el cultivo de camarón.
3. Elaborar un probiótico de bacterias de cepas nativas y aplicarlo en las piscinas de prueba.

2. Materiales y Métodos

Área de estudio

El presente trabajo se desarrolló en las camaroneras, Uno (longitud: 598911.7 y latitud: 9629521.0) y Dos (longitud: 598404.25 y latitud: 9629662.0) de la compañía Corporeal ubicadas en el sector Pongal estero el Venado jurisdicción del cantón Santa Rosa provincia del El Oro.

El área de estudio estuvo sectorizada en la Camaronera Uno de la siguiente manera: (Tabla.1)

Tabla 1. Codificación de las piscinas de estudio de la Camaronera Uno.

Piscina	No. Ps.	Hectáreas	Utilización
A	12	4,32	Prueba
B	14	5,86	Prueba
C	7	6,6	Control
D	13	7,61	Control



Figura 1. Ubicación Camaronera Uno

Tabla 2. Codificación de las piscinas de estudio de Camaronera Dos.

Piscina	No. Ps.	Hectáreas	Utilización
E	5	2,1	Prueba
F	7	1,7	Prueba
G	2	2,7	Control
H	6	6,5	Control



Figura 2. Ubicación Camaronera Dos

Aislar cepas de bacterias nativas del suelo de las piscinas del cultivo de camarón, de la Camaronera Uno

Toma de muestras

Las muestras tomadas para el aislamiento e identificación se tomaron del suelo húmedo de las piscinas A y B, posterior a la cosecha. Una vez vacías, fueron divididas en 5 cuadrantes de los cuales se tomó el equivalente a una libra de suelo por cada cuadrante, estas se las mezcla entre sí y se obtuvo una muestra (pool) que se colocó en una funda plástica y se guardó en una hielera con su respectivo refrigerante para luego ser trasladada al laboratorio y allí procesada. De esta muestra se tomó 10g de suelo y de forma aséptica se resuspendió en 90 ml de solución salina ajustada la salinidad a 2 % pues con esta se equiparaba a la correspondiente salinidad de la piscina, (20 ups). Se homogenizó vigorosamente, luego se realizaron diluciones de la muestra en cuatro tubos de ensayos con capacidad para 12 ml y en cada uno se colocó 9 ml de solución salina al 2 % de salinidad y 1 ml de la muestra inicial y se realizaron diluciones seriadas 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³.

Medios de cultivo utilizados

Agar nutritivo

Medio de cultivo para el crecimiento general de las bacterias. La esterilización del medio de cultivo se llevó a cabo en autoclave a 120 °C, 15 lb de presión durante 20 min. Las muestras se sembraron por estría cruzada 50 µl, en el medio Agar Nutritivo (DIFCO) ajustado la salinidad al 2 % pues la correspondiente a salinidad de la piscina era de 20 ups.

El medio de cultivo sólido Agar Nutritivo con sal (NAcs), se preparó de la siguiente manera: se agregaron 2,3 g de medio Agar Nutritivo (NA) en 100 ml de agua destilada,

2 g de cloruro de sodio, se calentó agitando frecuentemente y se hirvió por un minuto para disolver completamente y se esterilizó en una autoclave (SPEEDY vertical type); el pH final fue de 6,8 ± 0,2 a 25 °C vertido en placas Petri desechables 10 ml del medio en cada una y se almacenó a 2 – 8 °C hasta su uso.

Composición agar nutritivo.- Es un medio general que permite el crecimiento de distintas especies bacterianas. (Tabla.3)

Tabla 3.Composición de Agar Nutritivo.

Formula aproximada	g/L
Extracto de carne	3,0
Peptona de carne	5,0
Agar	15,0
Agua destilada c.s.p	1,0 L

Agar GSP (Glutamato rojo fenol y almidón).

Medio de cultivo para el crecimiento de las bacterias tales como Pseudomonas y Aeromonas. La esterilización del medio de cultivo se llevó a cabo en autoclave a 120 °C, 15 lb de presión durante 20 min. Se sembraron por estría cruzada 50 µl de muestra en el medio Agar GSP (IMERIA) ajustado la salinidad al 2 % pues la correspondiente a salinidad de la piscina era de 20 ups.

El medio de cultivo sólido, se preparó de la siguiente manera: se agregaron 4,5 g de medio Glutamato rojo fenol y almidón (GSP) en 100 ml de agua destilada, 2 g de cloruro de sodio, se calentó agitando frecuentemente y se hirvió por un minuto para disolver completamente se esterilizó en una autoclave (SPEEDY vertical type); el pH final fue de 6,8 ± 0,2 a 25 °C vertido en placas Petri desechables 10 ml del medio en cada una y se almacenó a 2 – 8 °C hasta su uso. (Tabla.4)

Composición Agar GSP.- Es un medio que mantiene especificidad para bacterias de género como Pseudomonas y Aeromonas.

Tabla 4. Composición de Agar GSP.

Formula aproximada	g/L
Glutamato sódico	10,0
Almidón hidrosoluble	20,0
Dihidrogenofosfato potásico	2,0
Sulfato de magnesio	0,5
Rojo fenol	0.36
Agar	12,0
Agua destilada	1,0 L

Agar MRS (Man Rugosa Shamr)

Medio de cultivo para el crecimiento de bacterias de géneros tales como Bacillus y Lactobacillus. La esterilización del medio de cultivo se llevó a cabo en autoclave a 120 °C, 15 lb de presión durante 20 min. Las muestras se sembraron por estría cruzada 50 µl en el medio Agar MRS (Man

Rugosa Shamr) ajustado la salinidad al 2 % pues la correspondiente a salinidad de la piscina era de 20 ups.

Agar TCBS (Tiosulfato Citrato de Sales Biliares).

Medio de cultivo para el crecimiento de bacterias tales como Vibrios. Se sembraron por estría cruzada 50 µl de muestra en el medio Agar TCBS (IMERIA) ajustando la salinidad al 2 % pues la correspondiente a salinidad de la piscina era de 20 ups.

Agar PDA (Potato Dextrosa Agar).

Medio de cultivo en el cual crecen levaduras y hongos. La esterilización del medio de cultivo se llevó a cabo en autoclave a 120 °C, 15 lb de presión durante 20 min. Las muestras se sembraron por estría cruzada 50 µl en el medio Agar PDA (IMERIA) ajustando la salinidad al 2 %.

Siembra de muestras de suelo

Se sembraron por estría cruzada en Agar Nutritivo, la muestra de suelo en suspensión y de cada una de las diluciones seriadas se inocularon 50 µl esparciéndose con una varilla de vidrio estéril. Las cajas se cerraron con parafilm y fueron incubadas a 30 °C hasta observar crecimiento (24 - 48 horas).

Diferenciación de grupos bacterianos

Las bacterias en estudio se diferenciaron mediante la utilización de la Tinción de Gram, por medio de ésta se puede separar dos grandes grupos como son Gram positivas y Gram negativas.

Purificación de cepas bacterianas

Aislamiento de cultivos

Para obtener cultivos puros es necesario aplicar técnicas que ayuden a desenmarañar las poblaciones mixtas y complejas de microorganismos, o cultivos mixtos, y obtener cultivos puros de especies distintas y separadas.

Existe gran variedad de técnicas por medio de las cuales las diferentes especies en una muestra

natural pueden ser aisladas y desarrollarse como cultivo puro.

Las población de bacterias en estudio fueron seleccionadas a partir del Agar Nutritivo el cual fue seleccionado por no presentar especificidad para grupos bacterianos, ya que es un medio muy general brindando la facilidad de que crezcan variados microorganismos.

Purificación de las bacterias

Para la purificación de estas cepas bacterianas se utilizó Agar TSA (Trypticase Soja Agar), se empleó la técnica de rayado por agotamiento para las catorce colonias de bacterias seleccionadas. Se realizó hasta siete purificaciones hasta obtener la cepa pura.

Con el asa de platino previamente flameada se tomó una parte de la colonia de bacteria seleccionada y se sembró en la caja que contenía el medio TSA, se incubó a 28 °C por 12 horas.

Identificar bacterias aisladas del suelo de la Camaronera Uno, que puedan presentar una actividad biorremediadora en el cultivo de camarón.

Pruebas convencionales

Estas pruebas se desarrollan como un preámbulo a la identificación y que sirven para llegar a un resultado final con mayor precisión.

Motilidad

Se necesitó conocer si las bacterias en estudio presentaban algún tipo de movimiento, pues al desarrollar esta prueba se las ubica como pertenecientes a un grupo determinado.

Prueba de catalasa

Algunas bacterias contienen la enzima catalasa que interviene en la descomposición del peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Esta actividad es puesta en evidencia cuando se mezcla una colonia bacteriana con una gota de peróxido de hidrógeno y la producción subsecuente de burbujas (O₂).

Prueba de oxidasa

Con esta prueba se detecta la presencia de la enzima citocromo- oxidasa y puede ser fácilmente realizada mediante el uso de un papel impregnado con el reactivo tetrametil-p-fenilen diamina HCl al 1 % en solución acuosa.

Rojo metilo

Esta prueba se la realiza con la finalidad de comprobar si el microorganismo en estudio fermenta la glucosa con producción de ácidos (succínico, láctico, acético) o vía ácido mixta. Además para saber si efectivamente están dentro del grupo de los bacilos.

Pruebas en medios específicos para gram positivos y gram negativos

Cada una de las cepas seleccionadas fue sembrada en medios específicos: Man Rugosa Shamr (MRS) como un medio específico para el crecimiento de bacterias del grupo de los Bacillus y Lactobacillus.

Identificación Bioquímica

Se utilizó un sistema de identificación bioquímica miniaturizado que emplea microplacas de 96 pocillos con un número de 18 diferentes sustratos de carbono y aminoácidos de diferentes clases, para una mejor discriminación. La capacidad de un aislado de metabolizar cada sustrato se mide por la presencia o ausencia de un cambio de coloración, técnica proporcionada por la Empresa Carrera Internacional, Concepto Azul Guayaquil.

Crecimiento bacteriano

Esta prueba se realizó con el objetivo de determinar el tiempo idóneo en el que las cepas alcanzaban cada una de las fases del crecimiento bacteriano.

Mantenimiento de cepas seleccionadas (crio preservación)

Debido a que la actividad metabólica de una célula se reduce considerablemente por mantenimiento a muy baja temperatura, la congelación es una técnica de elección, ya sea para cortos o largos períodos.

Cada una de las cepas se incubaron por 8 horas en agar nutritivo; luego con el asa de platino se tomaron varias cepas y se las resuspendió en un tubo ependorf de 1,5 ml con glicerol al 10 %, esto se trabajó utilizando un refrigerante, a continuación se procedió a guardar los tubos en un congelador a -70°C.

Crecimiento de cepas seleccionadas

Se procedió a realizar varias pruebas buscando un medio de cultivo que ayude a mantener las cepas en estudio en buenas condiciones. Para el efecto se probó 3 medios de igual contenido pero diferentes cantidades. Las catorce cepas fueron sembradas de forma individual en los medios, para lo cual se tomaron varias fiolas que contenían los medios y se inoculó las cepas, se taparon con parafilum y se dejó a temperatura ambiente por tres semanas. El crecimiento de cada una de estas cepas se cuantificó en cámara Neubauer.

Análisis estadístico

Diversas variables fueron analizadas al final de cada corrida en las piscinas de prueba y control, tales como:

1. Supervivencia del camarón (%).
2. Peso promedio final camarón (g).
3. Tasa de crecimiento instantánea
4. Libras de camarón cosechadas por hectárea (lb/ha).
5. Factor de conversión alimentaria (lb balanceado consumido/lb de camarón obtenida a la cosecha hectáreas).

Para determinar si existían diferencias significativas en las variables determinadas entre las piscinas de prueba y de control se utilizó el análisis estadístico, T de Student y Análisis de varianza (ANOVA) mediante el programa QED STATISTICS. Se utilizó un diseño estadístico completamente aleatorio con dos tratamientos, tres repeticiones con cada probiótico y dos pruebas de comparación que fueron los controles.

Para el análisis de varianza la supervivencia se transformó en arco seno, la tasa de crecimiento se convirtió en logaritmo natural para calcular la tasa instantánea de crecimiento (fórmula), y para el

cálculo de factor de conversión alimenticia se transformó en logaritmo, se utilizó un nivel de significancia 0,5.

3. Resultados

Aislar cepas de bacterias nativas del suelo de las piscinas del cultivo de camarón, de la Camaronera Uno.

Se identificaron catorce cepas bacterianas de los medios de cultivo utilizados, las cuales fueron del género: *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp, *Lactobacillus plantarum* y levadura la *Saccharomyces cerevisiae*.

Identificar las bacterias aisladas del suelo de la Camaronera Uno, que puedan presentar una actividad biorremediadora en el cultivo de camarón.

Denominación de las cepas

Las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* fueron diferentes entre ellas en tamaño y en la asimilación de ciertos carbohidratos por parte de los miembros de este género.

Las bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* fueron diferentes entre ellas en tamaño y en cantidad ufc/g las dos presentaron forma de bastón, BSM10 fue más grande y menos abundante que BSM7.

La forma, tamaño y cantidad de ufc/g fue muy similar entre los tres aislamientos del género *Pseudomonas*. Tanto BSM3 como BSM8 presentaron forma de bastón, más pequeñas y abundantes que la BSM9, las tres asimilaron carbohidratos diferentes.

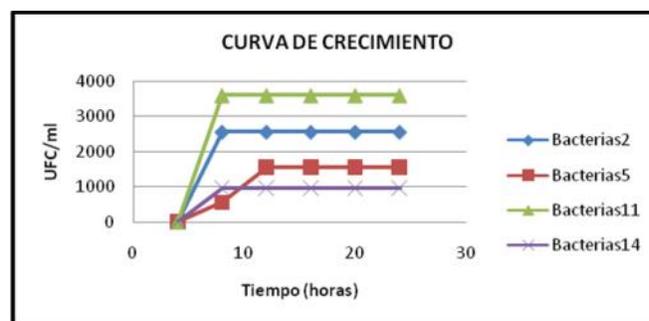
Cada una de las bacterias identificadas presentaron una característica diferente a pesar de que pertenecen al mismo género, la identificación a nivel de especies no se pudo realizar pues se requería de otros criterios de identificación con los cuales no se contaba al momento del desarrollo del trabajo.

Curva de crecimiento

Ciclo de crecimiento de bacterias

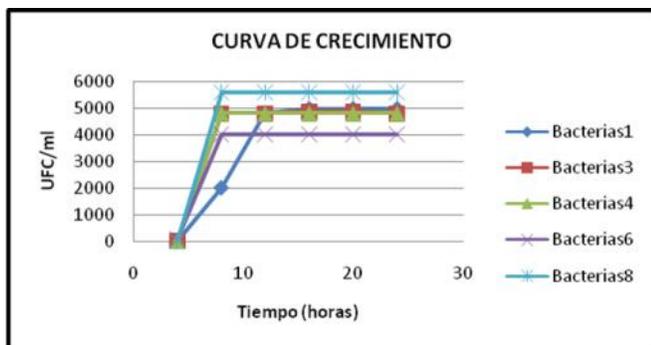
Durante las primeras cuatro horas no hubo un crecimiento de las catorce cepas bacterianas, se presume se encontraban en la fase de adaptación del metabolismo a nuevas condiciones ambientales, pero al cabo de ocho horas se observó que había crecimiento, entrando éstas a su fase exponencial, en esta fase las bacterias crecen con mayor velocidad, ya que es el tiempo de multiplicación y no existe un agotamiento de los nutrientes del medio, seguido de esto se observó que a las doce horas las bacterias BMS 1, BMS 2, BMS 3, BMS 4, BMS 6, BMS 7, BMS 8, BMS 9, BMS 10, BMS 11 y BMS 12, mantenían su ritmo de crecimiento hasta llegar a una fase estacionaria, donde el agotamiento de los nutrientes es evidente, registrándose el mismo número de colonias hasta las 24 horas, tiempo en que duró la prueba.

En el Figura# 3 se observa que la bacteria BSM 11 presentó un mayor crecimiento seguida por la bacteria BMS 2 en relación a las bacterias BSM5 y BSM 14 que su crecimiento fue inferior, las cuatro bacterias mantuvieron su crecimiento hasta las 24 horas.



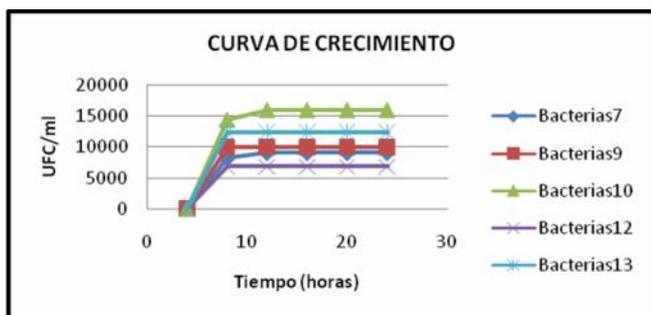
Figura# 3. Curva de crecimiento. De bacterias 2, 5, 11 y 14 vs tiempo (horas).

En el Figura# 4 observamos que las bacterias BSM 1, BSM 3, BSM 4 y BSM 8 presentaron un crecimiento muy similar, mientras que la cepa BSM 6 el crecimiento fue menor.



Figura# 4. Curva de crecimiento. De bacterias 1, 3, 4, 6 y 8 vs tiempo (horas).

En el Figura# 5 se observa que la bacteria BSM 10 a las 15 horas aproximadamente llego a su fase de crecimiento exponencial la cual se mantuvo hasta las 25 horas con un crecimiento alto y con la cepa BSM 13 quien presento un crecimiento aproximadamente a las 8 horas y se mantuvo hasta las 24 horas. Con las bacterias BSM 7, BSM 9 y BSM 12 su crecimiento fue muy parecido manteniéndose hasta las 24 horas.

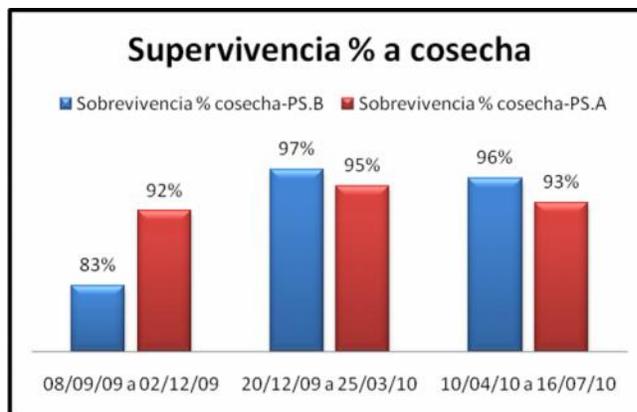


Figura# 5. Curva de crecimiento. De bacterias 7, 9, 10, 12 y 13 vs tiempo (horas)

Determinar si existen diferencias significativas para los siguientes parámetros de:

Supervivencia

La Camaronera Uno en las tres corridas se puede observar que hubo un incremento en la supervivencia en las dos corridas siguientes es decir la mortalidad fue inferior a la primera corrida de la aplicación del probiótico prueba.



Figura# 30. Comparación de la supervivencia de las tres corridas, Camaronera Uno.

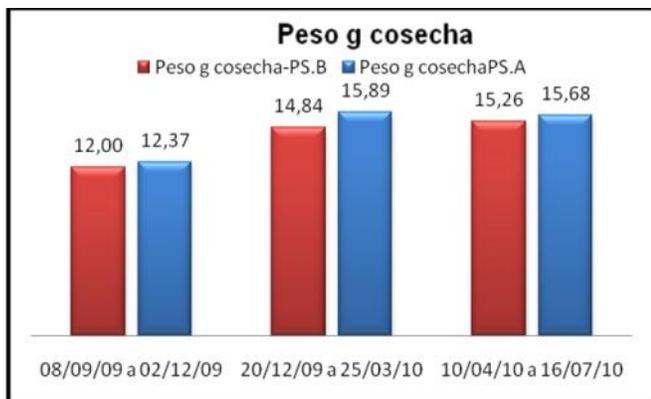
En la Camaronera Dos se puede observar que hubo un incremento en la supervivencia en las dos corridas siguientes, es decir la mortalidad fue inferior a la primera corrida de la aplicación del probiótico prueba.



Figura# 31. Comparación de la supervivencia de las tres corridas Camaronera Dos

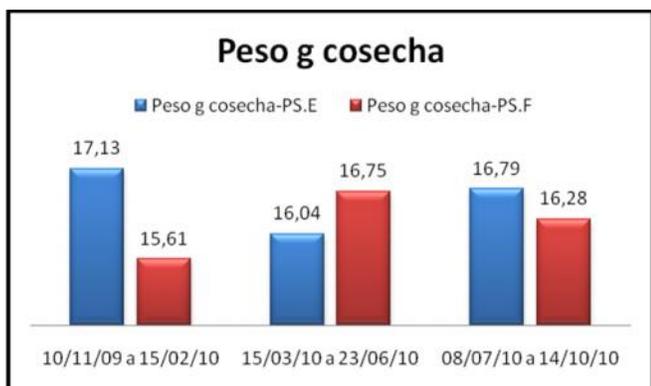
Peso promedio final

En la Camaronera Uno al término de los 90 días de cultivo del camarón los pesos promedios de las piscinas tratadas con probiótico durante las dos corridas siguientes si existió diferencia significativa de la primera corrida que se aplicó el probiótico prueba por primera vez. (Tabla.31)



Figura# 32. Comparación de los pesos promedios Camaronera Uno

En la camaronera Dos al término de los 95 días de cultivo del camarón, los pesos promedios de las piscinas tratadas con probiótico y durante las dos corridas siguientes, si existió diferencia significativa en relación a la primera corrida en que se aplicó el probiótico prueba por primera vez.



Figura# 33. Comparación de los pesos promedios Camaronera Dos

Tasa de crecimiento

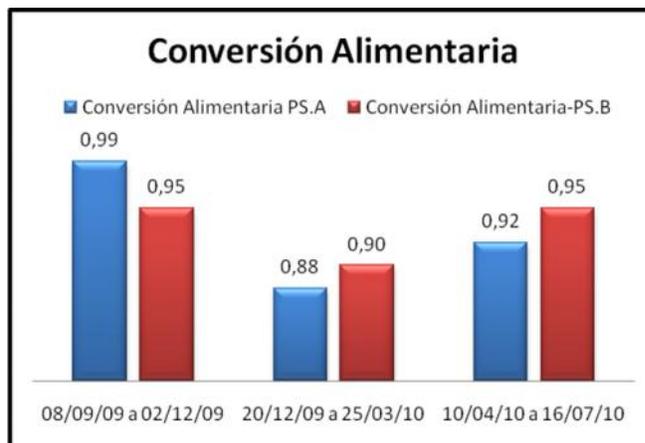
En la Camaronera Uno al cabo de los 89 días de cultivo, la tasa de crecimiento instantánea entre las piscinas de prueba y las piscinas control no hubo una diferencia significativa ($P > 0,05$).

En la Camaronera Dos al cabo de los 90 días de cultivo, la tasa de crecimiento entre las piscinas de pruebas y las piscinas de control no hubo una diferencia significativa ($P > 0,05$).

Conversión alimentaria

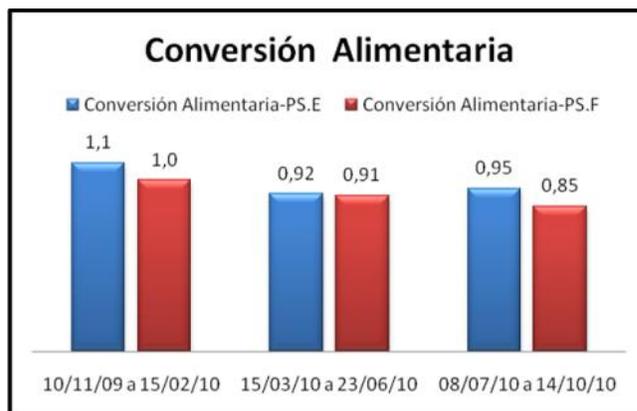
El alimento utilizado en la Camaronera Uno fue por un período de 90 días, tiempo que duró las dos siguientes corridas la cantidad de alimento

suministrado diariamente, se calculó de acuerdo a la biomasa existente en la piscina; En cuanto a la conversión alimentaria las piscinas de prueba de las dos corridas siguientes fueron menor que la primera corrida mostrando diferencias.



Figura# 34. Comparación de la conversión alimentaria Camaronera Uno

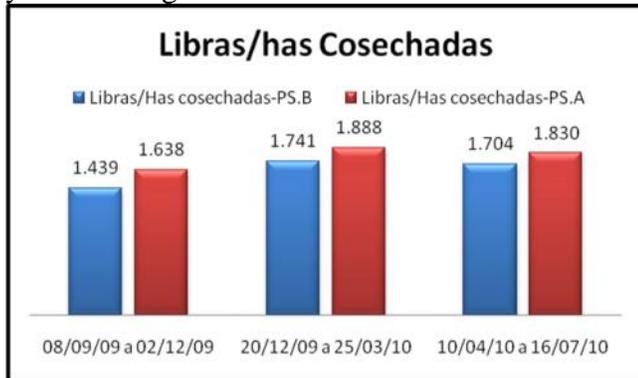
El alimento utilizado en la Camaronera Dos fue por un período de 94 días, tiempo que duró cada una de las dos siguientes corridas, la cantidad de alimento suministrado fue diariamente, se calculó de acuerdo a la biomasa existente en la piscina; En cuanto a la conversión alimentaria las piscinas de prueba de las dos corridas siguientes fueron menor que la primera corrida mostrando diferencias significativas.



Figura# 35: Comparación de la conversión alimentaria Camaronera Dos

Libras de camarón cosechada

En la Camaronera Uno el análisis comparativo se lo realizó con las libras cosechadas de las piscinas prueba de las dos corridas siguientes vs las libras cosechadas en la primera corrida. Si existió diferencia significativa entre la primera corrida y las dos siguientes.



Figura# 36. Comparación de libras/ha a cosecha Camaronera Uno

En la Camaronera Dos el análisis comparativo se lo realizó con las libras cosechadas de las piscinas prueba de las dos corridas siguientes vs las libras cosechadas en la primera corrida. Si existió diferencia significativa entre la primera corrida y las dos siguientes.



Figura# 37. Comparación de libras/ha a cosecha Camaronera Dos

4. Discusión

La mayoría de los intentos para crear probióticos se habían llevado a cabo aislando y seleccionando cepas de ambientes acuáticos. Estos microbios fueron de los géneros *Vibrio*,

Pseudomona, bacterias del ácido lácticas, *Bacillus* y levaduras. Se buscaban tres características principales en los candidatos a mejorar la salud de su huésped: 1) Mostrar antagonismo a patógenos *in vitro*; 2) Su potencial de colonización debía estar documentado y, 3) Que las pruebas realizadas confirmaran que algunas cepas podían aumentar la resistencia a enfermedades de su huésped. (Gastesoupe, 1999). Las cepas bacterianas seleccionadas se aislaron del suelo de piscinas con problema de vibriosis, estas cepas identificadas presentaron antagonismo *in vitro* a *Vibriosis sp.* alto potencial de colonización, desplazamiento del patógeno y también acción biorremediadora, de acuerdo a los resultados obtenidos en los conteos.

Entre los principales géneros de bacterias benéficas se pueden mencionar *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, de entre otras, que actúan beneficiando al organismo en si o a su entorno (calidad de agua). Observaciones obtenidas en experimentos con animales, indican que bacterias probióticas (ácido lácticas) administradas oralmente pueden inducir la resistencia a infecciones entéricas (Holzapfel *et al.*, 1998), de igual manera hay reportes que demuestran que algunos compuestos bacterianos actúan como inmunoestimulantes en peces y crustáceos. Las cepas escogidas para los probióticos nativos como BSM1 (*Bacillus sp.*), BSM3 (*Pseudomonas sp.*), BSM7 (*Lactobacillus plantarum*), BSM2 (*Bacillus sp.*), BSM8 (*Pseudomonas sp.*), BSM10 (*Lactobacillus plantarum*), BSM11 (*Bacillus sp.*) y la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), actuaron beneficiando al camarón, agua y suelo, esto quedo demostrado en cada uno de las variables analizadas a cosecha.

El género *Bacillus* incluye una importante variedad de especies Gram-positivas, no patogénicas, con propiedades antagonistas. Son buenas secretoras de proteínas y metabolitos, fáciles de cultivar y altamente eficientes para el control de plagas y enfermedades (Berg & Hallmann, 2006). Los mecanismos de acción de *Bacillus spp.*, incluyen competencia por espacio y nutrientes (Handelsmann & Stabb 1996), inducción de resistencia (Kloepper & Ryu-M,

2006). El efecto antagónico de las cepas de *Bacillus sp.* en el probiótico nativo quedó evidenciado, pues se llegó a minimizar la presencia de vibriosis durante el cultivo de camarón lo que se observó en los conteos realizados tanto en las muestras de suelo, agua y camarón, lo que demuestra su propiedad antagonista, colonización y prevalencia de la misma en las piscinas prueba.

Las *Pseudomonas* son bacterias Gram negativas, bacilos rectos o ligeramente curvos, no helicoidales, móviles con flagelos polares monotricos y multitricos, no esporulados, citocromo oxidasa positiva, catalasa positivos. La mayor parte de estas especies de *Pseudomonas* oxidan hidratos de carbono, produciendo ácido (color amarillo solo en el tubo de prueba oxidación - fermentación (O-F) expuesto al aire, siendo esta prueba un mecanismo para determinar el metabolismo oxidativo, característica importante de bacterias Gram negativas no fermentadoras (MacFaddin, 2003). Las tres cepas de *Pseudomonas sp.* identificadas presentaron estas características de ser Gram negativas, bacilos, móviles, citocromo oxidasa positiva, catalasa positivos y la oxidación de los hidratos de carbono y su acción probióticas.

Varios estudios han reportado que la tasa de aislamiento del rango de probióticos utilizados va desde 1% al 4% del número total de bacterias buscadas (Pybus *et al.*, 1994; Spanggaard *et al.*, 2001). Con el reconocimiento de un número bajo donde es necesario buscar varios cientos de cepas bacterianas en orden para obtener suficientes números potenciales probióticos para futuros ensayos y registros cortos. De las catorce cepas aisladas del suelo, siete demostraron su potencial probiótico y su acción biorremediadora y las siete restantes quedan por probar en siguientes ensayos. El haber adicionado probióticos de cepas nativas, formulados con *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus sp.* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, al balanceado, en la dieta diaria de los camarones de las piscinas pruebas, tuvieron una diferencia significativa ($P > 0,05$) en la conversión alimentaria (primera corrida fue de $0,97(\pm 0,012)$ b; segunda corrida fue de

$0,89(\pm 0,006)$ c y tercera corrida fue de $0,94(\pm 0,008)$ c en la Camaronera Uno y en la Camaronera dos fue (primera corrida fue de $1,05(\pm 0,02)$ a; segunda corrida fue de $0,91(\pm 0,004)$ b y tercera corrida fue de $0,90(\pm 0,03)$ b). Esto concuerda con Guevara *et al.* (2003) nos indican que en un estudio realizado en Colombia, en el que adicionaron probióticos a base de bacterias como *Bacillus* y *Lactobacillus* y levaduras del género *Saccharomyces*, al alimento para tilapia roja en la fase de levante o engorde, demostraron que existió un efecto positivo, puesto que hubo diferencias significativas ($P < 0,05$).

Los efectos positivos en la aplicación de probióticos en el cuidado de la salud, promueven la conversión alimentaria para producción animal (Pollmann, D. *et al.*, 1980, Sissons, 1989). Lo que se demuestra en los resultados de la supervivencia de las piscinas prueba en las dos corridas siguientes si hubo diferencias significativas ($P > 0,05$), Camaronera Uno, primera corrida $88(0,09)$ b segunda corrida $96(0,03)$ c tercera corrida $95(0,05)$ c. Camaronera Dos, primera corrida $63(\pm 0,27)$ a segunda corrida $74(\pm 0,17)$ b tercera corrida $80(\pm 0,22)$ b.

4. Conclusiones

1. La aplicación de pruebas bioquímicas permitieron la caracterización de cepas bacterianas cuyas características permiten aplicarlas como probiótico en el cultivo de camarón.
2. Las probióticos de bacterias nativas del cultivo de camarón inhibieron el crecimiento de las bacterias patógenas, además de incrementar el sistema inmunológico, que ayudan a mantener sano al animal.
3. Los catorce morfotipos, denotaron actividad antagónica en cultivos *in vitro*, confrontados con *Vibrio sp.* por lo que las siete cepas utilizadas en la formulación de los dos probiótico, dieron excelentes resultados en las piscinas prueba al no

presentar durante el cultivo problemas de Vibriosis.

4. Las cepas bacterianas identificadas fueron capaces de desplazar a bacterias patógenas y esto se puso de manifiesto, pues el índice de mortalidad en las piscinas prueba en la camaronera uno primera corrida fue de 17 % y en las dos corridas siguientes fue un promedio de 4,5 % y en la camaronera dos fue de 37% y en las dos corridas siguientes fue un promedio de 23%, por tanto se determina que estas bacterias colonizaron el intestino del camarón, fortaleciendo así el sistema inmunológico, a nivel de suelo las bacterias fueron capaces de adherirse y adaptarse al medio pues se las encontró en cada uno de las pruebas realizadas.
5. Las bacterias identificadas se ubican dentro del grupo de las Acidófilas y Neutrófilas por lo que podemos concluir que estas bacterias pueden adaptarse a diferentes condiciones de pH. De acuerdo al requerimiento de temperatura se las ubica en el grupo de las mesófilas. El requerimiento de cloruro de sodio para las catorce cepas están dentro de los rangos de 0,5 % a 3 %, lo que permite que estas cepas puedan ser utilizadas en cultivos donde hay rangos mínimos de salinidad.
6. De las catorce cepas de esta investigación solo siete fueron sometidas a pruebas en campo las mismas que nos dan a conocer su potencial como probióticos.
7. Los probióticos nativos aplicados en las piscinas pruebas, fueron probados en las dos estaciones verano e invierno, lo que se pudo comprobar su adaptabilidad y prevalencia.
8. Los probiótico de cepas nativas tuvieron un efecto benéfico en el suelo como se puede observar en las fotos del antes y el después de las piscinas prueba, al observar el mejoramiento cuanto a coloración, olor y lo compacto del mismo. Características de suelo que indican el grado de oxidación de los mismos.



Ilustración 1: Suelo de la Ps. A antes de la prueba y después de cosecha



Ilustración 2: Suelo de la Ps. B antes de la prueba y después de cosecha

5. Recomendaciones

1. La utilización de probióticos nativos para los sistemas de producción acuícola desde el punto de vista ecológico, para tener producciones sostenibles.
2. Restringir totalmente el uso de cualquier tipo de antibiótico o desinfectantes, si se está utilizando probióticos, ya que de utilizarlos inhibirían el crecimiento y acción de los microorganismos benéficos.
3. Los balanceados ya mezclados con el probiótico deben ser utilizados de inmediato o hasta máximo seis horas, pasado este tiempo se produce un efecto de fermentación.

Referencias

- [1] Alapide-Tendencia, E. V. & Dureza. L. A (1997). Isolation of *Vibrio sp.*, from
- [2] *Penaeus monodon* (Fabricius) with red disease syndrome. *Aquaculture*. 154: 105-112
- [3] Amann, M. (2005). Molecular identification of picoplankton populations in contrasting water of the Arabian Sea. *Aquat. Microb. Ecol* 39 145-157. *Aquaculture*, Volume 274, Issue 1, 1-14.

- [4] Balcázar, J; De Blas, I; Ruiz, I. (2006). The role of Probiotics in aquaculture.
- [5] Veterinary Microbiology, Volume 114, Issues 3-4, Pages 173-186.
- [6] Balcázar, J; Rojas, T; Cunningham, D. (2007). Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Invertebrate Pathology, Volume 96, Issue 2, Pages 147-150.
- [7] **Bergey, D. (1994)**. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Decima edición. 324-328.
- [8] **Bochow, H; Gantcheva, K. (1995)**. Soil introductions of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent and its population and activity dynamic. Acta Horticulturae 382:164-172.
- [9] **Brisou, J. C; Tysset, C; Rautlin de la Roy & Curcier, R. (1965)**. Marine bacteria especially Micrococcaceae. J. Gen. Microbiol. 41. 23.
- [10] **Boyd, C & Massaaut L (1999)**. Effect of probiotic on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture, Volume 269, 259-264.
- [11] **Burr, G., Gatlin, D. & Ricke, S. (2005)**. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. Journal of the World Aquaculture Society 36(4): 425-436.
- [12] **Chang, C. & Chen, H. (2000)**. Immunomodulation by dietary β -1, 3 glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish & Shellfish Immunology, Vol. 10.505 – 514.
- [13] **Chapman P. A. (1997)**. *Vibrio alginolyticus* and diarrhoeal disease, J. Diarrhoeal Abstract. is. Res. 5, 40.
- [14] **FAO.2005**. Ecuador Profile. Resumen Informativo sobre la pesca por países: La República del Ecuador.
- [15] **Fuller. R (1989)**. Probiotics in man and animals. J Apolbacteriol. Vol.66. 365-378.
- [16] **Gastesoupe, F. J. (1999)**. The use of probiotic in aquaculture. Aquaculture. Vol. 180. 147- 165.
- [17] **Gatesoupe, F. J (1999)**. Effects of dietary supplementation with probiotic live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant systems of leopard grouper *Mycteroperca rosacea* infected with *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture Research. V. 42, 1676–1686.
- Gómez-Gil, B ; Tron-Mayen, L.;Roque, A ; Turnbull, J. F; Inglis, V. & Guerra-Flores.
- [18] **A. L. (1998)**. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. Aquaculture. 163:1-9.
- [19] **Hair, C; Bell, J. & Doherty, P. (2007)**. The use of wild-caught juveniles in coastal aquaculture and its application to coral reef fishes. In R.R. Stickney & J. McVey, eds. *Responsible Marine Aquaculture*. 327-351. Wallingford, England, CA
- [20] **Nishibuchi M; Ishibashi. M; Takeda, Y & Kaper J. B. (1995)**. Detection of the thermostable direct hemolysin gene and related DNA sequences in *Vibrio parahaemolyticus* and other *Vibrio* species by the DNA colony hybridization test. Infection and Immunity 49. 481-486.
- [21] **Norris, J.R & Ribbons, D.W. (1970)**. Methods in Microbiology. Academic Press .Vol. 3A. 16.
- [22] **Rodgers, P.B. (1989)**. Potential of biological control organisms as a source of antifungal compounds for agrochemical and pharmaceutical product development. Pesticide Science 27:155-164.
- [23] **Sakata, T. (1989)**. Microflora of healthy animals. In: Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish (Editors: Austin B. y Austin D. A.). 1st. Ed. Ellis Horwood Ltd. Chichester, England, U.K. 141-163.
- [24] **Shariff, M; Yusoff, F.M; Devaraja, T.N; Srinivasa Rao, S.P. (2001)**. The effectiveness of a commercial microbial product in poorly prepared tiger shrimp, *Penaeus monodon*(Fabricius), ponds. Aquac. Res. 32, 181–187.
- [25] **Sharma, O.P& Bhukhar, S.K.S. (2000)**. Effect of Aquazyn -TM-1000, a probiotic on the water quality and growth of *Cyprinus carpio* var. communis (L.). Indian J. Fish. 47, 209–213.
- [26] Spanggaard B; Huber, I; Nielsen, J; Sick, E.B; Pipper, C.B; Martinussen, T. (2001). The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout, Environ Microbiol. V, 12 ,:755-765.
- [27] **Speck, M.L.(1977)**. Interactions among Lactobacilli and man. J. Dairy Sci.59. 338-342.
- Sissons, O. (1989)**. Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and

- Geobacillus* strains. *Bioresource Technol.* 101(22). 879-880.
- [28] **Timmermans, L. P. M. (1987).** Early development and differentiation in sh. *Sarsia* 72, 331-339.
- [29] **Tortuero, F. (1973).** Influence of implantation of *Lactobacillus acidophilus* in chicks on the growth, feed conversion, malabsorption of fats syndrome and intestinal flora. *Poultry Sci.* 52: 197-203.
- [30] **Varela, M. (2011).** Procesamiento de camarón (R6 y R2). *Boletín Mensual de Análisis Sectorial de MIPYMES*, 21, 21-22.
- [31] **Verschuerer, L; Rombaut, Net; Zorrueles, P & Verstraete, W. (2000)..** Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 64, 655-671.
- [32] **Vici, V & Bright, S. (2000).** Application of bacterins and yeast *Acremonium dyosporii* to protect the larvae of *Macrobrachium rosenbergii* from vibriosis. *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 10, 559 – 563.
- [33] **Vine, N.G; Leukes, W.D; Kaiser, H. (2006).** Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 30. No.3, 404-427.