



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y
Recursos Naturales

“Identificación molecular de comunidades bacterianas Gram negativas
en agua de un sistema de Pre-criadero de *Litopenaeus vannamei*,”

PROYECTO DE GRADUACIÓN

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERO EN ACUICULTURA

Presentado por:

Bolívar Argüello Lavayen

GUAYAQUIL – ECUADOR

2014

AGRADECIMIENTO

A mis padres que siempre estuvieron a mi lado apoyándome y aconsejándome en cada momento de mi vida.

A mi directora de Tesis Msc. Francisca Burgos por su tiempo y paciencia para guiarme en el desarrollo de la misma.

Al Msc. Cesar Bedoya por su incondicional apoyo cuando lo necesité.

DEDICATORIA

A mis padres:

Bolívar Argüello y Elaine Lavayen

A mis abuelos:

Bolívar Argüello (+) y Olga Espinoza

Julio Lavayen (+) y Celeste Jara

A mis hermanos:

José Ignacio Argüello Lavayen

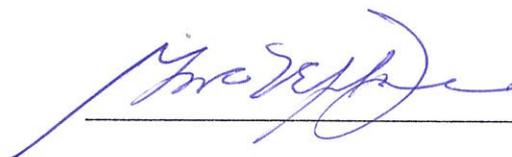
Atenea Argüello Lavayen

TRIBUNAL DE GRADUACION



M.Sc. Francisca Burgos

Directora de Proyecto



Ing. Marco Velarde

Presidente



M. Sc. Jerry Landívar

Miembro Principal



PhD. Marcelo Muñoz

Miembro Alterno

DECLARACION EXPRESA

“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestas en este proyecto de graduación, corresponden exclusivamente a su autor; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL”



Bolívar Argüello Lavayen

RESUMEN

El presente trabajo se basó en la caracterización molecular de bacterias Gram negativas a través de la subunidad 16s rRNA que están presentes en el agua obtenida de un sistema de pre criadero de la camaronera ARGESA en el sector de Balao grande. La propuesta de este proyecto fue conocer la diversidad bacteriana y asociar la presencia de estos organismos a la salud de las post larvas de camarones comparándolo con investigaciones anteriores.

Las muestras de agua tomadas de los pre criaderos siguiendo el plan de muestreo en Z fueron transportadas al laboratorio en hielo para su análisis. Una vez realizada la extracción y purificación de ADN total se procedió a la amplificación por PCR utilizando los primers universales RW01 (5'-AAC TGG AGG AAG GTG GGG AT-3') y DG74 (5'-AGG AGG TGA TCC AAC CGC A-3') con el cual obtendremos el ADN bacteriano total.

Se realizó una segunda amplificación por PCR a partir del producto obtenido de la primera amplificación utilizando los primers DG74 (5'-AGG AGG TGA TCC AAC CGC A-3') y 68d (5'-AYGACGTCAAGTCMTCATGG-3'), este último es un primer específico para bacterias Gram negativas. Con esta

segunda PCR obtuvimos el ADN bacteriano total específico para proceder con la secuenciación.

Los resultados de la secuenciación fueron alineados con secuencias existentes en el gen Bank en donde se identificaron los géneros ***Vibrios***, ***Pseudomonas***, ***Aeromonas***, ***Plesiomonas***, ***Flavobacterium***, ***Klebsiella***, ***Serratia***, ***Shewanella*** y ***Xanthomonas***. También se comprobó la existencia de ***V. harveyi***, ***V. parahaemolyticus*** y ***V. vulnificus*** que causan enfermedades en los laboratorios de larvas de camarón.

Otras de las especies del género *Vibrio* encontradas fueron ***V. alginolyticus***, ***V. fluvialis***, ***V. campbelli***, ***V. fischeri***, ***V. damsela***, ***V. anguillarum***, ***V. gazogenes***, ***V. mimicus***, ***V. proteolyticus***, ***V. splendidus***, ***V. nereis***, ***V. hollisae***, ***V. pelagius***, ***V. natriegens***, ***V. cincinnatiensis***, ***V. cholerae***, ***V. metschikovii***, ***V. furnissii***, ***V. carchirae***

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	II
ÍNDICE GENERAL.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
ANEXOS.....	IX
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO 1	
1.1 Objetivo General.....	5
1.2 Objetivos Específicos.....	5
1.3 Justificación.....	6
CAPITULO 2	
2.1 Antecedentes.....	9
2.2 Sistemas de pre-criadero.....	11
2.3 Principales bacterias aisladas en cultivos de pre-criadero.....	14
2.3.1 Género Pseudomonas.....	16
2.3.2 Género Aeromonas.....	17
2.3.3 Género Vibrio.....	19

2.3.3.1	Vibrios patógenos en post-larvas.....	21
2.3.4	Enfermedades bacterianas en post-larvas.....	25
2.3.4.1	Bacterias luminiscentes.....	25
2.3.4.2	Síndrome de bolitas.....	26
2.3.4.3	Vibriosis Sistemática.....	27
2.4	Segmento 16S rRNA	28
2.4.1	Técnicas moleculares para el análisis del 16s rRNA.....	32
2.4.2	Secuenciación.....	33
 CAPITULO 3		
3.1	Ubicación geográfica y política.....	35
3.2	Muestreo.....	38
3.3	Toma de muestra.....	39
3.4	Extracción y purificación de ADN bacteriano total.....	40
3.5	PCR (16S rRNA) del ADN bacteriano total.....	41
3.5.1	PCR (16S rRNA) de ADN de Gram negativas.....	42
3.6	Secuenciación del ADN bacteriano.....	43
3.7	Impactos.....	46
3.7.1	Impacto Social.....	46
3.7.2	Impacto Ambiental.....	47
3.7.3	Impacto Económico.....	48
 CAPITULO 4		
4.1	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	49

4.2 CONCLUSIONES.....	52
4.3 RECOMENDACIONES.....	54
4.4 BIBLIOGRAFÍA	

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Exportaciones de camarón en el Ecuador.....	1
Figura 2 Impactos de las enfermedades.....	11
Figura 3 Mapa de ARGESA.....	37
Figura 4 Sistema de Pre-criadero.....	38
Figura 5 Plan de muestreo en “Z”.....	39

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla I Coordenadas de la camaronera "ARGESA"	36
Tabla II Cronograma de actividades.....	44
Tabla III Análisis de costos.....	45

ANEXOS

- Anexo 1** Protocolo de extracción y purificación de ADN bacteriano
- Anexo 2** Protocolo de purificación de ADN bacteriano
- Anexo 3** Protocolo de purificación de productos de PCR
- Anexo 4** Protocolo para la ciclo secuenciación de los productos
- Anexo 5** Protocolo de purificación BigDye XTerminator®
- Anexo 6** Protocolo para la corrida de electroforesis

INTRODUCCIÓN

La camaricultura es la actividad más importante dentro del sector acuícola en el Ecuador. Entre enero del 2013 y mayo del 2013 se reportó que las exportaciones de camarón alcanzaron los US\$586 millones, con un incremento del 21.5% comparado con el año 2012 en el mismo periodo. Colocando a la producción de camarón como segundo rubro de exportación tradicional, siendo superado únicamente por el banano. **(Ver figura 1)**



Figura 1: Exportaciones ecuatorianas de camarón.

Fuente: Estadísticas Cia. Ltda, Revista Aqua cultura – edición 97

En la actualidad las zonas de producción de camarón ocupan unas 200,000 hectáreas (1). Este sector es un generador de plazas de trabajo, ya que crea 177.276 empleos directos e indirectos. Existe un trabajador por cada hectárea de piscina de cosecha y por cada 10 empleos en la acuicultura se genera un empleo indirecto por bienes o insumo. En el 2011 se estimó que el sector camaronero generó de forma directa e indirecta el 5% del empleo de la economía nacional (2).

La producción del camarón que engloba también el desarrollo de la larvicultura en el Ecuador, así como en otros países productores, se ha visto afectada por la presencia de enfermedades de origen bacteriano que afectan las diferentes etapas de desarrollo (3). Las del género *Vibrio* han sido aislados de muestras de camarones sanos por lo que la hipótesis de la naturaleza oportunista de estos *Vibrios* es ampliamente aceptada (4).

La interacción negativa entre las larvas y las bacterias causa a menudo enfermedades que conducen rápidamente a altas mortalidades. Basándose en trabajos fenotípicos de varias investigaciones se puede indicar que las principales especies causantes de vibriosis son ***Vibrio alginolyticus***, ***Vibrio anguillarum***, ***Vibrio harveyi***, ***Vibrio parahaemolyticus*** (5).

El segmento 16s rRNA es un polirribonucleotido de aproximadamente 1.500 nucleótidos, codificado por el gen rrs, mejor conocido como ADN ribosomal 16S, a partir de su secuenciación se puede obtener información filogenética y taxonómica. El análisis de este segmento en distintos grupos filogenéticos revelo la presencia de una o más secuencias específicas cortas que aparecen en todos los miembros de un determinado grupo filogenético.

Además de su utilidad en los estudios taxonómicos, la secuenciación del ARNr se ha aplicado en identificación bacteriana. Mediante el análisis de las secuencias parciales del 16S rRNA es posible encontrar patrones de secuencias específicos para grupos, especies o incluso serotipos bacterianos. Para la identificación de los microorganismos a ese nivel, se han desarrollado pequeñas sondas específicas de la región variable del 16S rRNA.

El objetivo del [presente trabajo es la identificación molecular de las especies de bacterias Gram negativas, que son las cepas de interés para este proyecto aisladas de agua de un sistema de pre criadero de post larvas de ***Litopenaeus Vannamei***. Se plantea realizar esto mediante la secuenciación de productos de amplificación obtenidos de productos de PCR y utilizando primers específicos para el segmento 16s rRNA.

Con los resultados del presente trabajo se busca identificar los principales géneros de bacterias Gram negativas que se encuentran presentes en el agua del sistema de cultivo. En base a trabajos anteriores se le dará mayor importancia a la presencia de las especies ***V. vulnificus***, ***Vibrio harveyi*** y ***Vibrio parahaemolyticus*** por sus efectos negativos en cultivos de camarón alrededor del mundo.

CAPÍTULO 1

1.1 Objetivo General:

Identificar molecularmente el género y especie de cada cepa de interés aislada de agua de cultivo de camarones *Litopenaeus Vanname*, mediante la secuenciación de productos de amplificación (amplicones obtenidos con la técnica de PCR, utilizando primers 16s rRNA).

1.2 Objetivos Específicos:

- Caracterizar la estructura bacteriana en el agua de cultivo de un sistema de pre-criaderos a través del segmento 16s rRNA.
- Determinar los principales géneros de bacterias Gram negativas presentes en el agua del pre-criadero.
- Demostrar la presencia de las especies *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* y *V. vulnificus* asociadas con eventos de enfermedades en las post-larvas de camarón.

1.3 Justificación

En la actualidad con los desarrollos científicos se ha llegado a la conclusión de que la salud de los organismos acuáticos cultivables está estrechamente vinculada a su medio, es decir a la calidad de agua. El estrés causado al camarón en condiciones ambientales no óptimas, crea un desgaste en el organismo. Impidiendo un normal desarrollo e incluso lo vuelve vulnerable a enfermedades.

Inclusive puede verse afectado por los microorganismos que se encuentran en su medio natural, que en condiciones controladas no afecta en su desarrollo. Pero cuando estas condiciones cambian ya sea por cambios de salinidad o de pH, esto afecta al metabolismo del camarón y puede generar las condiciones adecuadas para que los microorganismos incluyendo patógenos alteren el equilibrio en el estanque.

Un ambiente acuático es utilizado como reservorio por microorganismos patógenos, en especial el género *Vibrio* si se trata de un estuario marino, pero al mismo tiempo es el medio donde el camarón se reproduce y perpetua. Este hecho implica la necesidad de conocer la biodiversidad del género *Vibrio* en el agua para tomar medidas de control sobre la incidencia de estos microorganismos para evitar pérdidas en la producción del crustáceo.

El confinamiento de un gran número de organismos en un espacio físico reducido ya sea estos tanques, estanques, jaulas, etc., aumenta las posibilidades de que los organismos cultivados sean susceptibles a los patógenos, dando lugar a las enfermedades. Debido a la importancia de los microorganismos patógenos en los sistemas de cultivos se han desarrollado varios trabajos de caracterización con diferentes especies de cultivo.

El estudio de la biodiversidad puede realizarse mediante la evaluación microbiológica clásica y la evaluación molecular. El método de identificación microbiológica clásica presenta algunas desventajas con respecto al método molecular como son:

1. Dependiente del crecimiento en medio de cultivo.
2. Es una técnica que demanda un gran número de horas de trabajo.
3. Los resultados no permiten tener una evaluación concreta y son una aproximación a una caracterización fenotípica establecida.

Los métodos moleculares no presentan ninguna de estas desventajas, siendo confiables y reproducibles. Así el presente estudio implica la utilización de marcadores moleculares para poder estimar la diversidad de las bacterias patógenas en los sistemas de pre-criadero de post-larvas y tomar medidas para disminuir la incidencia de estos organismos sobre el mismo.

La información de los agentes bacterianos aislados por métodos bioquímicos resulta insuficiente en el momento de tomar una decisión de manejo. Con la aplicación de las técnicas moleculares se ha abierto una puerta para el diagnóstico rápido a través de biomoléculas conservadas como el segmento 16S rRNA que permite caracterizar las comunidades microbianas en todo su amplio espectro.

El objetivo del presente trabajo fue identificar molecularmente el género y especie de cada cepa de interés aislada de agua de cultivo de camarones. Esta caracterización se puede utilizar como una potencial herramienta para el estudio de la calidad de agua y su aplicación en los diferentes sistemas de cultivo nos permitirá saber cuáles son los microorganismos que están involucrados en un cultivo exitoso.

CAPÍTULO 2

2.1 Antecedentes

El cultivo del camarón blanco, *Litopenaeus vannamei* en el Ecuador comenzó a mediados del año de 1968, en el sector de Santa Rosa, en la provincia de El Oro. En 1970 en las provincias de El Oro y Guayas con la disponibilidad de salitrales y la disponibilidad de larvas silvestres la camaronicultura se volvió un negocio rentable en el Ecuador (6)(7).

Como todo ser vivo el camarón blanco en algún momento de su vida se puede ver afectados por una gran variedad de microorganismos que pueden afectar su desarrollo e incluso causar su muerte. Entre estos microorganismos podemos destacar tres grandes grupos: virus, parásitos y bacterias, en este último grupo destacan las del género *Vibrio* y afectan al camarón en todos sus etapas de desarrollo (8).

A mediados de 1987 se reportó la enfermedad conocida como “síndrome de bolitas” que provocó pérdidas considerables en larvas de *L. Vannamei* y *L. Stylirostris*. Con las investigaciones realizadas por Morales (1992) y luego corroboradas por San Miguel (1996) y Serrano (1996) mediante patología experimental se pudo determinar que el agente causal de esta enfermedad eran las cepas (S2 Y E22) de *V. harveyi* (9)(10).

En 1995 los laboratorios reportaron mortalidades en la etapa de zoea II, en donde las larvas presentaban anorexia, letargo y atrofia del hepatopáncreas. El agente causal de esta enfermedad es una cepa de *V. alginolyticus*, que es de transmisión horizontal por las heces de los progenitores al momento del desove de los huevos. Por presentarse en este estadio larvario la enfermedad recibe el nombre de Síndrome de zoea II (11)(12).

En la fase de engorda, el cultivo de camarón también se ha visto afectado por bacterias Gram negativas, Esto ocurrió en 1989 cuando ocurrió el brote del “Síndrome de gaviota”, que lleva su nombre por la presencia de gaviotas en las piscinas. Esta enfermedad también se la conoce como Vibriosis sistemática y es causada por un *Vibrio sp.* que causa hipoxia y nada errático en los camarones que nadan cerca de la superficie (13)(14). **(Ver figura 2)**

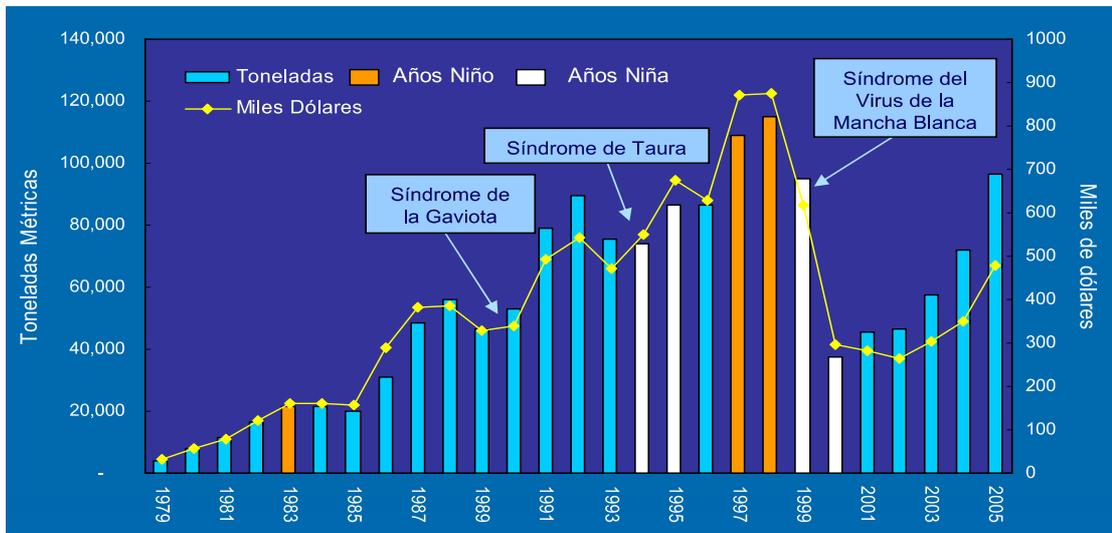


Figura 2: Impacto de las enfermedades.

Fuente: Banco Central

A las bacterias del género *Vibrio* siempre se las ha considerado como organismos oportunistas, es decir afectan al camarón cuando se encuentra en condiciones de estrés o cuando se encuentra inmunodeprimido(5). Estos microorganismos afectan al camarón tanto en la fase de engorde como en la fase de larvicultura, siendo el *V. harveyi* , *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. alginolyticus* los más representativos en esta última fase (15)(16).

2.2 Sistemas de pre-criadero:

Uno de los mayores desafíos que deben enfrentar los ingenieros acuicultores y demás personas que se dedican al cultivo de camarón es la necesidad de lograr una producción constante, para esto se debe contar con una aproximación real de la densidad de siembre en la piscina (17)(18). Muchos

investigadores concuerdan que las primeras semanas de siembra son las más críticas (19).

En la actualidad la siembra de camarón se realiza bajo dos escenarios: la siembra directa en piscinas de engorde y la siembra en pre-criaderos seguido por la transferencia a las piscinas de engorde (20). Esta última presenta mayor ventaja desde es el punto de vista de supervivencia del organismo y producción, ya que le brinda a la post-larva un mayor tiempo de crecimiento y adaptación bajo condiciones controladas.

En los sistemas de pre-criadero su manejo es similar al de las piscinas de engorde, con la diferencia de que se trabaja en un ambiente más controlado y con peneidos en etapa de post-larva. Cuando hablamos de una producción a escala comercial la utilización de pre-criaderos presenta tres principales intereses:

- El manejo en un área mas pequeña facilita el control de los animales y su cultivo.
- El conteo después de la pre-cría permite tener un valor más acertado con respecto al número de individuos sembrados en los estanques de engorda.
- Aumenta la supervivencia de las larvas en comparación con una siembra directa en las piscinas

Existe una gran variedad de pre-criaderos en el Ecuador, esto depende de los diferentes criterios de construcción o de manejos que se tomaron al momento de construirlos. Los principales criterios que se deben tomar en consideración al momento de construcción son: densidad de siembra, ciclos de producción, tamaño deseado de la larva y disponibilidad de terreno y agua.

En base a estos criterios podemos encontrar pre-criaderos de diferentes tipos: de tierra, recubiertos de liner o incluso de cemento. Para brindar a las larvas las condiciones adecuadas para su crecimiento se incluye en los sistemas aireación, filtros, invernaderos, etc. El manejo de estos sistemas va a depender del criterio de los técnicos, de sus conocimientos y experiencia al momento de trabajo.

En estudios realizados en América Latina la tasa de supervivencia promedio de los tanques de pre-cría fue del 70% al 80% (21). En los estudios reportados en 1992 por Samocha y Sturmer et al, se alcanzó una supervivencia promedio entre 85% y 95%. En los resultados de estos estudios se concluyó que la supervivencia variaba entre cada tanque, siendo las principales posibles causas la manipulación de los animales en el proceso y las variaciones de las temperaturas (22)(23).

Se tiene que tomar a consideración que la densidad de siembra va relacionada directamente con la salud del animal. Cuando se trabaja con altas densidades en un sistema de pre-criadero aún en condiciones controladas puede provocar condiciones de stress para la post-larva. En este punto las bacterias que estaban latente en el medio toman un papel negativo y ocasionan perdidas en los sistemas de producción (24).

2.3 Principales bacterias aisladas en cultivos de pre-criadero.

En la acuicultura a nivel mundial los principales microorganismos que han afectado a los cultivos ya sean estos de peces, crustáceos o moluscos han sido los virus y bacterias. Cuando estos organismos infecciosos encuentran en el medio las condiciones adecuados para su desarrollo se vuelven una amenaza para su hospedador, existen registros que pueden causar hasta un 100% de mortalidad en los sistemas de cultivo (25).

En el cultivo de camarón y de diferentes especies bioacuáticas las bacterias siempre tendrán un rol importante ya sea este positivo o negativo en los cultivos. En la camaricultura podemos destacar los géneros que están estrechamente relacionados con la salud del animal y con su medio. Entre estos géneros podemos destacar a las ***Rickettsia spp***, ***Pseudomonas spp.***, ***Aeromonas spp.*** y ***Vibriosis spp.***(26)(27).

La importancia de estos microorganismos en la acuicultura radica que algunos de estos son patógenos, principalmente bacterias del género ***Vibrio spp., Pseudomonas spp., Aeromonas spp. y Rickettsia spp.*** Un número de bacterias han sido implicadas como causantes de enfermedad y mortalidad en peneidos cultivados, especialmente en los estadios de larva, post-larva y juvenil en donde son más susceptibles a los eventos de enfermedad.

Entre las principales enfermedades relacionadas con bacterias Gram negativas podemos mencionar al síndrome de bolitas, Síndrome de Zoea II y vibriosis sistémica. Estas enfermedades están asociadas a *Vibrios spp.* que afectan tanto en la fase de larvicultura como de engorde. Este género es reconocido por su naturaleza oportunista ya que han sido identificado tanto en camarones sanos como enfermos y en muestras de agua.(28)

En otro grupo podemos clasificar a los géneros de ***Rickettsia spp., Pseudomonas spp. y Aeromonas spp.,*** los cuales también afectan al camarón pero se los considera patógenos oportunistas secundarios. Se las considera así porque siempre que se aíslan en cultivos se las encuentra junto con bacterias del género *Vibrio*. La ***Rickettsia spp.*** es conocido por ser el causante de la Necrosis Hepatopancreática (NHP) que afecta directamente al hepatopáncreas del camarón, atrofiándolo (29).

En acuicultura, en los últimos años se emplea las bacterias con diferentes propósitos, estas han sido usadas para biorremediación de suelos, agua y como probióticos. De las cuales podemos destacar los géneros ***Nitrosomonas spp.*** y ***Nitrobacter spp.*** los cuales se utilizan para la transformación de compuestos amoniacaes, perjudiciales en altas concentraciones a una forma en la que pueda ser aprovechada por las algas para la fotosíntesis (30).

2.3.1 Género Pseudomona:

Las ***Pseudomonas*** son bacterias Gram negativas, con forma de bastoncillo y motiles, de tamaño pequeño de 0.6 x 2 μm ; y muchas especies de este género son comunes ya sea en el agua, suelo, plantas y animales vertebrados e invertebrados. En los ambientes de agua dulce o marina pueden infectar tanto a peces como crustáceos; En el cultivo de camarón, se desarrolla en ambientes de mala condicione de calidad del agua y suelo.

Algunas actúan como oportunistas y generalmente, atacan a animales que tienen las defensas anormales. Las ***Pseudomonas*** producen exotoxinas, causantes de necrosis tisular y alteración del epitelio de ciertos órganos como los túbulos hepatopancreáticos, mucosa y/o pared epitelial del

intestino. La afección del hepatopáncreas en camarones se conoce como hepatopáncreas necrótico.

El tratamiento es algo complejo, teniéndose que identificar primero la especie y luego realizar pruebas de sensibilidad, como auxiliar en la selección de la terapéutica antimicrobiana. El tratamiento incluye aplicar varios fármacos a la vez, ya que la proporción de éxitos en combatirla son bajos y las bacteria pueden desarrollar resistencia cuando se aplican productos terapéuticos únicos.

En el camarón se recomienda utilizar quinolonas como la ciprofloxacina junto con neomicina; aunque también se utilizan terramicina, furanasa y Oxitetraciclina. El medio mas efectivo para el tratamiento de *Pseudomonas* es mejorando el ambiente de cultivo mediante recambios de agua del fondo, evitando el deterioro del ambiente del suelo, donde se realizan los procesos de muda del camarón.

2.3.2 Género Aeromonas:

Es una bacteria con forma de bacilo, Gram-negativa, anaerobia facultativa que morfológicamente se asemeja a los miembros de la familia Enterobacteriaceae. Se han descrito catorce especies de *Aeromonas*, la

mayoría de las cuales han sido asociadas con enfermedades humanas. Los patógenos más importantes son *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* biovar sobria. Estos organismos son ubícuos en el agua dulce y salobre.

Las dos principales enfermedades asociadas con *Aeromonas* son la gastroenteritis y las infecciones de heridas, con o sin bacteremia. La gastroenteritis generalmente se produce por la ingestión de agua o de alimentos contaminados, mientras que las infecciones de heridas son el resultado de la exposición al agua contaminada.

En un estudio realizado por Yasuda y Kitao (1980), para describir la población bacteriana en el intestino de larvas y juveniles de camarones, *Penaeus japonicus*, mantenidos en tanques en el laboratorio, durante 5 meses, así como de juveniles silvestres, de la Bahía de Nobeoka- Japón, detectaron en todos los estadios larvarios que la composición genérica de las bacterias en este órgano y en el agua de los tanques fue similar: *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio* y un grupo no identificado.

Luego de 126 d, la población bacteriana en el tanque y en el ambiente estuvo dominada por *Vibrio* spp., pero en el sedimento, hábitat natural de los adultos, predominó *Pseudomonas* spp. Esto coincidió con lo hallado en el

intestino de los adultos, donde la población bacteriana dominante fue *Pseudomonas* spp.

En 1990 Caravaca-Castro concluyeron en sus investigaciones que en los sistemas de cultivo del Ecuador predominan los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Flavobacterium*, pero también están presentes los géneros *Achromobacter*, *Acinetobacter* y *Moraxella*, desconociéndose los efectos patógenos de estos últimos.

2.3.3 Género Vibrio:

En las regiones de clima tropical y templado, las especies de *Vibrio* que causan enfermedades están presentes naturalmente en el mar y estuarios marinos, se encuentran ampliamente distribuidos en este último. Estos microorganismos son parte de la microbiota natural de estos ecosistemas pero además son patógenos primarios y oportunistas del mismo, que infectan al hospedador cuando se encuentra inmunodeprimido (31).

Algunos vibrios encuentran las condiciones adecuadas para su desarrollo en los intestinos de animales acuáticos, ya sean estos crustáceos, peces o moluscos. Por este motivo se deben tomar precauciones en el consumo de mariscos ya que puede ser la vía de ingreso en nuestro organismo. Debido a

estos en los últimos años se ha hecho mayor énfasis en la sanidad e inocuidad de los productos acuícolas.

Se conocen alrededor de 37 especies, 11 de las cuales causan enfermedades en humanos y que se encuentran ampliamente distribuidas en ambientes acuáticos. Algunas especies se asocian principalmente con enfermedades gastrointestinales (***Vibrio cholerae*** y ***V. parahaemolyticus***), mientras que otras pueden causar enfermedades no intestinales, como la septicemia (***V. vulnificus***) (32)(33).

Los vibrios patógenos, en particular ***V. cholerae***, también pueden recuperarse de las cuencas de agua dulce de los estuarios, donde además pueden introducirse por contaminación fecal. La presencia de estas bacterias no suele guardar relación con el número de coliformes fecales y puede que la depuración del marisco no reduzca el número de éstas.

Las enfermedades bacterianas, debido principalmente a *Vibrio*, que han sido reportadas en los sistemas de cultivo de penaeideos implican a al menos 14 especies, las cuales son: ***V. harveyi***, ***Vibrio splendidus***, ***V. parahaemolyticus***, ***Vibrio alginolyticus***, ***Vibrio anguillarum***, ***V. vulnificus***, ***Vibrio campbelli***, ***Vibrio fischeri***, ***Vibrio damsella***, ***Vibrio pelagicus***, ***Vibrio orientalis***, ***Vibrio ordalii***, ***Vibrio mediterrani***, ***Vibrio logei***, etc. (34).

La vibriosis que es la enfermedad causada por bacterias del género *Vibrio* puede ocurrir tanto en animales cultivados o silvestres, en todas las especies y en sus diferentes etapas de desarrollo pero particularmente en larvas y post-larvas donde son mas vulnerables (35). Existen reportes en diferentes partes del mundo en donde hubo perdidas del 100% de la producción de los laboratorios en un periodo de 24 horas debido a la vibriosis (36).

2.3.3.1 Principales *Vibrios* patógenos en post-larvas:

Dentro de la identificación de especies de genero *Vibrio*. Los criterios bioquímicos no son siempre suficientes para distinguir entre especies de *Vibrio* debido a su carácter variable. En los ensayos de caracterización bioquímica, *V. harveyi* y *V. campbellii* presentaba características muy similares debido a su estrecha relación fenotípica y genotípica (37).

En el Ecuador, el *V. harveyi* se ha implicado con mortalidades de larvas y post-larvas de *L. vannamei*, el primer reporte de estas ocurrió en 1987 con la enfermedad del Síndrome de las bolitas en donde se determinó que el agente causal eran las cepas (S2 y E22) de *V. harveyi*. La enfermedad se caracteriza por una patología distintiva del hepatopáncreas donde el tejido se degenera, formando bolas que se mueven en el intestino superior (38).

El nombre de “vibriosis luminiscente”, dado a esta enfermedad provocada por el *V. harveyi* se debe a los síntomas descritos en los individuos afectados cuando son observados en la oscuridad. Para evitar estos tipos de problemas en los cultivos los criadores optan medidas preventivas como el manejo el tratamiento del agua, lo que implica procesos de filtración, cloración y tratamientos ultra violeta que incrementan los costos de producción (39).

El *V. parahaemolyticus* es un bacilo Gram negativa encontrada en el agua salada y estuarina, oxidasa positivo, aeróbico facultativo, y no forma espora que, cuando se ingiere, causa enfermedades gastrointestinales pudiendo ser transmitida por pescados y mariscos, como cangrejos y langostinos hacia los seres humanos durante su exposición.

Este es un Vibrio zoonótico, es decir causa enfermedades tanto en la vida marina como en humano, y es una causa común en la mortalidades de peces y crustáceos infectados. Aunque ha habido numerosos estudios sobre esta bacteria, el modo exacto de la acción patógena no ha sido bien aclarado. Un análisis reciente del genoma de *V. parahaemolyticus* ha arrojado luz sobre aspectos desconocidos de su mecanismo patogénico.

La mayoría de las cepas del ***V. parahaemolyticus*** están asociadas a enfermedades causantes de la gastroenteritis al ingerir alimentos contaminados. Se sabe que los cangrejos y los langostinos son medios de transmisión, y pueden causar infecciones mortales en los seres humanos durante la exposición. Existen casos reportados en donde esta bacteria puede ingresar al hospedador a través de heridas abiertas y cortes (40) .

Esta bacteria es aislada con frecuencia en brotes de gastroenteritis por consumo de mariscos infectados en diferentes partes del mundo, principalmente en Asia. En 1950, Fujino y colaboradores fueron los primeros en aislar a ***V. parahaemolyticus*** como agente causal de gastroenteritis de origen alimentario, a raíz de un gran brote causado por el consumo de Shirasu (un producto de pescado semiseco) en Japón. En este incidente, 272 pacientes sufrieron gastroenteritis aguda y 20 fallecieron (41).

El ***V. vulnificus*** es una bacteria autóctona de estuarios y aguas marinas con climas tropicales, su sobrevivencia está asociada a las condiciones ambientales de pH, salinidad y temperatura del agua, niveles de oxígeno disuelto y coliformes, ya que crece mejor en ausencia de bacterias entéricas. Las infecciones provocadas por esta bacteria conducen rápidamente a septicemia e infecciones intestinales en seres humanos (42).

Bajo ciertas condiciones y especialmente en ambientes marinos, **V. vulnificus** desarrolla estrategias de supervivencia bajo condiciones de estrés. Cuando la temperatura es menor de 7°C, el organismo entra en un estado llamado viable pero no cultivable. En esta fase, la bacteria no puede cultivarse en medios normalmente usados en su aislamiento, pero mantiene actividad respiratoria y metabólica.

Este estado fisiológico es considerado como una estrategia para responder a condiciones adversas, de ahí que durante los meses de invierno se dificulte el aislamiento de **V. vulnificus** de agua y moluscos. Se lo puede aislar en peneidos enfermos con signos de Vibriosis sistémica, en donde causan mayores mortalidades en las fases de larvas, post-larvas y juveniles, también se lo encuentra en la fase de engorde aunque en menor porcentaje (44).

2.3.4 Enfermedades bacterianas en post larvas de *L. vannamei*

2.3.4.1 Bacterias luminiscentes

Esta enfermedad se la asocia principalmente mediante aislamiento a las especies de *V. harveyi* y *V. splendidus* principalmente, aunque como en la mayoría de los casos la identificación bacteriana es deficiente. En 1992 Morales reportó que esta enfermedad ha llegado a afectar hasta en un 100% la productividad en los laboratorios de larvas (45).

Las post larvas infectadas por estas bacterias del género *Vibrio* se caracterizan por presentar una colonización masiva en la región oral, en el principio del tracto digestivo y los apéndices. Conforme la infección se propaga también son afectados el intestino medio y el hepatopáncreas para culminar en una septicemia generalizada (46).

En la noche se puede apreciar las larvas con luminiscencia causada por este grupo de bacterias, de ahí el nombre de esta enfermedad. Es necesario observar detenidamente si la luminiscencia esta en las larvas o adheridas a partículas, y no en el agua. Un análisis mediante microscopía óptica revela densos cúmulos de bacterias en el hemocele de larvas moribundas.

2.3.4.2 Síndrome de bolitas

Los primeros datos de mortalidades asociadas a esta enfermedad fueron reportados a mediados de 1987 por el equipo de biólogos de INBIOSEA y patólogos de IFREMER. La incidencia de este síndrome es mayor en la fase de post-larvas, pero también se han reportado grandes mortalidades en los estadios de zoea y mysis, pudiendo llegar a acabar el 90% de la población en un lapso de 24 horas (47).

Esta enfermedad recibe su nombre porque en los túbulos de los animales infectados se han observado pequeñas esferas de coloración blanca. Estas formaciones blancas son células descamadas provenientes del hepatopáncreas o hepatocitos hipertrofiados. A menudo se encuentran estas células descamadas en el tracto digestivo del organismo afectado. Se piensa que las bolitas son una reacción del organismo por las toxinas bacterianas y de manera menos común, por la presencia de metales pesados (48).

Las bacterias aisladas por Morales en 1992 de macerados de larvas afectadas con síndrome de bolitas aparecen sobre el medio TCBS con una coloración verdosa, es decir patógenas. Fueron identificadas bioquímicamente como *V. harveyi*, siendo la cepa S2 la referente del agente causal de este síndrome. Al mismo tiempo en muestras de larvas sanas no se observan estas bacterias de manera predominante.

2.3.4.3 Vibriosis sistemática

La vibriosis sistemática es la enfermedad de origen bacteriano más importante en cultivos de peneidos alrededor del mundo. En algunas regiones de Latinoamérica, incluido Ecuador a la vibriosis también se la llegó a conocer como Síndrome de la gaviota. Afecta al camarón en todos sus estadios de desarrollo tanto en a las larvas como a camarón adulto. Están presentes con mayor frecuencia en los laboratorios de larvas.

El agente etiológico causante de esta enfermedad es el ***Vibrio spp.*** una bacteria Gram negativa, oxidasa positiva, motil. Las especies que se encontraron en laboratorios de post-larvas son: ***V. harveyi***, ***V. parahaemolyticus***, ***V. vulnificus***, ***V. alginolyticus*** y ***Vibrio sp.*** En instalaciones de crianza se reportaron con mayor frecuencia ***V. vulnificus***, ***V. alginolyticus***, ***Vibrio spp***, ***V. parahaemolyticus*** y ***V. harveyi*** (49).

Especies que se reportan ocasionalmente son ***V. damsela***, ***V. fluvialis*** y ***Vibrio spp.*** Cualquier especie de camarón es susceptible a la infección si se encuentra bajo condiciones de estrés. Los reportes de epizootias importantes de Vibriosis han tenido lugar en Japón con el ***Penaeus japonicus***, en las regiones del Indo pacifico donde se cultiva mayormente el ***Penaeus monodon***. En Ecuador, Perú, Colombia y Centroamérica con los cultivos de ***P. vannamei***.

Entre los síntomas clínicos de esta enfermedad podemos destacar las altas mortandades en los cultivos, principalmente en los estadíos de larva, post-larva y juveniles. Otro síntoma en los camarones afectados es que presentan hipoxia y con frecuencia nadan a la superficie y a las orillas donde las aves marinas (gaviotas) se alimentan de los peneidos moribundos.

En afecciones de post-larvas por formas luminiscentes y no luminiscentes de *Vibrios* podemos encontrar placas basofílicas de bacterias, es decir masas de bacterias colonizando la cutícula de la región oral y del estómago. Generalmente a la colonización cuticular le sigue la invasión del hepatopáncreas y del intestino y por ultimo infecciones sistémicas durante la fase terminal de la enfermedad.

2.4 Segmento 16S rRNA:

Es un polirribonucleotido de aproximadamente 1.500 nucleótidos, codificado por el gen *rrs*, mejor conocido como ADN ribosomal 16S, a partir de su secuenciación se puede obtener información filogenética y taxonómica. El análisis de este segmento en distintos grupos filogenéticos revelo la presencia de una o más secuencias específicas cortas que aparecen en todos los miembros de un determinado grupo filogenético y nunca están presentes en otros grupos, llamadas oligonucleótidos firma.

En la década de 1970 Carl Woese propuso la aplicación de esta molécula como cronometro molecular definitivo debido a que es una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales, constituye por lo tanto una diana universal para su identificación.

Woese comenzó sus estudios con la secuencia del 16S rRNA debido a su universalidad y su alta conservación en estructura y función. Posteriormente los estudios se extendieron al segmento 23S rRNA. Las secuencias de nucleótidos constantes del 16S rRNA tienen la ventaja de tener de un sitio de iniciación adecuado para la elongación de los cebadores y así aplicar más fácil la técnica de secuenciación.

Además de su utilidad en los estudios taxonómicos, la secuenciación del ARNr se ha aplicado en identificación bacteriana. Mediante el análisis de las secuencias parciales del 16S rRNA es posible encontrar patrones de secuencias específicos para grupos, especies o incluso serotipos bacterianos. Para la identificación de los microorganismos a ese nivel, se han desarrollado pequeñas sondas específicas de la región variable del 16S rRNA.

Las diferencias en las regiones conservativas proporcionan así mismo secuencias para el diagnóstico de grupos de organismos relacionados y pueden ser usadas como dianas para sondas específicas de oligonucleótidos. Sondas específicas de ARNr 16S y 23S han sido aplicadas para establecer diferentes grupos y especies, así como en la identificación de bacterias.

Los estudios de Woese originaron la división de los procariotas en dos grupos o reinos: ***Eubacteria*** y ***Archaeobacteria***, cuya divergencia es tan profunda como la encontrada entre ellos y los eucariotas. Además, permitieron establecer las divisiones mayoritarias y subdivisiones dentro de ambos reinos. También introdujo el término dominio para sustituir al reino como categoría taxonómica de rango superior, y distribuyó a los organismos celulares en tres dominios: **Bacteria, Archaea y Eukarya**.

Aunque existen cronómetros alternativos al 16S rRNA hasta la fecha ninguna de estas ha podido desplazarla. Esta macromolécula fue considerada por Woese como cronómetro molecular definitivo ya que presenta una serie de características específicas:

1. Es una molécula muy antigua presente en todas las bacterias actuales, por lo tanto es un diana universal para su identificación.

2. Su estructura y función han permitido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
3. Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariotas y, junto con las variaciones en los ARNr 18S, a lo largo de toda la escala evolutiva. Los ARNr SSU contienen, sin embargo, suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos.
4. Es de tamaño relativamente largo del 16S rRNA (1.500 nt) minimiza las fluctuaciones estadísticas.
5. La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
6. Debido a la relativamente facilidad de secuenciar los 16S rRNA existen bases de datos amplias, en continuo crecimiento.

2.4.1 Técnicas moleculares para el análisis del 16s rRNA

Además de su utilidad en los estudios taxonómicos, la secuenciación del rRNA se ha aplicado en identificación bacteriana. Mediante el análisis de las secuencias parciales del rRNA 16S es posible encontrar patrones de secuencias específicos para grupos, especies o incluso serotipos bacterianos. Para la identificación de los microorganismos a ese nivel, se han desarrollado pequeñas sondas específicas de la región variable del rRNA 16S.

La hibridación con sondas específicas permite la identificación rápida de un gran número de aislados, al mismo tiempo que posibilitan la detección directa de microorganismos concretos en las muestras, usando un extracto de ácidos nucleicos como diana. La sensibilidad de las pruebas puede ser aumentada in vitro aplicando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

A partir de un pequeño fragmento de DNA, es posible amplificar una secuencia diana hasta unos cuantos microgramos, los cuales pueden ser secuenciados directamente o pueden ser utilizados como diana de una sonda específica. El uso combinado de sondas universales y específicas permite también estimar la fracción de determinados microorganismos dentro de un conjunto.

En cuanto a la metodología de este análisis, el rRNA 16S es secuenciado utilizando una modificación de la técnica de Sanger (1977) de dideoxynucleotidos, en la que conocidos primers complementarios a las regiones conservadas del rRNA 16S, son elongados utilizando una transcriptasa inversa. Las pequeñas cadenas de DNA producidas pueden ser amplificadas mediante la PCR o por clonación, y después secuenciadas mediante un proceso automatizado por electroforesis en geles de poliacrilamida.

2.4.2 Secuenciación:

El método de secuenciación utilizado aquí es el desarrollado por Sanger en 1975, este consiste en la incorporación de dideoxynucleótidos marcados fluorescentemente a una cadena de ADN durante el proceso de copiado de la misma. Los dideoxynucleótidos no poseen un grupo 3'-OH necesario para la formación del enlace fosfodiéster que permite la unión entre nucleótidos, por lo tanto se interrumpe la elongación de la cadena cada vez que uno de estos es incorporado en ella.

De este modo se generan secuencias de diferentes tamaños. Estas se hacen migran a través de un gel de poliacrilamida donde se separan por tamaños. El equipo de secuenciación cuenta con un dispositivo que permite captar la

emisión de luz de los cuatro didesixinucleótidos. La lectura se hace entonces partiendo de las secuencias más cortas hasta la secuencia completa, y se genera un gráfico con picos de emisión de luz en la posición de cada uno de los nucleótidos de la secuencia de interés (cromatograma).

CAPÍTULO 3

3.1 Ubicación geográfica y política:

El sistema de pre-criadero del cual se obtendrán las muestras de agua para el presente proyecto esta ubicado en la camaronera “ARGASA”, dentro de la hacienda “La María” perteneciente a la parroquia Balao, del cantón Balao, de la provincia del Guayas. La camaronera “ARGASA” limita con el norte con la camaronera del Sr. Aguayo, al este con la camaronera del Sr. Jorge Encalada, al sur con la camaronera “PAULIMAR” y al oeste con la camaronera “MAVASA”.

(Ver tabla 1) (Ver figura 3)

Tabla I: Coordenadas de la camaronera “ARGESA”.**Fuente:** ARGESA

Coordenadas	X	Y
1	630.790	9682.468
2	630.923	9683.314
3	631.117	9684.344
4	631.453	9684.209
5	631.949	9684.004
6	631.796	9683.184
7	631.672	9682.305
8	631.171	9682.397

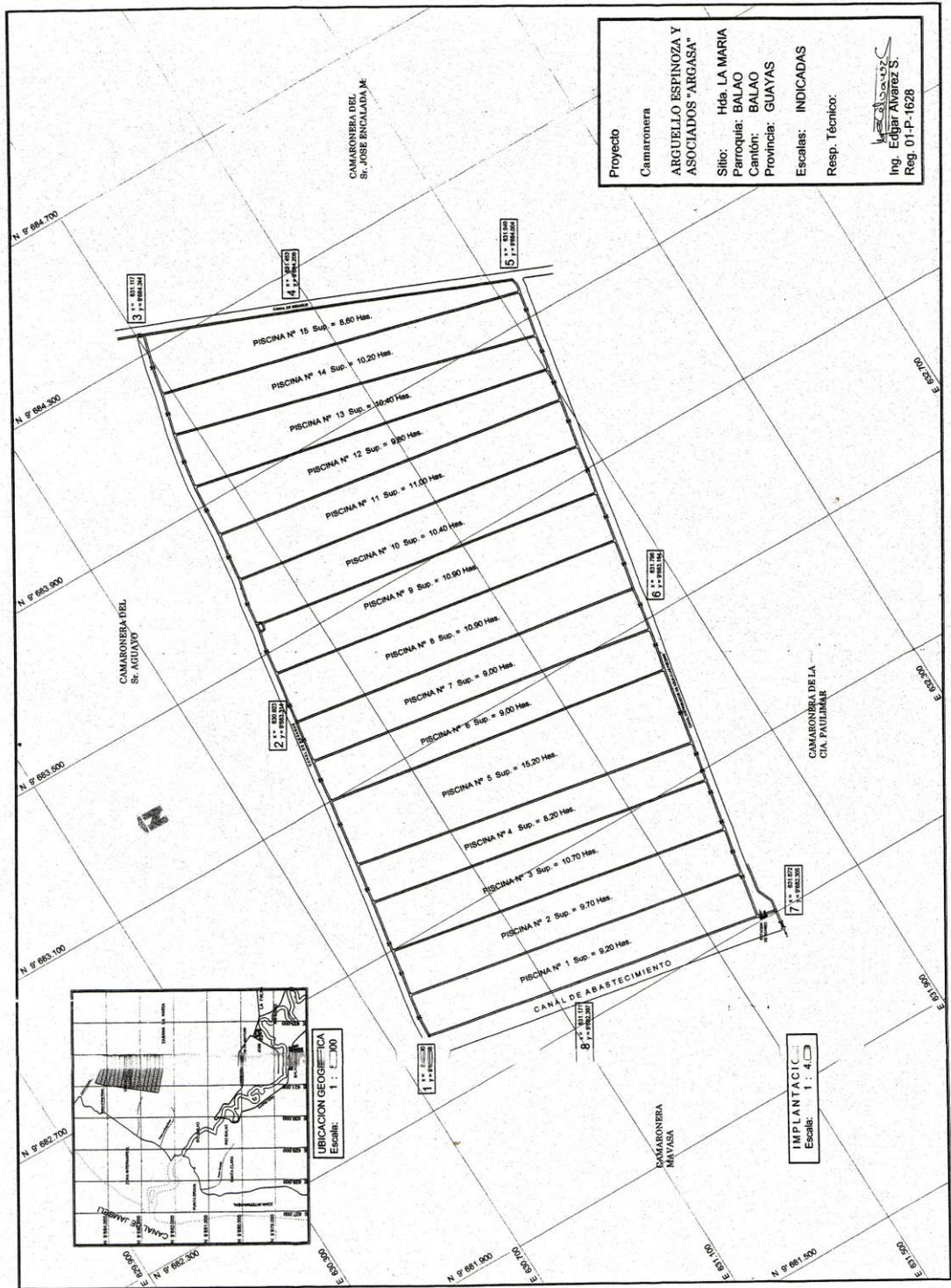


Figura 3: Mapa ARGESA.

Fuente: ARGESA

3.2 Muestreo:

Las muestras fueron tomadas de 3 estanques de tierra recubiertas por liners (raceway 4, 5, 6) con una capacidad de 80 toneladas cúbicas cada una. Los pre-criaderos también cuentan con sistema de aireación y poseen una densidad de siembra de 2 millones de post-larvas en cada estanque, con una biomasa aproximadamente de 50 animales/gramo a las dos semanas de siembra. Se inició el muestreo a las 7 am, previo a la alimentación y un día antes de la transferencia de las post-larvas a las piscinas de engorde.

(Ver figura 4)



Figura 4: Sistema de Pre-criadero.

Fuente: Bolívar Argüello

3.3 Toma de muestra:

En este paso se procedió a tomar 5 muestras en frascos con tapa de 500 ml estériles con sus respectivas réplicas de cada pre-criadero, llenando $\frac{2}{3}$ del volumen del recipiente siguiendo el plan de muestreo en “Z” a lo largo de cada pre-criadero. Las muestras fueron recolectadas a una profundidad entre 15 y 30 centímetros.

Se empleó una malla roja para evitar que las larvas y otras partículas extrañas ingresen a la muestra, al momento de la recolección de muestras se debió apagar el sistema de aireación. Las muestras recolectadas, 30 en total serán colocadas en una hielera con hielo para su transportación y su posterior análisis en el laboratorio. **(Ver gráfico 5)**

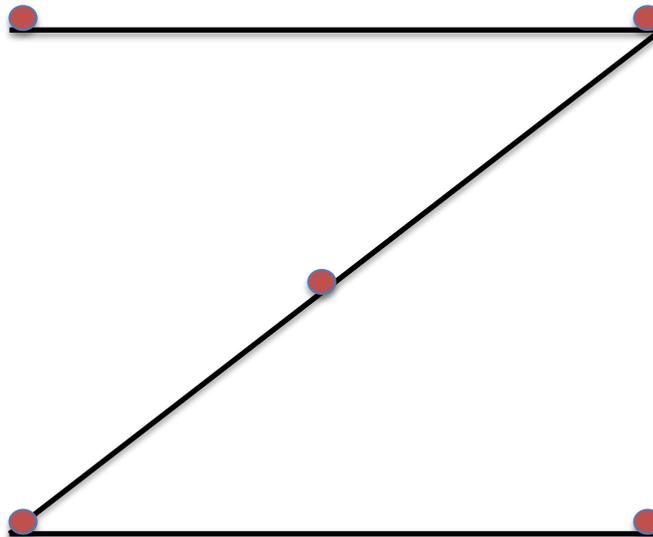


Figura 5: Toma de muestra en plan “Z”.

Fuente: Bolívar Argüello

3.4 Extracción y purificación de ADN bacteriano total:

Debido a que las muestras recolectadas de los sistemas de pre-criadero son volúmenes relativamente grandes (333.33ml), se unieron las 5 muestras de cada tanque de pre-criadero en una sola muestra total, de igual manera con las replicas de cada muestra por tanque individual. Se procedió a centrifugar los volúmenes de la muestra total. Descartar sobrenadante y con el pellet proceder con la extracción y purificación del ADN bacteriano.

La técnica empleada para el aislamiento del ADN total bacteriano fue en base a CTAB— Fenol – Cloroformo e isopropanol para la precipitación, en base al método descrito por Smalla et al., 1993. **(Ver Anexo 1)**

Con el material obtenido de la extracción se procedió a la purificación de ADN bacteriano siguiendo el método descrito por Smith et al., 1997 y utilizando el método de purificación basados en filtros (Wizard PCR prep. DNA Purification system – Promega®). **(Ver Anexo 2)**

3.5 PCR (16S rRNA) del ADN bacteriano total

La amplificación del DNA por PCR permitió obtener una cantidad suficiente de muestra para poder llevar a cabo los análisis subsecuentes, lo cual se realizó mediante la técnica ya descrita por Schaefer et al., (2001). El material genético extraído y purificado previamente de las muestras será amplificado por PCR usando los primers:

- RW01 (5'-AAC TGG AGG AAG GTG GGG AT-3')
- DG74 (5'-AGG AGG TGA TCC AAC CGC A-3')

Complementarios de la región conservada 16S RNA, con 30 ciclos termales. El volumen final de mezcla por muestra para una amplificación mediante PCR fue de 25 µl.

La amplificación por PCR se realizó en el equipo PTC 200 MJ Research siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los productos de PCR son purificados para remover el exceso de nucleótidos y primers. Para esto se utilizara un kit de purificación comercial QiaQuick PCR purification kit [Qiagen] y se utilizará el protocolo descrito por el fabricante.

(Ver Anexo 3)

3.5.1 PCR (16S rRNA) de ADN de Gram negativas

Se realizó una segunda amplificación con el ADN bacteriano obtenido de la primera amplificación. Se realizara la misma técnica descrita por Shaefer et al., (2001) pero con el primer 68d específicos para bacterias Gram negativas:

- 68d (5'-AYGACGTCAAGTCMTCATGG-3')
- DG74 (5'-AGG AGG TGA TCC AAC CGC A-3')

Los amplificación de PCR es empleada bajo las mismas condiciones, solo varia la concentración de $MgSO_4$ a 1.75 mM y se realizara en 50 ciclos por el protocolo establecido por Klausseger et al.

Los productos de PCR son purificados para remover el exceso de nucleótidos y primers. Para esto se utilizara un kit de purificación comercial QiaQick PCR purification kit [Qiagen] y se utilizará el protocolo descrito por el fabricante.

3.7 Secuenciación del ADN bacteriano

Con el producto purificado del paso previo se procedió a la ciclo secuenciación del mismo utilizando a este producto de PCR como base. Para este paso se empleó el kit comercial de ciclo secuenciación BigDye® Direct Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) utilizando un termociclador 9700. Se realizará la secuenciación del AND bacteriano siguiendo las especificaciones del proveedor. **(Ver Anexo 4)**

Para obtener resultados óptimos, retire completamente los tintes terminadores no incorporados antes de realizar la electroforesis capilar. El exceso de tintes terminadores en los productos de secuenciación puede ocultar datos en la primera parte de la secuencia e interferir con la lectura.

EL método de purificación de los productos de secuenciación es con el kit de purificación BigDye XTerminator® que es optimizado para el BigDye® Direct Cycle Sequencing Kit. **(Ver Anexo 5)**

Una vez que se haya obtenido el producto de la secuenciación final se realizó la corrida de electroforesis capilar utilizando el equipo 3130 Genetic Analyzer y siguiendo el protocolo establecido del kit comercial BigDye® Direct Cycle Sequencing Kit.

El análisis de identidad es con la ayuda de BigDye® Direct Cycle Sequencing Kit Software v1.1 en los cuales las secuencias fueron alineadas y se las comparó con las secuencias disponibles en el banco del genoma bacteriana para el 16S rRNA Gen Bank.

Tabla II: Cronograma de actividades.

Fuente: Bolívar Argüello

	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC
ACTIVIDAD						
Investigación Bibliográfica	X	X	X			
Toma de muestras			X			
Transporte de la muestra			X			
Extracción de ADN bacteriano				X		
PCR (rRNA 16S)					X	
Análisis de la imagen					X	
Secuenciación					X	
Análisis de los resultados					X	
Escritura de la publicación					X	X

Tabla III: Análisis de costos**Fuente:** Bolívar Argüello

ACTIVIDAD	TIEMPO	MATERIALES	R. HUMANOS	COSTO
Toma de muestras	1 día	Botella de 1lt.	2 técnicos	\$80.00
Transporte de muestra	1 día	Hielera, vehículo y gasolina	Chofer	\$45.00
Obtención del ADN bacteriano total	1 día	Centrifugador Micro pipetas puntas estériles	2 Biotecnólogos	\$200.00
Extracción de ADN bacteriano total	1 día	CTAB	2 Biotecnólogos	\$350.00
Caracterización por el método PCR – 16s rRNA		Kit de extracción	2 Biotecnólogos	\$6,800
Análisis de los resultados		Ordenadores Software	2 Biotecnólogos	\$1,250
Escritura de la publicación y resultados		Ordenadores Materiales de oficina		\$500.00
Alquiler del laboratorio	3 meses			\$8,000
TOTAL				\$17,225

3.8 IMPACTOS

3.8.1 Impacto Social:

- Este proyecto tiene como propósito demostrar al sector camaronero ecuatoriano la importancia de mantener una buena calidad de agua en los sistemas de pre-criadero y en las piscinas de engorde, lo cual hace los ciclos de producción menos costosos.
- La identificación bacteriana realizada en este trabajo tiene como fin demostrar la diversidad filogenética bacteriana existente en el agua de los pre-criaderos las post-larvas.
- Gracias a la caracterización podremos discernir las bacterias patógenas de las no patógenas y aplicar el protocolo de manejo mas adecuado acorde con el medio.

- Dar a conocer la diversidad bacteriológica que posee los estuarios marinos en el sector Balao. Ya que las diferentes especies de estos vibrios no están adecuadamente clasificados y da una pauta para la identificación de otras bacterias presentes en los estuarios.

3.8.2 Impacto Ambiental:

- Con el conocimiento de las estructuras bacterianas del sistema de pre-criadero se podrá dar un mejor tratamiento de las aguas residuales de los cultivos, para que el impacto de estos en el ecosistema se reduzca.
- Con este proyecto se tratara de concientizar a los productores la importancia de identificar a las bacterias patógenas por su impacto en los cultivos de pre-criaderos. De esta forma dar a conocer que no todas las bacterias son patógenas, ya que algunas son las responsables de los procesos de biorremediación de suelo y agua.
- Conociendo que el potencial infeccioso de los vibrios solo se activa en ciertas condiciones especificas se tiene que tomar a consideración el medio ambiente, sus factores bióticos y abióticos y no únicamente a

la biota dentro de los pre-criaderos y piscinas de engorde para lograr una acuicultura responsable.

3.8.3 Impacto Económico:

- Se espera que el impacto económico mediato para la industria camaronera nacional sea significativo, al permitir la aplicación de medidas de manejo y de medicación coherentes, para prevenir episodios de mortalidad.
- Dichas medidas de prevención tendrán un impacto positivo no sólo mediante la reducción de pérdidas por mortalidad, sino también permitiendo el uso menos discriminado de antibióticos, con los correspondientes beneficios para la comercialización del camarón ecuatoriano, y para el ambiente.
- Se espera que los resultados de este proyecto además formen la base para futuras investigaciones, orientadas a describir los mecanismos de patogenicidad de las cepas que serán caracterizadas,

y al desarrollo de vacunas específicas para la prevención de las enfermedades correspondientes.

CAPÍTULO 4

ANÁLISIS DE RESULTADOS

- La diversidad bacteriana marina viables de las aguas de la zona de Balao fue determinada a través de secuencias parciales de genes 16S rDNA, permitiendo encontrar nuevas estructuras y comunidades bacterianas no identificadas.

- A través de la identificación del DNA genómico, amplificación y posterior secuenciación de la fracción del gen 16S rRNA se encontraron géneros de bacterias pertenecientes a las familias Citofagaceae, Pseudomonaceae, Vibrionaceae y Bacillaceae, algunas de las cuales están relacionadas con enfermedades en los crustáceos.
- Los estudios de la subunidad 16s rRNA brindó información de la conformación de las comunidades microbianas de acuerdo al estadio de cultivo del camarón. Estos resultados son un aporte que permitiría incrementar los 40 genomas bacterianos hasta ahora secuenciados en medios marinos.
- Gracias a la técnica molecular de la subunidad 16S rRNA, se determinó específicamente las especies presentes en las muestras de aguas tomadas de los sistemas de pre-criadero.
- Dentro de los genomas bacterianos aislados se encontraron agentes causales de graves patologías en camarones, la información podrá permitir determinar los factores que influyen para que estas actúen de manera negativa en los cultivos.

- Dentro de las bacterias Gram negativas mayormente aislados se encontraron los géneros: ***Rickettsia sp.***, ***Pseudomonas sp.***, ***Aeromonas sp.***, ***Vibrios sp.***, ***Nitrosomonas sp.***, ***Nitrobacter sp.***, ***Escherichia sp.***, ***Acitenobacter sp.***, ***Pseudoalteromonas sp.***, ***Photobacterium sp.*** ***Pleisomonas***, ***Flavobacterium***, ***Klebsiela***, ***Serratia***, ***Shewanella*** y ***Xanthomonas***
- Las comunidades bacterianas Gram negativas difieren de las comunidades bacterianas encontradas mediante los métodos tradicionales con pruebas bioquímicas.
- Entre las especies de bacterias Gram negativas que se espera encontrar en los sistemas de pre-criadero podemos mencionar a ***V. alginolyticus***, ***V. harveyi***, ***V. fluvialis***, ***V. vulnificus***, ***V. campbelli***, ***V. fischeri***, ***V. damsela***, ***V. anguillarum***, ***V. gazogenes***, ***V. mimicus***, ***V. proteolyticus***, ***V. parahaemolyticus***, ***V. splendidus***, ***V. nereis***, ***V. hollisae***, ***V. pelagius***, ***V. natriegens***, ***V. cincinnatiensis***, ***V. cholerae***, ***V. metschikovii***, ***V. furnissii***, ***V. carchirae*** entre otros.

CONCLUSIONES

1. La secuenciación del 16s rRNA es un método rápido y eficaz de identificación bacteriana, de la cual puede beneficiarse varias ramas de la microbiología y aplicarse en diferentes campos.
2. Utilizando la secuenciación del gen 16s se puso de manifiesto que la microbiota era mucho mayor de la que se había descrito hasta la fecha en ambientes semejantes.

3. A medida de los avances científicos y el aumento de los recursos técnicos, el precio será más competitivo, por lo que la caracterización mediante secuenciación tendrá una mayor acogida en el país.

4. Las oportunidades para el descubrimiento de nuevas especies y el desarrollo de los recursos basados en la diversidad microbiana son mayores que antes debido a que la biología molecular es la herramienta que permitirá a los investigadores explorar su distribución y el papel de estos microorganismos en el ambiente.

5. Los hallazgos de nuevos microorganismos aislados del medio evidencia la existencia de cepas nativas que producen una variedad de metabolitos secundarios química y biológicamente interesantes para el desarrollo y producción de nuevos compuestos de importancia en la industria farmacológica, cosmética, de suplementos nutricionales, biomoléculas, biocatalizadores, agroquímicos, química fina, entre otras.

6. Los resultados obtenidos en este proyecto son de importancia para la salud humana, y coincide con los trabajos de otros investigadores

como Blake et al.(1980), ya que los camarones constituyen un reservorio de bacterias potencialmente patógenas para el ser humano.

RECOMENDACIONES

1. Utilizar las comunidades bacterianas encontradas para estudios posteriores sobre sus efectos en cultivos de camarón.
2. Determinar la función de las bacterias en el ambiente para conocer su rol negativo en la producción de post-larvas.

3. Se da paso a futuras investigaciones de caracterización en las demás etapas de desarrollo del camarón y otras especies bioacuáticas de importancia económica.

4. Se debe tomar las medidas de seguridad debidas ya que algunos de estos microorganismos patógenos en camarones pueden causar problemas en la salud humana.

5. Continuar con los estudios de caracterización de bacterias encontradas, dirigiendo las investigaciones a los genes involucrados a la patogenicidad y probiosis

BIBLIOGRAFÍA

(1) Revista Aqua cultura edición 97, Mayo – Junio del 2013 pg. 16

(2) Revista Aqua cultura edición 97, Mayo – Junio del 2013 pg. 17

(3) Aguirre-Guzmán, G. 2004. ¿Los *Vibrio* sp., son agente patógeno importante para el cultivo de camarón? Boletín Informativo del Programa Nacional de Sanidad Acuícola, México 1(25): 1-3.

(4) Chanratchakool, P., Pearson, M., Limsuwan, C. Roberts, R. J. 1995.: Oxytetracycline sensitivity of *Vibrio* species isolated from diseased black tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius. J. Fish Dis. 18, 79–82.

(5) Jayasree, L., Janakiram, P and Madhavi, R. 2006. Characterization of *Vibrio* spp. Associated with Diseased Shrimp from Culture Ponds of Andhra Pradesh (India). *Journal of the World Aquaculture Society*, Volume 37 Issue 4 Page 523.

(6) Libro Blanco del camarón II edición año 1993 pg. 6

(7) Libro Blanco del camarón II edición año 1993 pg. 12

(8) Lightner, D.V. 1996, A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured Penaeid shrimp. Baton Rouge, Louisiana, USA. The World Aquaculture Society.

(9) Morales I., 1992. Observaciones sobre el Síndrome de descamación del epitelio digestivo "Bolitas" en larvas de *Penaeus vannamei* en Ecuador. *Memorias del Primer Congreso Ecuatoriano de Acuicultura*. 18-23 de Octubre de 1992. Guayaquil, Ecuador. Pp. 203-207.

(10) Serrano, J. 1996 Optimización de un modelo experimental en larvas de camarón *Penaeus vannamei* para el control de infección por *Vibrio harveyi* (Cepa E22). Mediante la utilización de *Vibrio alginolyticus*. Tesis Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar Guayaquil, Ecuador. 123p

- (11) Juarez, L.M. 1997. The Zoea-II Syndrome: A recently recognized problema in shrimp hatcheries. IV Simposio Centroamericano de Acuicultura. 22-24 de Abril de 1997. Tegucigapa, Honduras. pp. 24-30
- (12) Pantoja C.R., Lightner, D.V., & Redman, R.M. 1997. Morphological pathology of the Zoea-II síndrome of penaeid shrimp. IV Simposio Centroamericano de Acuicultura 22-24 de Abril de 1997. Tegucigapa, Honduras. pp. 182-184.
- (13) Mohny, L. L., D. V. Lightnr and T. A. Bell. 1994. An epizootie of vibriosis in Ecuadorian pond reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea: Decapoda). J. World Aquaculture Society. 25:116-125.
- (14) Yasuda, K. & Kitao, T. 1980. Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *Penaeus japonicus*. Bate. Acuaculture, 19,229-234.
- (15) Browdy, C.L. y Bratvold, D. 1997. Pond microbial communities: significance, assesment, and management. IV Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. 22-10-1997.
- (16) Lightner, D.V. y Redman, R.M. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture, 164: 201-220.

(17) Cheong, L., Chan, F.K., Chou, R., Wong, F.J. and Lim, A. 1988. Observations on the culture of shrimps in raceways in Singapore. Singapore J. Pri. Ind., 16: 1-12.

(18) Clifford, H.C. 1985. Semi-intensive shrimp farming. In: G.W. Chamberlain, M.G. Haby and R.J. Miget (eds.), Texas Shrimp Farming Manual. Texas Agricultural Extension Service, Corpus Christi, Texas, pp. IV 13-40.

(19) Samocha, T.M., Lawrence, A.L. and Biedebach, J.M. 1990. A new concept for water management strategy for nursery of penaeid postlarvae in raceways. Ann. Meeting World Aquaculture Soc., Halifax, Nova Scotia. Abstract only.

(20) Sandifer, P.A., Hopkins, J.S. and Stokes, A.D. 1988. Intensification of shrimp culture in earthen ponds in South Carolina: progress and prospects. J. World Aquaculture Soc.. 19: 218-226.

(21) Villalon, J.R. 1993. Commercial semi-intensive penaeid growout

techniques in Ecuador. pp. 237-273.

(22) Sturmer, L.N. and Lawrence, A.L. 1988. Feeding regimes for enhanced *Penneus vannmei* production in intensive nursery raceways. Ann. Meeting World Aquaculture Soc., Honolulu, Hawaii.

(23) Sturmer, L.N., Samocha, T.M. and Lawrence, A.L. 1992. Intensification of penaeid nursery systems. In: A.W. Fast and L.G. Lester (eds.), Culture of Marine Shrimp: Principles and Practices. Elsevier, Amsterdam, pp. 321-344.

(24) Sturmer, LN., T.M. Samocha, and A.L Lawrence. 1992. Intensification of penaeid nursery systems. pp. 32321-344.

(25) Aguirre-Guzmán, G. & F. Ascencio. 2000. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. pp: 333-348 In Pandalai S.G. (ed.), Recent Research Developments in Microbiology, 4. Research Signpost. Trivandrum 8, India, 430 pp.

(26) Philippi Luz, A. 1992. Estudios sobre la septicemia bacteriana en camarones peneidos, con especial referencia a la patogénesis experimental. Tesis de grado para optar al título de Magister Scientiarum en Medicina Veterinaria - Mención Patobiología Acuática. Universidad Central. Maracay, Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. 180 pp.

(27) Alvarez, J. D. 1997. Studies on Venezuelan fish and shrimp associated bacteria. A thesis presented for the degree of Doctor of Philosophy. Department of Biological Sciences, Heriot-Watt University. Edinburgh, Scotland, U.K. 137 pp.

(28) Austin, B. and D. Allen - Austin. 1982. Microbiology of laboratory hatched brine shrimp (*Artemia*). *Aquaculture*. 26:369-383.

(29) Carvaca-Castro, F. 1990. Manual Práctico de Bacteriología Marina. Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). FONAGRE-CAF. Guayaquil, Ecuador. 78 p.

(30) Simdu, U., K. Ashino and E. Kaneko. 1971. Bacterial flora of phyto- and zoo-plankton in the inshore water of Japan. *Can. J. Microbiol.* 17:1 157-160.

(31) Samuel Baron et al 1996. "Medical Microbiology" 4th Edition. University of Texas Medical Branch at Galveston.

(32) Kenneth Ryan et al 2003. "Sherris Medical microbiology - An Introduction to Infectious Diseases" 4th edition, Editorial McGraw-Hill Medical.

(33) Desmarchelier, P.M. 1997. Pathogenic Vibrios. *In* A.D. Hocking, G. Arnold, I. Jenson, K. Newton and P. Sutherland, eds. *Foodborne Microorganisms of Public Health Significance 5th Edition*, p 285 -312. North Sydney, Australian Institute of Food Science and Technology Inc.

(34) Jayasree, L., Janakiram, P and Madhavi, R. 2006. Characterization of *Vibrio* spp. Associated with Diseased Shrimp from Culture Ponds of Andhra Pradesh (India). *Journal of the World Aquaculture Society*, Volume 37 Issue 4 Page 523.

(35) Lavilla-Pitogo, CR., Leano, EM., Paner, MG. 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp *Penaeus monodon* associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. *Aquaculture* 164:337–349.

(36) Brock, J.A. and Lightner, D.V. 1990. Chapter 3: Diseases of Crustacea.

In: O. Kinne (ed.) Diseases of Marine Animals Vol. 3, Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg. pp. 245-424.

(37) Owens, Leigh; Busico-Salcedo, Nancy 2006. "Vibrio harveyi: Pretty Problems in Paradise (Chapter 19)". In Thompson, Fabiano; Austin, Brian; Swings, Jean. The Biology of Vibrios. ASM Press.

(38) Baticados, M.C.L., Lavilla-Pitogo, C.R., Cruz-Lacierda, E.R., de la Pena, L.D. and Sunaz, N.A. 1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. Dis. Aquat. Org. 9: 133-139.

(39) Álvarez, J.D., B. Austin, M. Álvarez & H. Reyes. 1998. *Vibrio harveyi*: a pathogen of penaeid shrimp and fish in Venezuela. J. Fish Dis. 21(4): 313-316.

(40) Honda, T., and T. Lida. 1993. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins.

(41) Sudheesh, P.S. & H.S. Xu. 2001. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases. *Aquaculture* 196(1-2): 37-46.

(42) Thampuran, N., Surendran, P.K., 1998. Occurrence and distribution of *Vibrio vulnificus* in tropical fish and shellfish from Cochin (India).

(43) Centers for Disease Control and Prevention. Summary of human *Vibrio* isolates reported to CDC, 2004.

(44) Alday-Sanz. V., Roque, A., Turnbull, JF. 2002. Clearing mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org* 48:91–99.

(45) Lavilla-Pitogo, C.R., Baticados, C.L., Cruz-Lacierda, E.R. and de la Pena, L. 1990. Occurrence of luminous bacteria disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture* 91: 1-13.

(46) Baticados, M.C.L., Lavilla-Pitogo, C.R., Cruz-Lacierda, E.R., de la Pena, L.D. and Sunaz, N.A. 1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V splendidus* isolated from diseased *Penaeus*

monodon larvae and rearing water. Dis. Aquat. Org. 9: 133-139.

(47) Jiravanichpaisal, P., T. Miyazaki & Limsuwan. 1994. Histopathology, biochemistry, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. J. Aquat. Anim. Health 61(1): 27-35.

(48) de la Peña, L.D., Kakai, T., Muroga, K. 1995. Dynamics of *Vibrio* sp PJ in organs of orally infected kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. Fish. Pathol. 30: 39-45.

(49) Lightner, D.V. 1993. Diseases of cultured penaeid shrimp. In: J.P. McVey (ed.) CRC Handbook of Mariculture, Second edition, Volume 1, Crustacean Aquaculture. CRC Press Inc., Boca Raton, FL. p. 393-486.

ANEXOS

ANEXO 1 Protocolo de extracción de ADN

- 1.- De los productos activados (cada uno con 10 ml), tomar 400 µl del sobrenadante
- 2.- Adicionar 400 µl de tampón CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) y 10 µl de proteinasa K (Invitrogen ®) (concentración final 20 mg. ml⁻¹).
- 3.- Agitar y llevar a “baño maría” a 55°C por 1 hora (se homogeniza en cada fase para ayudar a la lisis celular).
- 4.- Se deja enfriar las muestras a temperatura ambiente.
- 5.- Centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos y tomar 400 µl de sobrenadante en tubos de 1,5 ml estériles.
- 6.- Adicionar 500 µl de fenol – cloroformo, mezclar y centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos, recuperar el sobrenadante en tubos nuevos.
- 7.- Agregar 400 µl de cloroformo, centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos, y

recuperar el sobrenadante en tubos nuevos.

8.- Agregar 400 μ l de Isopropanol puro, y mantener en frío por 12 horas para precipitar el DNA, y centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos.

9.- Eliminar el sobrenadante y hacer un lavado del pellet con 100 μ l de etanol al 70%.

10.- Centrifugar a 12000 rpm por cinco minutos y eliminar el sobrenadante, se seca el pellet a 40°C por 10 minutos, y resuspender el DNA en 50 μ l de agua milliQ.

ANEXO 2 Protocolo de purificación de ADN bacteriano

1.- Adicionar 500 μ l de resina a 30 μ l de muestra (DNA), y agitar aproximadamente por 2 minutos.

2.- Tomar 1 ml de muestra y filtrar.

3.- Filtrar 2 ml de isopropanol al 80% para lavar el DNA, centrifugar la muestra filtrada a 12000 rpm por 2 minutos.

4.- Dejar las muestras a temperatura ambiente por 5 minutos.

5.- Colocar los filtros en tubos estériles de 1,5 ml y adicionó 50 μ l de agua destilada doblemente filtrada a 68°C.

6.- Dejar incubar las muestras por minutos.

7.- Centrifugar nuevamente a 12000 rpm por 2 minutos.

8.- Recuperar el sobrenadante en tubos nuevos.

ANEXO 3 Protocolo de purificación del producto de PCR

1 . Añadir 5 volúmenes de tampón PB a 1 volumen de la muestra de PCR y mezcle. No es necesario para eliminar el aceite mineral o queroseno .

Por ejemplo , añadir 500 l de tampón PB de 100 l de muestra de PCR (no incluyendo el aceite) .

2 . Coloque una columna de centrifugación QIAquick en un tubo recolector de 2 ml provisto.

3 . Para unirse al ADN , aplicar la muestra a la columna QIAquick y se centrifuga durante 30-60 s.

4 . Deseche el filtrado. Colocar la columna QIAquick vuelta en el mismo tubo.

Tubos de recogida se vuelven a utilizar para reducir los residuos de plástico .

5 . Para lavar, añadir 0,75 ml de tampón PE a la columna QIAquick y se centrifuga durante 30-60 s .

6 . Deseche el filtrado y coloque la columna de nuevo QIAquick en el mismo tubo . Centrifugar la columna para un adicional de 1 minuto a la velocidad

máxima .

Nota: etanol residual de tampón PE no se eliminará por completo a menos que el flujo a través se descarta antes de esta centrifugación adicional.

7 . Colocar la columna QIAquick en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml limpio.

8 . Para eluir el ADN , añadir 50 l de tampón EB (10 mM de Tris · Cl , pH 8,5) o H₂O para el centro de la membrana QIAquick y se centrifuga la columna durante 1 min . Alternativamente , para aumentar la concentración de ADN , añadir 30 l de tampón de elución el centro de la membrana QIAquick , se deja reposar la columna durante 1 min y , a continuación, centrifugar .

Nota:

- Añadir etanol (96-100%) al Buffer PE antes de su uso (véase la etiqueta del frasco de volumen).

- Todos los pasos de centrifugación son a $\geq 10.000 \text{ xg}$ ($\sim 13.000 \text{ rpm}$) en una microcentrífuga de mesa convencional.

ANEXO 4 Protocolo para la condiciones para la secuenciación

1.- Prepare un mix de reacción de secuenciación forward o reverse en un tubo en hielo.

Componente	Volumen de cada reacción
BigDye® Direct Sequencing Master Mix	2.0 µl
Un primer secuenciador	1.0 µl
<ul style="list-style-type: none">• BigDye® Direct M13 Fwd Primer or• BigDye® Direct M13 Rev Primer	
Volumen total para cada reaccion	3.0 µl

2.- Por cada reacción de secuenciación , agregar 3 del mix de reacción de secuenciación en la cantidad apropiada en la respectiva placa de reacción forward o reverse.

3.- Selle la placa de reacción con cinta adhesiva, luego gire brevemente la

placa.

4.- Corra las reacciones en el termociclador:

Etapa	9700 Thermal cycler	
Espera	37 °C	15 min
Espera	80 °C	2 min
Espera	96 °C	1min
	96 °C	10 sec
Ciclo (25 ciclos)	50 °C	5 sec
	60 °C	4 min
Espera	4 °C	∞

5.- Después que las reacciones del ciclo secuencias estén completas, gire un poco la placa.

ANEXO 5: Protocolo de purificación BigDye XTerminator®

1.- Gire la placa de reacción a 100 x g por 1 minuto, luego remueva el sello.

2.- Prepare la pre mezcla con la solución SAM™ y la solución XTerminator® en un tubo apropiado:

Componente	Volumen para 1 muestra	Volumen para 96 muestras
Solución SAM™	45 µL	4752 µL
Solución XTerminator®	10 µL	1056 µL
Volumen total	55 µL	5808 µL

a. Agregue la solución SAM™ a un tubo usando una pipeta convencional.

Nota: Asegúrese que no hayan partículas en la solución SAM™ antes de pipetear. Si hay partículas caliente la solución SAM™ a 37 °C y mezcle para re suspender. Enfríe a temperatura ambiente antes de usar.

b. Centrifugue el contenedor de la solución XTerminator® a máxima velocidad por al menos 10 segundos, hasta que la solución sea homogénea.

c. Usando una punta de pipeta ancha, aspire la solución XTerminator®

Importante: Evite pipetear por la superficie del liquido.

d. Mezcle los reactivos hasta homogenizar.

3.- Agregue 55 µL de la mezcla de las soluciones SAM™/ XTerminator® a cada muestra.

4.- Selle la placa usando uno de los siguientes métodos, luego verifique que este bien sellado:

- Rollo adhesivos MicroAmp®
- Sello por calor a 160°C por 1.5 segundos

5.- Centrifugación de la placa por 20 minutos, usando las siguientes condiciones:

Centrifugador	Velocidad
Vortex–Genie® 2 digital	1800 rpm
IKA MS3 Digital	200 rpm †
IKA Vortex 3	Ajuste 5 ‡
Taitec MicroMixer E-36	Máxima
Union Scientific Vertical Shaker	Ajuste 100 §

† Ponga el centrifugador en modo B

‡ Use el ajuste máximo sin que permita que el centrifugador se mueva

§ Añadir mas placas, si es necesario, por los requerimientos de masa.

6.- En el recipiente giratorio de la centrifuga , centrifugue la placa a 1000x g por 2 minutos.

ANEXO 6: Protocolo para la corrida de electroforesis

1.- Use el Dye Set Z y el Sequencing Install Standard, BigDye® Terminator v3.1 Kit para crear el BigDye® Direct spectral calibration information para usar los datos.

Nota: La información de espectro del Dye Set Z puede ser aplicada al BigDye® Direct data sin correr la calibración del espectro.

2.- Use los archivos de movilidad y calibración del BigDye® para una lectura óptima con el BigDye® Direct Cycle Sequencing Kit.

Polímero	Vector	Modulo de corrida	Archivo de movilidad
POP -7™ polymer	36 cm	RapidSeq36_POP7	KB_3130_POP7_BDTv3direct.mob
POP -7™ polymer	36 cm	UltraSeq36_POP7	KB_3130_POP7_BDTv3direct.mob
POP -7™ polymer	50 cm	StdSeq50_POP7	KB_3130_POP7_BDTv3direct.mob
POP -7™ polymer	50 cm	FastSeq50_POP7	KB_3130_POP7_BDTv3direct.mob
POP -7™ polymer	36 cm	BDX_RapidSeq36_POP7	KB_3130_POP7_BDTv3direct.mob

POP -7 TMpolymer	36 cm	BDX_UltraSeq36_POP7	KB_3130_POP7_BDTv 3direct.mob
POP -7 TMpolymer	50 cm	BDX_StdSeq50_POP7	KB_3130_POP7_BDTv 3direct.mob
POP -7 TMpolymer	50 cm	BDX_FastSeq50_POP7	KB_3130_POP7_BDTv 3direct.mob
