

574.23
N.371

**ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA
DEL LITORAL**

**Facultad de Ingeniería Marítima
y Ciencias del Mar**

**“Determinación de los principales tipos
de bacterias que afectan el cultivo de
larvas de penaeus vannamei en sus
diferentes estadios larvarios”**

**Tesis de Grado
Previa a la Obtención del Título de
ACUICULTOR**

**Presentada por
María de Lourdes Néder Muñoz**

Guayaquil - Ecuador

1989



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

DEDICATORIA

A mis padres y

A mis hermanos

AGRADECIMIENTO

A todas las personas que han colaborado para la realización de este trabajo, en especial al Dr. Fernando Carvaca, quien me asesoró, y a mi Director de Tesis, MSc. Edgar Arellano.

Un reconocimiento especial a la Compañía Pesquera "Acuesemillas", al Ing. Joe Tabrah, Gerente General, y a su personal técnico; a todos ellos, muchas gracias.

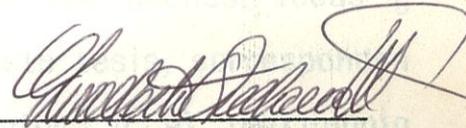


BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

MIEMBROS DEL TRIBUNAL CALIFICADOR



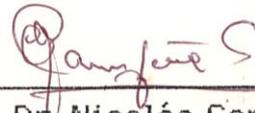
Ing. Raúl Coello
Presidente



MSc. Edgar Arellano
Director



Dr. Jorge Calderón
Principal



Dr. Nicolás Campaña
Principal



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE INGENIERIA
QUIMICA Y CIENCIAS DEL MA...

DECLARACION EXPRESA

La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, corresponden exclusivamente a su autor, y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado correspondera a la Escuela Superior Politecnica del Litoral".

(Reglamento de Exámenes y Títulos Profesionales de la ESPOL).

Ma de Lourdes Néder

María de Lourdes Néder Muñoz

RESUMEN

La presencia de bacterias en los tanques de cultivo puede ser una de las causas de la incidencia de enfermedades en los mismos; en este trabajo se estudian los tipos de bacterias presentes en los cultivos de larvas de camarón, desde nauplio hasta post-larva, su grado de incidencia y su relación con el grado de sobrevivencia de los animales.

Los resultados fueron obtenidos usando métodos estándares de microbiología, mediante contajes totales de ufc/ml y la determinación del tipo de bacteria mediante pruebas bioquímicas.

Se encontró que los contajes totales de ufc/ml en los tanques de cultivo se van incrementando a un nivel máximo a partir del estadio de post-larva.

Las principales especies de bacterias encontradas fueron: ① Pseudomonas, ② Vibrio, ③ Aeromonas, ④ Acinetobacter y ⑤ Citophaga, en un alto porcentaje en los tanques de cultivo; se detectó, además, otras especies de bacterias como Flavobacterium, Cromobacterium y Micrococcus, encontrándose relación con los tipos de alimento suministrados al tanque.

En las muestras de Artemia se detectó principalmente Vibrio, Aeromonas, y Acinetobacter; en el agua hubo predominio de Pseudomonas, Aeromonas y Acinetobacter; en algas predominaron Pseudomonas y Aeromonas; y, en el alimento seco, Aeromonas y Acinetobacter.

En este trabajo se determina el grado de incidencia en los cultivos y sus posibles fuentes de contagio, así como también prevenciones en el sistema de manejo.

I.- PREPARACIÓN DE LOS MATERIALES A UTILIZARSE.

- | | |
|--|----|
| 1.1 - Selección de medios a utilizar | 15 |
| 1.2 - Esterilización del material de vidrio. | 18 |
| 1.3 - Preparación de medios de cultivo | 19 |
| 1.4 - Selección de los medios de cultivo de larvas | 27 |

II.- SIEMBROS BACTERIOLÓGICOS

- | | |
|--|----|
| 2.1 - Técnica de siembra en Petri dishes | 28 |
| 2.2 - Técnica de siembra en tubos | 31 |

III.- IDENTIFICACIONES BACTERIOLÓGICAS

- | | |
|---|----|
| 3.1 - Protocolo de aislamiento | 33 |
| 3.2 - Cultivos de siembra | 35 |
| 3.3 - Observaciones microscópicas color, aspecto, tamaño, forma, etc. | 36 |
| 3.4 - Observaciones microscópicas Tinción de Gram. | 37 |

INDICE GENERAL

	pag.
RESUMEN	V
INDICE GENERAL	VII
INDICE DE TABLAS	IX
INDICE DE CUADROS	X
INTRODUCCION	11
I.- PREPARACION DE LOS MATERIALES A UTILIZARSE.	52
1.1.- Seleccin de equipos a utilizar.	15
1.2.- Esterilizacin del material de vidrio.	18
1.3.- Preparacin de medios de cultivo.	19
1.4.- Seleccin de los tanques de cultivo de larvas.	27
II.- SEGUIMIENTOS BACTERIOLOGICOS.	63
2.1.- Toma de muestras: Preparacin.	28
2.2.- Tecnicas de siembra e incubacin.	31
III.- IDENTIFICACIONES BACTERIANAS.	80
3.1.- Metodos de aislamiento.	33
3.2.- Contajes Bacterianos.	35
3.3.- Observaciones macroscopicas: color, aspecto, tamao, produccin de pigmentos.	36
3.4.- Observaciones microscopicas: Tincin de Gram.	37

INDICE DE TABLAS

	pag.
TABLA 1.- Artemia, Contajes totales ufc/ml.	53
TABLA 2.- Agua, Contajes totales ufc/ml.	54
TABLA 3.- Algas, Contajes totales ufc/ml.	54
TABLA 4.- Alimento Seco, Contajes totales ufc/ml.	55
TABLA 5.- Tipo de Alimento Seco tomado en las muestras, Porcentajes.	55
TABLA 6.- Artemia, Porcentaje por especies encontradas.	56
TABLA 7.- Agua, Porcentaje por especies encontradas	57
TABLA 8.- Algas, Porcentaje por especies encontradas.	58
TABLA 9.- Alimento Seco, Porcentaje por especies encontradas.	59
TABLA 10.- Tubería de Algas, Porcentajes por especies encontradas.	60
TABLA 11.- Tubería de Agua, Porcentajes por especies encontradas.	60
TABLA 12.- Tubería de Aire, Porcentajes por especies encontradas.	60

INDICE DE CUADROS

	pag.
CUADRO 1.-Contajes Totales en Placas de Agar PCA, TCBS, MS Y MCK en ufc/ml. x 1000.- Tanque 1.	67
CUADRO 2.-Contajes Totales en Placas de Agar OZR, PCA, TCBS, MS Y MCK en ufc/ml. x 1000.- Tanque 2.	68
CUADRO 3.-Contajes Totales en Placas de Agar OZR, PCA, TCBS, MS Y MCK en ufc/ml. x 1000.- Tanque 3	69.
CUADRO 4.-Porcentaje de Incidencia de las colonias en el Tanque 2 en sus estadíos larvarios.	70
CUADRO 5.-Porcentaje de Incidencia de las colonias en el Tanque 3 en sus estadíos larvarios.	71
CUADRO 6.-Porcentajes de colonias consideradas dentro del grupo Otros para el Tanque 3.	72



FACULTAD DE INGENIERIA
MARITIMA Y CIENCIAS DEL MAR

INTRODUCCION

En los últimos años, la Acuicultura se ha visto dramáticamente incrementada en importancia, debido a la gran demanda de productos de consumo humano que tienen su origen en ella, lo que conduce a que la producción sea cada vez mayor, para lo cual deben utilizarse técnicas de cultivo semi-intensivos e intensivos. En Ecuador, primer país productor de camarón (1988), esta situación tiende a influir en el manejo de los sistemas actuales, y al desarrollarse estas nuevas técnicas de cultivo se está incrementando las densidades de las poblaciones, lo cual lleva a una mayor ocurrencia de enfermedades.

Se ha considerado a las enfermedades como uno de los factores biológicos que pueden limitar e impedir el desarrollo del cultivo de camarón (3). En el desarrollo de una enfermedad intervienen tres factores: huésped, agente y ambiente. Cuando uno de los tres tiene un comportamiento inesperado, todo el sistema se desequilibra y es en ese momento cuando surge el problema de la enfermedad.

Las enfermedades pueden ser causadas por agentes de etiología infecciosa y no infecciosa. Los agentes no infecciosos son normalmente factores ambientales, pero los de etiología infecciosa pueden ser: virus, hongos, protozoarios y/o bacterias.

Pocas investigaciones se han llevado a cabo en el Ecuador sobre el estudio de bacterias que puedan ser de carácter patógeno y que estén presentes en los cultivos de larvas de camarón penaeido, pero se prevee que la presencia de las especies Vibrio y Pseudomona pueden ser consideradas de mayor importancia debido a su incidencia en los sistemas de cultivo como causantes de enfermedades.

"En cada caso reportado de infecciones bacteriales en camarón penaeido, bacilos fermentativos, móviles, gram-negativos, oxidasa-positiva, han sido aislados. La mayoría de las especies aisladas han sido Vibrio; otros bacilos gram-negativos, incluyendo Pseudomonas spp. y Aeromonas spp. pueden ocasionalmente estar involucrados en enfermedades de síndrome bacterial en camarón penaeido (13)".

Posiblemente, las especies de Vibrio han recibido mayor atención, ya que han sido la causa de enfermedades humanas y "la fuente probable de contagio es la ingestión de peces o mariscos o la exposición a aguas contaminadas (5)"

Las especies de Pseudomona también han sido estudiadas, ya que se han aislado de camarones enfermos (3), se ha detectado su presencia en los ambientes marinos y su afinidad con los cultivos algales.

"Junto con estas especies, también han sido aisladas Aeromonas y Flavobacterium de camarones enfermos, y Aeromonas ha sido aislada también como parte de la flora normal de los ambientes marinos (3)"

"Entre los factores que inhiben el establecimiento del patógeno está la misma flora microbiana normal, con la que el patógeno debe competir por los nutrientes y el espacio vital. Si se altera o se elimina la flora normal con una terapia antimicrobiana será más fácil para el patógeno realizar una colonización exitosa (4)".

El presente estudio fue llevado a cabo en la Compañía Pesquera "Acuesemillas", localizada en el Km. 4 de la vía San Pablo - Monteverde, en el sector denominado Pacoa, (Provincia del Guayas, Ecuador), en donde el grado de sobrevivencia en los cultivos de larvas considerado desde Nauplio hasta la cosecha de Post-Larvas es del 65%.

Con las pruebas realizadas en este estudio, se trató de determinar mediante métodos estándar de análisis bacteriológicos, los principales tipos de bacterias que afectan el cultivo de larvas, su relación con el grado de sobrevivencia de los mismos, en qué grado inciden las bacterias en el cultivo y revisar las posibles fuentes de contaminación en el proceso de cría de larvas en laboratorio.

Este estudio consta de tres fases: una primera fase en que se realizan contajes totales de colonias presentes en el tanque de cultivo (Tanque 1), la segunda fase corresponde al Tanque 2 en que se se realizaron contajes totales de colonias, aislaciones e identificaciones de las mismas por medio de pruebas bioquímicas, y la tercera fase (Tanque 3), en que se realizaron contajes totales de colonias, aislaciones, identificaciones y un seguimiento microbiológico de todo el sistema para determinar las posibles fuentes de contaminación.

Cabe anotar que los tanques 1 y 2 corresponden a la fase final del período de producción, antes del período de secado y desinfección completa del laboratorio, y el tanque 3 corresponde al inicio del nuevo período de producción.



BIBLIOTECA
ING.
QUÍMICA

CAPITULO I

PREPARACION DE LOS MATERIALES A UTILIZARSE

1.1.- Selección de Equipos a Utilizar.

1.1a.-Materiales y Químicos

Entre los materiales y químicos utilizados se encuentran los siguientes:

Bactopeptona

Cloruro de Sodio

Extracto de Levadura

Trypticasa Pancreática Digestiva

Agar BACTERIOLOGICO

Agar TCBS ✓

Agar PLATE COUNT

Agar MANITOL SALT

Agar MAC CONKEY ✓

Agar TRIPLE SUGAR IRON

Agar UREA

Agar CITRATO DE SIMONS

Reactivos para TINCION DE GRAM

Reactivo de CITOCROMO OXIDASA

Reactivo de KOVAC

Agua Oxigenada de 10 vol.

Aceite de Inmersión

Alcohol

Tirillas de Papel Filtro

Mechero Bunsen y de Alcohol

Cajas Petri

Tubos de Ensayo

Aza de Platino

Probetas Graduadas

Vasos de Precipitación

Campana de Incubación

Placas Portaobjetos

Picetas

Fiolas

Pipetas

1.1b.-Equipo de Toma de Muestra.

La toma de la muestra de animales y agua del tanque se llevó a cabo por medio de tubos de vidrio previamente esterilizados ayudándose en la succión con una pera de caucho, tomando la muestra desde el vaso de precipitación

que contiene los animales sacados del tanque y colocados en tubos de ensayo estériles con tapones de algodón y gasa.

Para muestras de tuberías se usó isopos de algodón y tubos de ensayo previamente esterilizados.

Para muestras de agua se usó jeringas desechables y dispositivos con filtros de membrana de 0.46 micras y tubos de ensayo.

1.1c.-Equipo de Esterilización.

Para la esterilización de los materiales se utilizaron los siguientes métodos:

✓ -Desinfección: La destrucción de los micro-organismos usando desinfectantes como alcohol.

✓ -Esterilización por Autoclave: Utilizando el autoclave que es como una olla de presión, que actúa a través de vapor y calor, bajo una presión de $15 \text{ lb./pulg.}^2 \text{ (psi)}$, y una temperatura de 121°C. , por medio de vapor de agua.

✓ -Esterilización: El horno esterilizador, que es similar en construcción a un horno de cocina, tiene un control termostático que regula la temperatura, actúa por medio de calor seco con temperaturas de 180°C.

✓ -Incineración: El calentamiento a la incandescencia en la llama del mechero Bunsen y manteniendo allí hasta el rojo vivo.

1d.-Equipo de Maceración. ✕

El equipo de maceración consiste de un tubo de vidrio que actúa como mortero y un pilón de diámetro ajustable al diámetro interno del macerador. El equipo es marca PYREX resistente a altas temperaturas y de grueso cristal.

1e.-Equipo de Incubación. ✓

El aparato usado para la incubación consiste de una campana construida de madera provista en su parte superior delantera de vidrio para tener una mejor observación al trabajar.

La campana está diseñada para proveer calor por medio de luz con dos focos de 60 watts colocados en la parte superior con lo cual se logra mantener una temperatura de 35 - 37°C.; o ambiente, estando los focos apagados.

2.- Esterilización del Material de Vidrio ✓

El material de vidrio utilizado está compuesto de placas petri, tubos de ensayo, probetas graduadas, fiolas de 250ml., 500ml. y 1000ml., tubos de vidrio, vasos de precipitación de 100ml. y 500ml., y equipos de maceración.

Las placas petri son lavadas con cloro y detergente, se enjuagan, se dejan secar toda la noche y luego son

esterilizadas en el Horno Esterilizador a una temperatura de 180°C. por 45 min. a 1 hora.

Las placas son forradas con papel de empaque antes de la esterilización.

Lo mismo se hace con el resto de materiales, que son lavados con cloro y detergente y luego son esterilizados, a excepción de las fiolas que sólo se lavan con detergente y se esterilizan a 180°C. por 45 min. a 1 hora.

Porque?

Los maceradores son esterilizados rociándolos con alcohol y flameándolos a la llama del mechero Bunsen hasta que el alcohol haya desaparecido.

1.3.- Preparación de Medios de Cultivo

1.3a.- Consideraciones Generales.

Hay ciertas consideraciones generales que deben tomarse para la preparación de los medios de cultivo, como por ejemplo: es importante evitar carbonizar el medio por el sobrecalentamiento de un solo lugar en la fiola, la mezcla debe ser homogénea y libre de grumos. Un procedimiento recomendado para preparar agar es, adherir la cantidad requerida del producto deshidratado a la mitad del volumen de agua requerida, después de una fuerte agitación, adherir la otra mitad restante de agua.

Los medios que se autoclavan deben ser hechos por 15 min. a 15 psi/121°C. y no más de eso; de igual manera no deben permanecer en el interior del autoclave mientras éste mantiene aún temperaturas altas, luego del proceso de esterilización, ya que el medio presenta sedimentación.

1.3b.-Composición de los Medios de Cultivo.

- **Agua:** ésta permite reacciones químicas, dando lugar a que los fluidos entren y salgan de las células más rápidamente.

- **Cloruro de Sodio ClNa:** u otras sales, son a menudo adheridas al medio para efectos de isotonicidad. Una ausencia de sales conduce a un efecto hypotónico (destrucción de la membrana de la célula bacterial), y demasiadas sales causa deshidratación de la célula.

- **Peptonas:** son una buena fuente de nitrógeno rápidamente disponible.

- **Buffers:** son sustancias que resisten o controlan cambios de pH en un sistema. Son necesarios para mantener un pH constante en medios de cultivo.

Ciertas bacterias crecen en medios alcalinos; mientras otras crecen en medios ácidos. Ej.: Fosfatos ácido y básico de sodio.

- **Indicadores:** Son sustancias químicas que cambian de color de acuerdo a la acidez o alcalinidad de la solución a la cual son adheridos. En los medios de cultivo, son usados en la detección de la producción de acidez o alcalinidad por los micro-organismos. Ej.: Azul de Bromotimol, Rojo de Fenol, etc.
- **Agentes Solidificantes:** Son introducidos en el medio para el propósito de endurecimiento. Ejemplos son el agar, gelatina, yema de huevo y suero.
- **Agentes Selectivos:** Son químicos especiales introducidos en el medio para la inhibición de algunos tipos de bacterias mientras permiten el crecimiento de otros. Ej.: Sales biliares, Antibióticos, etc.

1.3c.-Preparación de los Medios de Cultivo

Los medios de cultivo utilizados y su modo de preparación son como sigue:

- **Caldo de Triptona.**- Trypticasa pancreática digestiva, es un digestivo pancreático de caseína, utilizado como una fuente de nitrógeno en medios de cultivo formulados para aislar bacterias.

El medio preparado presenta un color ámbar claro, transparente sin precipitación.

Se prepara añadiendo 7.5 gr. de Trypticasa Pancreática Digestiva en 250 ml. de agua preparada en un 80% de agua salada y 20% de agua destilada, se agita hasta una completa disolución. Se coloca 5 ml. en tubos de ensayo con tapones de algodón y se autoclavan a 15 psi/121°C por 15 min.

- **Medio Oppenheimer Zobell Reduced (OZR).**- Es un medio no selectivo para contajes totales de placa, en el cual las colonias toman características típicas debido al enriquecimiento del mismo.

Se prepara de la siguiente manera:

Extracto de Levadura

Trypticasa Pancreática Digestiva

Agar Bacteriológico

Agua Salada Estéril

Agua Dulce Estéril

Disolver lo anterior en un flask y llevar a ebullición para una completa disolución y autoclavar a 15 psi/121°C. por 15 min.

Luego de autoclavar por 15 min., antes de que el agar se haya enfriado completamente, llenar las cajas petri usando técnicas asépticas.

- **Medio Plate Count Agar (PCA).**- Es un medio usado para la enumeración de bacterias en muestras de agua.

Ingredientes por litro:

Extracto de levadura.....	2,5 gr.
Triptona.....	5 gr.
Dextrosa.....	1 gr.
Agar.....	15 gr.

Se prepara disolviendo 2.25% de medio en agua destilada, adicionando 3% de cloruro de sodio, o en agua salada estéril directamente. Llevar a ebullición hasta su completa disolución y autoclavar a 15 psi/121°C. por 15 min.

El medio preparado presenta un color ámbar claro, ligeramente opalescente, sin precipitado.

- **Medio Agar Mac Conkey (MCK).** - Este es un medio de siembra selectivo recomendado para el aislamiento y diferenciación entre organismos fermentadores de lactosa y no fermentadores de lactosa.

Los organismos capaces de fermentar la lactosa presentan colonias de color rojo. Las colonias de organismos que no fermentan lactosa permanecen incoloras y translúcidas. La selectividad del medio se debe a la presencia de cristal violeta y sales biliares que inhiben casi o completamente el crecimiento de organismos gram-positivos.

Se disuelve 5% de medio en agua destilada, agregar 2.5% de cloruro de sodio, calentar hasta completa disolución y autoclavar a 15 psi/121°C por 15 min.

La fórmula del medio es:

Bacto peptona.....	17 gr.
Peptona proteosa.....	3 gr.
Lactosa.....	10 gr.
Sales Biliares.....	1.5 gr.
Cloruro de Sodio.....	5 gr.
Agar.....	13,5 gr.
Rojo neutro.....	0,03 gr.
Violeta cristal.....	0,001 gr.

El medio preparado presenta una coloración rojizo-púrpura, ligeramente opalescente.

-Medio Thiosulfato, Citrato, Sales Biliares, Sucrosa (TCBS). - Este es un medio selectivo que se utiliza para el cultivo y aislamiento de especies de vibrio.

Disolver 8.9% de medio en agua destilada, adicionar 2% de cloruro de sodio y llevar a ebullición por 3 min. con continua agitación. No autoclavar el medio, dejar enfriar y preparar las placas petri.

La fórmula del medio es:

Extracto de Levadura.....	5 gr.
Peptona proteosa.....	10 gr.
Citrato sódico.....	10 gr.
Tiosulfato sódico.....	10 gr.
Bilis de buey.....	8 gr.
Sacarosa.....	20 gr.
Cloruro sódico.....	10 gr.
Citrato férrico.....	1 gr.
Azul de bromo timol.....	0.04 gr.
Azul timol.....	0.04 gr.
Agar.....	15 gr.

El medio preparado presenta un color verde hoja, ligeramente opalescente sin precipitado ni residuos.

- **Medio Manitol Salt (MS).**- Es un medio selectivo usado para el aislamiento de estafilococos patógenos. El crecimiento de la mayoría de bacterias diferentes a estafilococos queda inhibido por la alta concentración de sal.

Se disuelve 11.1% de medio en agua destilada, llevar a ebullición hasta que el agar se haya disuelto completamente y autoclavar a 15 psi/121°C por 15 min.

Su fórmula es como sigue:

Peptona proteosa.....	10 gr.
Extracto de carne.....	1 gr.
D-Manitol.....	10 gr.
Cloruro sódico.....	75 gr.
Agar.....	15 gr.
Rojo fenol.....	0.025 gr.

El medio preparado presenta coloración roja, muy ligeramente opalescente.

1.3d.- Preparación de las Placas de Medio de Cultivo.-

Luego de la esterilización, el agar es enfriado.

La mesa usada para la preparación de las placas es desinfectada en su superficie con alcohol. Las placas petri estériles son colocadas en la mesa junto con el mechero Bunsen.

La temperatura del agar debe ser aproximadamente 50° u n o u n C, chequeado en la superficie de la mano, ya que temperaturas mayores pueden causar condensación del agua, formando gotas de agua en la placa superior: por otro lado, temperaturas más bajas solidifican el medio antes de que éste sea vaciado en las placas.

Para la preparación de las placas de medio, flamear el borde del cuello de la fiola, pasándolo por el mechero Bunsen, levantar la tapa de la placa petri y colocar de 15 a 16 ml. de medio en el fondo

de la placa, colocar nuevamente la placa superior, teniendo cuidado de no derramar agar en los lados o superficie de la placa.

Dejar solidificar el medio, esto ocurre tan pronto como la temperatura del agar alcanza 42°C y almacenar las placas en el refrigerador.

1.4.- Selección de los Tanques de Cultivo de Larvas

Para el seguimiento bacteriológico se escogió tanques en que se siguió la rutina normal de cultivo de larvas de camarón en el laboratorio, con aplicación de antibióticos según lo programado y con un plan de alimentación de algas, artemia y alimento seco, normal, con un recambio de agua según lo establecido.

Se hicieron seguimientos antes y después del secado anual para una comparación, y se trató de llevar un control bacteriológico además del tanque, de los alimentos y del agua que ingresó al tanque, así como también de las tuberías de entrada de agua, aire y algas.

Los tanques seleccionados para el estudio fueron de una capacidad de 18.7 toneladas, construidos de fibra de vidrio, con fondo en forma de U, sembrados a una densidad inicial de 125 nauplios por litro, y cosechados con una densidad final promedio de 86 Post-Larvas por litro.

125.000 T
1.250.000

CAPITULO II

SEGUIMIENTOS BACTERIOLÓGICOS

2.1 - Toma de Muestras: Preparación

Las muestras provienen de diferentes lugares, según el sitio que se desee muestrear depende la preparación que se dé a la misma, por ejemplo:

- **Muestras de Agua para el recambio:** Las muestras de agua provenientes de la tubería de entrada de agua al tanque, son filtradas usando una jeringa y un dispositivo filtrante que contiene un filtro de membrana de 0.46 micras, la cantidad filtrada en una muestra de agua que ingresa al tanque es de 100ml. Luego de filtrada la muestra de agua, con unas pinzas estériles se saca el filtro y se lo coloca en sentido contrario, para que filtrando 5ml. de la misma muestra, este contenido sea recogido en un tubo estéril para entonces tener la muestra ya preparada para su incubación.

La jeringa, junto con el filtro de membrana y el dispositivo filtrante deben ser autoclavados previamente.

- **Muestras del Tanque:** Para la toma de la muestras del tanque, se saca una muestra representativa del mismo, con un beaker; la muestra debe contener más o menos 300 ml. de agua y contener suficiente cantidad de animales para poder llenar los requisitos de número de animales/muestra/estadio, según la siguiente tabla:

ESTADIO	Nº ANIMALES
N3 - N5	50
Z1 - Z2	24
Z3	20
M1	16
M2 - M3	12
PL1 - PL3	8
PL4 - PL8	4

La cantidad necesaria de animales para la muestra se la toma directamente del vaso de precipitación usando tubos de vidrio estériles y una pera de caucho, y se los coloca en un tubo de ensayo estéril junto con 3 a 5 ml. del agua del mismo tanque (Ken Hasson, 1987).

Luego de esto la muestra es macerada en el equipo de maceración previamente desinfectado con alcohol y esterilizado a la llama del mechero Bunsen, el equipo se debe dejar enfriar por 10 min. dentro de la campana de incubación, la muestra es entonces macerada haciendo girar varias veces la varilla que actúa como pilón dentro del tubo que hace las veces de mortero, y entonces la muestra está lista para ser sembrada en el agar.

- **Muestras de Tuberías:** Para la toma de muestras de las tuberías, ya sea de agua, aire o algas, se utiliza isopos de algodón previamente esterilizados, los cuales son pasados por el interior de la tubería y colocados en tubos de ensayo estériles que contienen caldo de peptona, para ser puestos en incubación en la campana por un período de 4 a 6 horas y luego proceder a la siembra en los medios de cultivo.

- **Muestras de Alimento Seco:** Las muestras de alimento seco son tomadas directamente del tacho que contiene el alimento disuelto en 10 litros de agua salada, se toman una cantidad de 3 a 5 ml. de muestra, para facilitar el proceso de maceración en el equipo macerador y luego son sembrados en los medios de cultivo.

- **Muestras de Algas:** La muestra de algas es tomada desde la tubería de algas que va a llevar las algas al tanque, y es sembrada directamente en los medios de cultivo.

- **Muestras de Artemia:** Las muestras de artemia son tomadas del tacho que contiene la cantidad de artemia que se va a alimentar

al tanque, se toma 3 a 5 ml. de muestra, para facilitar el proceso de maceración, se la macera en el macerador, y luego son sembradas en los agares para el cultivo.

2.2 - Técnicas de Siembra e Incubación

Para la siembra o inoculación de la muestra en los diferentes tipos de agares, se procede a tomar pequeñas alícuotas utilizando azas de platino de una medida conocida, que han sido esterilizadas en la llama del mechero Bunsen calentándolas al rojo vivo y que se dejan enfriar por unos segundos.

Para la siembra de la muestra en los agares, éstos, que se han mantenido en refrigeración, deben ser previamente puestos en temperatura ambiente para que adquieran la temperatura del medio.

Todo el procedimiento a seguir para la preparación y siembra de la muestra en los agares debe ser realizado dentro de la campana la cual ha sido desinfectada previamente con alcohol.

Las muestras que deben ser maceradas son sembradas siguiendo la siguiente rutina de trabajo: luego de haber sido maceradas, la varilla que hace las veces de pilón debe ser retirada cerca de la llama del mechero, con el aza de platino

calibrada se toma la muestra del macerador tratando de no tener contacto con las paredes del mismo, se debe tener cuidado al sacar la muestra ya que el aza de platino debe contener la cantidad de muestra requerida, no más ni menos de lo establecido, las medidas volumétricas usadas son de 0.1, 0.01 y 0.001 ml., luego de esto se procede a la siembra de la muestra en los agares.

Para la siembra en los agares el aza de platino conteniendo la muestra se desplaza por la caja petri haciendo una línea de arriba hacia abajo y luego se realizan estrías desde el inicio hasta el fin de la línea, tratando de repartir la muestra uniformemente por toda la superficie de la placa, este procedimiento se lo realiza cerca del mechero con técnicas asépticas para evitar en lo posible el ingreso de contaminantes ambientales.

Las placas de cultivo son rotuladas en su fondo con el respectivo código de la muestra.

Para la incubación de las muestras se utiliza la campana, en la que las cajas petri son colocadas de una manera invertida y dentro de una caja de cartón para proveer de oscuridad y permitir el desarrollo de todas las especies bacterianas, la campana es cerrada para mantener una temperatura estable de 35 - 37°C.

La incubación se la realiza por 24 horas para entonces proceder a realizar los contajes bacterianos, si no existe crecimiento bacteriano, se dejan las placas en incubación por 48 horas, para dar por negativo el resultado.

CAPITULO III

IDENTIFICACIONES BACTERIANAS

3.1- Métodos de Aislamiento

Los aislamientos de las colonias bacterianas usando técnicas asépticas son necesarias previo a las pruebas para la identificación bioquímica, tratando de obtener colonias puras usando los siguientes métodos:

- **Aislación de la colonia.**- En este método, picamos una colonia deseada para ser aislada, con una aguja de platino puesta en la llama del mechero Bunsen hasta el rojo vivo y dejada enfriar por 12 a 15 segundos, tratando de tomar colonias aisladas y de evitar el contacto con colonias cercanas, el contenido de la aguja de platino, se deposita en un tubo con caldo de peptona y se lo deja en incubación por 5-6 horas, luego de lo cual se observa turbidez en el tubo, lo que indica un crecimiento positivo de la colonia aislada.

- **Siembra por Agotamiento.**- La siembra por agotamiento como una técnica de aislamiento, se la realiza en placas petri con medio no selectivo; tomando una muestra con el aza de platino previamente esterilizada, directamente del tubo que contiene la colonia incubada en caldo de peptona, y se realiza la siembra en placa por agotamiento, realizando primeramente 3 estrías en la placa, tratando de dejar en ellas la mayor parte del contenido del aza, luego realizamos 3 estrías más, continuando desde el final de la última, luego 3 estrías más a partir del final de la estría anterior y, finalmente, realizamos un rayado en zig-zag, terminando en la parte central de la placa.

Con este método de aislamiento, se obtienen colonias claramente aisladas, con crecimientos espaciados, permitiendo buenas aislaciones para la realización de las pruebas de identificación.

- **Siembra en Tubos.**- La siembra en tubos con medio sólido se realiza a partir de colonias incubadas en caldo de peptona o a partir de colonias aisladas en placas por agotamiento.

La conservación de las colonias aisladas en tubos se preserva por mucho más tiempo que en placas y su pureza puede ser asegurada con mayor certeza.

Para la siembra en tubos se realizan estrías en zig-zag sobre la superficie del medio, el cual se ha dejado solidificar en el tubo con un ángulo de inclinación, permitiendo así mayor superficie de crecimiento a las colonias.

Los tubos con colonias aisladas son tapados con tapones de algodón para permitir un intercambio gaseoso adecuado.

3.2 - Contajes Bacterianos

Para la realización de los contajes de las colonias bacterianas se utilizó dos formas de dilución de las muestras.

- **Dilución en Tubo.**- Para realizar la dilución de las muestras en tubos de ensayo, se utilizó como medio diluyente, agua de peptona o agua salada esterilizada por autoclavado, con medidas de dilución de 1:2, 1:5 y 1:10, de acuerdo a la cantidad de colonias existentes en las muestras.

- **Dilución por Inóculo.**- Tomando inóculos con el aza de platino directamente de la muestra, se utilizaron azas de diferentes diámetros los cuales permiten tomar diferentes volúmenes de inóculos de muestra.

El volumen del inóculo depende del diámetro del aza utilizada, y así tenemos:

Diámetro	Volumen
4 mm.	0,1 ml.
3 mm.	0,01 ml.
2 mm.	0,001 ml.
1 mm.	0,0001 ml.

Las placas de agar utilizadas para los contajes totales de unidades formadoras de colonias fueron los medios PCA y OZR.

3.3.- Observaciones Macroscópicas

Las observaciones macroscópicas se realizan directamente desde la placa de crecimiento bacteriano por simple observación de ciertas características de las colonias como son:

- **Color:** Las colonias en los cultivos en medios no selectivos presentan coloraciones blancas y cremosas, además ciertas características ópticas como presentar opalescencia, transparencia, opacidad o iridiscencia.
- **Aspecto:** Las colonias presentan un aspecto que puede ser pastoso, mucoso, con bordes claros, o tonos azulados.
- **Forma:** Pueden ser redondas, irregulares, extendidas, etc.

- **Tamaño:** El tamaño de las colonias puede ser determinado en mm.
- **Elevación:** Las colonias pueden presentar una elevación aplanada, umbo-nada, convexa, etc.
- **Producción de Pigmentos:** Una característica muy importante entre las observaciones macroscópicas, es la producción de pigmentos, las colonias observadas presentaron formación de pigmentos de color amarillo, naranja, rojo, violeta, etc.

3.4 - Observaciones Microscópicas

Las observaciones microscópicas son realizadas utilizando técnicas especiales de tinción, en este caso se utilizó la técnica de tinción más conocida y difundida, que es la técnica de tinción de Gram, por medio de la cual es posible observar la forma y disposición de las colonias, así como también su diferenciación entre Gram-positivas y Gram-negativas de acuerdo a la estructura de su membrana.

- **Reactivos para la Tinción de Gram:** Se utilizan cuatro tipos de reactivos los cuales tienen funciones determinadas.

1.- Cristal Violeta: Este es el primer reactivo, se aplica sobre la placa en seco. Su propósito es teñir todos los organismos en la placa.

La solución de cristal violeta se prepara de la siguiente forma:

Cristal Violeta, 85%..... 20 gr.

Alcohol Etílico, 95%..... 100 ml.

Solución de oxalato:

Oxalato de Amonia..... 1 gr.

Agua Destilada..... 100 ml.

La solución de trabajo se prepara diluyendo la solución de cristal violeta con agua destilada a razón de 1:10 y mezclarla con 4 volúmenes de la solución de oxalato.

2.- Ioduro de Gram: También se lo conoce como solución de Lugol, este actúa como mordiente, permitiendo la unión entre el colorante y el sustrato.

La solución se prepara de la siguiente manera:

Cristales de Iodo..... 1 gr.

Ioduro de Potasio..... 2 gr.

Se disuelve completamente en 5 ml. de agua destilada, entonces adherir:

Agua Destilada..... 240 ml.

Bicarbonato de Sodio.(5% SA)..... 60 ml.

3 - Decolorante: Este reactivo disuelve y remueve la primera tinción de algunas células. El reactivo puede ser una mezcla de la mitad de acetona y la mitad de alcohol al 95%, o sólo alcohol al 95%. El cristal violeta es soluble en esta combinación y se va a liberar de algunas células, contrario a otras que retienen este reactivo con gran tenacidad.

4.- Safranina: Este reactivo es un tinte rojo el cual es aplicado para teñir aquellas células que fueron decoloradas y que se presentan invisibles, por lo cual se las tiñe con un colorante de contraste al usado en la primera tinción.

Preparación:

Safranina..... 2,5 gr.

Alcohol Etílico 95%..... 100 ml.

Para la solución de trabajo, diluir 1:5 o 1:10 la solución de safranina con agua destilada.

- Procedimiento para la Tinción de Gram

Primero se debe preparar la suspensión bacteriana y fijarla en una placa portaobjetos pasándola por la llama del mechero.

1.- Inundar la placa con la solución de cristal violeta. Dejar actuar por 1 minuto y lavar con el chorro débil del agua.

2.- Inundar la placa con la solución de iodo y dejar actuar por 1 minuto. Lavar con el chorro débil del agua.

3.- Decolorar cuidadosamente por aproximadamente 20 a 30 segundos con la solución decolorante y lavar al chorro débil del agua.

4.- Inundar la placa con la solución de safranina por 30 a 60 segundos y lavar al chorro débil del agua.

Las placas con las colonias teñidas se dejan secar al ambiente y luego se observan en el microscopio utilizando aceite de inmersión.

- Fundamento de la Tinción de Gram

Las colonias pueden presentar dos tipos de coloración: aquellas que presenten una tinción rosada por la captación de la safranina, son colonias Gram-negativas, y aquellas que por el contrario presenten colonias teñidas de color violeta por la captación del cristal violeta, son colonias Gram-positivas.

La diferencia principal entre las células Gram-positivas y las Gram-negativas está en la pared celular. La pared celular de las células Gram-positivas son más sensibles a la deshidratación por el alcohol, el cual actúa cerrando los poros de la pared. Bajo esas condiciones, el complejo iodo-cristal violeta no puede ser liberado por la célula, y el color violeta es entonces retenido. La pared de las células Gram-negativas tiene un mayor contenido de lípidos que los Gram-positivos y aparentemente no se cierra durante el

tratamiento de alcohol, de esta forma el violeta es liberado con el decolorante.

La importancia de la realización de estas Pruebas Bioquímicas es para lograr una confirmación de la especie bacteriana en estudio, ya que el diagnóstico presuntivo lo efectuamos en los medios de cultivo selectivos.

CAPITULO IV

PRUEBAS BIOQUIMICAS

4.1.- Preparación de Medios para Identificación Bioquímica.

El desarrollo de las pruebas bioquímicas, nos permite utilizar medios de cultivo selectivos diferenciales, para la identificación de las diferentes especies bacterianas.

La técnica empleada se refiere a la bacteriología clásica involucrando la preparación de los medios y la consiguiente lectura, a diferencia de las pruebas existentes en la actualidad (comerciales).

El fundamento de la utilización de estas Pruebas Bioquímicas se basa en el estudio de la capacidad de utilizar o degradar nutrientes específicos adicionados en estos medios para obtener lecturas diferenciables entre las especies bacterianas.

- Extracto de Carne 3 gr.
- Extracto de Levadura 5 gr.
- Peptona 10 gr.
- Caseína 5 gr.
- Dextrina 10 gr.
- Lactosa 10 gr.
- Sucrosa 10 gr.
- Sulfato Ferroso 0,2 gr.
- Cloruro Sódico 5 gr.
- Fosfato Sódico 0,3 gr.

La importancia de la realización de estas Pruebas Bioquímicas es para lograr una confirmación de la especie bacteriana en estudio, ya que el diagnóstico presuntivo lo obtenemos en los medios de cultivo selectivos.

Para realizar las pruebas de identificación bioquímica de las colonias aisladas, se utilizaron cuatro medios diferentes:

- **Medio Triple Sugar Iron (TSI).**- Este medio se utiliza para la identificación de bacilos entéricos gram-negativos, basándose en la fermentación de tres azúcares: dextrosa, lactosa y sucrosa, y por la producción de sulfuro de hidrógeno.

El contenido de la fórmula es:

Extracto de Carne	3 gr.
Extracto de Levadura.....	3 gr.
Peptona.....	15 gr.
Peptona Proteosa.....	5 gr.
Dextrosa.....	1 gr.
Lactosa.....	10 gr.
Sucrosa.....	10 gr.
Sulfato Ferroso.....	0,2 gr.
Cloruro Sódico.....	5 gr.
Tiosulfato Sódico.....	0,3 gr.

Agar..... 12 gr.

Rojo Fenol..... 0,024 gr.

El medio se prepara disolviendo 6,5% de agar TSI en agua destilada y calentar hasta disolución completa. Repartir en tubos y esterilizar en el autoclave por 15 min. a 15 psi/121°C.

Los tubos se deben dejar solidificar en una posición inclinada.

El medio preparado se presenta rojo, muy ligeramente opalescente, puede tener un ligero precipitado.

- **Medio Sulfuro, Indol y Motilidad (SIM).**- Este medio semi-sólido se lo utiliza para la determinación de la producción de sulfuro de hidrógeno, la formación de indol y la movilidad.

Fórmula del medio:

Peptona..... 30 gr.

Extracto de Carne..... 3 gr.

Hierro Peptonizado..... 0,2 gr.

Tiosulfato Sódico..... 0,025 gr.

Agar..... 3 gr.

Para la preparación, se disuelve 3,6% del medio en agua destilada y calentar hasta completa disolución. Repartir en tubos y autoclavar por 15 min. a 15 psi/121°C. y dejar solidificar el medio en posición vertical.

El medio preparado presenta un color ámbar medio, ligeramente opalescente.

- **Agar Citrato de Simmons.**- Este medio se basa en la utilización del citrato como única fuente de carbono. La fórmula del medio es:

Sulfato de Magnesio.....	0,2 gr.
Fosfato Dihidrógeno Amónico.....	1 gr.
Fosfato Dipotásico.....	1 gr.
Citrato Sódico.....	2 gr.
Cloruro Sódico.....	5 gr.
Agar.....	15 gr.
Azul de Bromo Timol.....	0,08 gr.

Para la preparación del medio, disolver 2,42% en agua destilada y calentar hasta completa disolución. Repartir en tubos estériles y esterilizar por autoclavado 15 min. a 15 psi/121°C.

El medio preparado se presenta de color verde, ligeramente opalescente, puede tener un ligero precipitado.

Dejar solidificar el medio inclinando los tubos.

- **Agar Urea.**- Se basa en la capacidad de ciertos microorganismos para degradar la urea por medio de la enzima ureasa y

una producción de amoníaco, lo cual lleva a una reacción de alcalinidad en el medio que produce un cambio de color.

La fórmula del Agar Urea Base es:

Peptona.....	1 gr.
Dextrosa.....	1 gr.
Cloruro Sódico.....	5 gr.
Fosfato Potásico, Monobásico.....	2 gr.
Urea.....	20 gr.
Rojo Fenol.....	0,012 gr.

La preparación del agar urea base es disolviendo 2,9% del agar en agua destilada y mezclar bien para una completa disolución. Esterilizar por filtración, la base concentrada no debe hervirse ni autoclavarse.

Para la preparación del agar, disolver 1,5% de agar en agua destilada, calentar hasta completa disolución y autoclavar por 15 min. a 15psi/121°C.

Dejar enfriar hasta 50-55°C y agregar asepticamente al agar urea base, el agar enfriado.

Mezclar bien y repartir en tubos estériles, dejar solidificar los tubos en una forma inclinada.

4.2 - **Métodos de Siembra e Incubación.**

- **Medio Triple Sugar Iron.**- El inóculo es a partir de colonias aisladas en medio sólido, tomadas directamente de él con una aguja de platino previamente esterilizada, desde el centro de la colonia y sembrada en el tubo con medio TSI haciendo primero una picada profunda y realizando luego estrías en la superficie.

Incubar los tubos a 35 - 37°C. por 18 a 24 horas.

- **Medio Sulfuro, Indol y Motilidad.**- Para la siembra en el medio SIM, se toma una colonia con la aguja de platino previamente esterilizada y se realiza una sóla picada en el centro del tubo con el medio, tratando de dejar allí la colonia, la picada debe ser de no más de 2/3 la profundidad del medio, obserándose fácilmente la línea de picadura.

Incubar los tubos a 35 - 37°C por 18 - 24 horas.

- **Agar Citrato.**- Con la aguja de platino esterilizada, se toma una colonia aislada y se la siembra por la superficie del agar, realizando estrías para repartirla bien sobre ella.

Incubar los tubos a 35 - 37°C. por 18 - 24 horas.

- **Agar Urea.**- En el agar Urea, la colonia aislada se siembra por repartición de la misma sobre la superficie del medio inclinado, realizando estrías con la aguja de platino.

Incubar los tubos a 35 - 37°C. por 18 - 24 horas.

4.3 - Interpretación de Resultados.

- **Medio Triple Sugar Iron.**- La fermentación de los azúcares, que da lugar a una producción de ácidos, se detecta mediante el indicador de rojo fenol. Los cambios de color amarillo para la producción de ácido y rojo para la alcalinización, son notables. El tiosulfato sódico se reduce a sulfuro de hidrógeno, el cual reacciona después con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro.

La producción de gases de fermentación es detectada por la presencia de burbujas en el medio.

En conclusión, para la determinación de los resultados, comprobar:

Presencia de burbujas.....	Gas de fermentación positivo
Coloración negruzca.....	Producción de H ₂ S positiva
Color Amarillo.....	Acidez
Color Rojo.....	Alcalinidad

- **Medio Sulfuro Indol y Motilidad.**- La detección de la producción de sulfuro de hidrógeno se observa por el ennegrecimiento del medio a lo largo de la línea de

inoculación; los organismos que producen H_2S presentan por lo general una reacción positiva en 18 - 24 horas. En la detección de la movilidad de los organismos se observa un crecimiento difuso o turbidez lejos de la línea de inoculación. En caso de existir crecimiento en la línea de picadura, pero no motilidad, entonces la prueba de motilidad es negativa.

En resumen:

Coloración negruzca.....Producción H_2S positiva

Crecimiento Desplazado.....Motilidad positiva

- **Agar Citrato.** - En este agar, los organismos capaces de metabolizar el citrato crecen exuberantemente. El medio está alcalinizado y cambia de su color verde inicial a azul oscuro en 18-24 horas.

Color azul oscuro.....Positivo

- **Agar Urea.** - El indicador de rojo fenol cambia de color el medio de amarillo a rosado al producirse el desdoblamiento de la urea, y una alcalinidad en el medio por la producción de amoníaco.

Color rosado.....Positivo



4.4 - Pruebas Adicionales

- **Oxidasa.**- Para detectar la producción de oxidasa se utiliza el reactivo de oxidasa cuya preparación es como sigue:

Oxalato de p-Aminodimetilanilina.....	1 gr.
Agua destilada.....	100 ml.

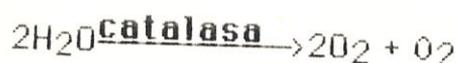
Se disuelve el oxalato de p-Aminodimetilanilina en agua destilada y se calienta suavemente.

Con esta solución se embebe unas tirillas de papel filtro absorbente en el cual las colonias de los organismos deseados a probar son depositadas utilizando una aguja de platino.

Al cabo de 30 a 60 segundos la reacción puede ser observable, presentando una coloración rosada que se vuelve violeta oscuro, lo que indica que la prueba de oxidasa es positiva.

- **Catalasa.**- La prueba es desarrollada por la adición de la colonia deseada a probar en una placa con unas pocas gotas de peróxido de hidrógeno 3%. Si la catalasa está presente, burbujas de oxígeno deben ser liberadas por la colonia.

La reacción que se produce es la siguiente:



DETERMINACIÓN DE TUBOS POSITIVOS DE

- **Test de Indol.**- Para la prueba de indol se utiliza el reactivo de Kovac el cual se prepara de la siguiente manera:

Alcohol Amílico..... 150 ml.

p-Dimetilaminobenzaldehido..... 10 gr.

Acido Clorhídrico, conc..... 50 ml.

Disolver el aldehido en el alcohol, entonces lentamente adicionar el ácido clorhídrico.

La prueba se basa en determinar la capacidad de los microorganismos para desdoblar la molécula de triptófano hasta su forma simple que es el indol.

Se realiza agregando unas gotas del reactivo de Kovac en el tubo con medio SIM que contiene la colonia previamente incubado por 18-24 horas. Para dar por positivo el resultado se debe observar la formación de un halo rojo en la superficie del medio, en caso de no observarse cambio de color o mantener el color café, el resultado se dará por negativo.

CAPITULO V

DETERMINACION DE FUENTES PROBABLES DE CONTAMINACION.

5.1 - Seguimiento Bacteriológico del Sistema.

El seguimiento bacteriológico del sistema se lo llevó a cabo realizando cultivos bacteriológicos de muestras de todo aquello que intervino de alguna forma en el cultivo de los animales en el tanque.

Se realizó cultivos bacteriológicos provenientes de las tuberías de agua, de algas y de aire, cultivos de muestras del agua que ingresó al tanque en el recambio, muestra de algas suministradas como alimento natural, muestras de los alimentos artificiales y muestras de artemia.

Las muestras del sistema se cultivaron bajo las mismas indicaciones dadas para las muestras de animales en el tanque.

Las muestras de las tuberías fueron tomadas 2 veces en el tiempo que duró la corrida de cultivo del tanque, las

muestras de algas fueron tomadas día a día hasta comprobar la presencia de bacterias típicas, lo mismo con las muestras de artemia, alimento artificial y agua de recambio.

Se realizaron identificaciones de las colonias de bacterias predominantes en los cultivos, así mismo fueron hechos contajes de colonias.

5.2 - Contajes e Identificación.

Se realizaron contajes en placas para obtener el número de unidades formadoras de colonias por cada mililitro de muestra, así mismo se realizaron contajes por tipo de colonias encontradas con su respectiva identificación mediante pruebas bioquímicas.

Los contajes totales y por especies están dados en las tablas que a continuación se detallan:

TABLA 1.-ARTEMIA

CONTAJES TOTALES UFC/ ML

DIA	AGAR OZR	AGAR PCA
7	31.000	20.400
8	20.500	10.000
9	205.000	105.000
12	654.000	600.000

TABLA 2.- AGUA
CONTAJES TOTALES UFC/100 ML.

DIA	AGAR OZR	AGAR PCA
3	360	110
4	20	70
5	500	100
6	290	0
7	440	20
9	70	20
10	200	200
11	100	3200

TABLA 3.- ALGAS
CONTAJES TOTALES UFC/ML.

DIA	AGAR OZR	AGAR PCA
3	890	220
4	1210	1170
5	1290	390
6	2000	1000
7	31800	7100
9	23800	11900

TABLA 4.- ALIMENTO SECO

CONTAJES TOTALES UFC/ML.

DIA	AGAR OZR	AGAR PCA
4	2000	2180
5	12100	20900
7	15000	8000
8	600	200
9	420	140
10	540	500
12	21000	10800

TABLA 5

**TIPO DE ALIMENTO SECO TOMADO EN LAS MUESTRAS
PORCENTAJE**

DIA	FRIPPAK 1	FRIPPAK 2	FRIPPAK 3	NIPAI 0
-----	-----------	-----------	-----------	---------

4	60	40		
5		100		
7		66.7	33.3	
8			100	
9			100	
10				100
12				100

NOTA: Los datos para Vitaris en sus platos expresados como porcentaje por plato en todos los conteos realizados independientemente de las otras categorías, debido a su crecimiento en campo extendida.



BIBLIOTECA
FAC. ING.
MARITIMA

TABLA 6.- ARTEMIA

PORCENTAJE POR ESPECIES ENCONTRADAS

DIA	PS.FLUO.	V.PARH.	AEROM.	OTROS	V.ALGS
7	2.3	3.3	Li: 23.6 Sa: 23.6	Ac: 23.6 Ci: 23.6	40
8	1.3	0.9	Li: 32.5 Sa: 32.5	Ac: 32.5 Ci: 0.3	100
9		5	Li: 31.1 Sa: 31.1	Ac: 31.1 Ci: 1.7	30
12		23.9	Li: 23.9 Sa: 23.9	Ac: 23.9 Ci: 4.4	40

Abreviaaturas:

PS.FLUO.: Pseudomonas fluorescens

V.PARH.: Vibrio parhaemolyticus

AEROM.: Aeromonas sp.

V.ALGS.: Vibrio alginus

Li: Aeromona liquefaciens

Sa: Aeromona salmonicida

Ac: Acinetobacter sp.

Ci: Citophaga sp.

NOTA: Los datos para Vibrio alginus están expresados como porcentaje por placa en todos los conteos realizados, independientemente de las otras colonias, debido a su crecimiento en forma extendida.

TABLA 7.- AGUA
PORCENTAJE POR ESPECIES ENCONTRADAS

DIA	PSEUDOM.	AEROM.	OTROS	V.ALGS
3	23.4	Sa: 2.1 Li: 10.7	Ac: 61.7 Ci: 2.1	10
4	84.6	Li: 15.4	Ac: 60	
5		Sa: 20 Li: 20	Ac: 60	1
6	27.1	Sa: 41.7 Li: 2.1	Ac: 18.7 Mic: 10.4	15
7		Li: 75.4	Ac: 1.8 Mic: 22.8	100
9	30	Li: 20	Ac: 10 Ci: 40	3
10	28.6		Ac: 71.4	
11	11.4	Li: 2.9	Mic: 85.7	

Abreviaturas:

PSEUDOM: Pseudomonas sp.

AEROM: Aeromonas sp.

Sa: Aeromona salmonicida

Li: Aero,mona liquefaciens

Mic: Micrococos tetragenas

Ac: Acinetobacter sp.

Ci: Citophaga sp.

TABLA 8.-ALGAS

PORCENTAJE POR ESPECIES ENCONTRADAS

DIA	PSEUDOM.	V. PARH.	AEROM.	OTROS	V.ALGS
3	48.8	1.4	Li:29.8 Sa: 6.3	Ac:13.2 Ci: 0.5	5
4	55.4		Li:18.4 Sa: 0.4	Ac:18.4 Ci: 5.2 Cr: 2.2	
5	13.6		Li: 2.5	Ac:10.9 Ci: 68	5
6	30	10	Li: 20 Sa: 20	Ac:20	100
7	15.8		Li: 21.3	Ac: 5.5 Fv:14.9 Ci:42.5	
9	18.1		Li: 8.7	Ac: 0.7 Cs:36.3 Ci:36.2	

Abreviaturas:

- PSEUDOM: Pseudomonas sp.
 V. PARH. : Vibrio parahaemolyticus
 AEROM.: Aermomonas sp.
 Li: Aeromona liquefaciens
 Sa: Aeromona salmonicida
 Ac: Acinetobacter sp.
 Ci: Citophaga sp.
 Cr: Cromobacterium violaceum
 Fv: Flavobacterium sp.
 Cs: Citophaga salmonicolor



TABLA 9.- ALIMENTO SECO

PORCENTAJE POR ESPECIES ENCONTRADAS

DIA	PSEUDOM.	V.PARH.	AEROM.	OTROS	V.ALGS.
4		23.9	Li:23.9 Sa:23.9	Ac:23.9 Ci: 4.4	100
5			Li:41.3 Sa: 6.6	Ac:51.3 Fv: 0.8	100
7			Li:66.7	Ac:33.3	100
8	sp:11.1		Li:22.2	Ac:66.7	4
9	fl: 5.3 sp:26.3		Li:21	Ac:31.6 Fv:15.8	
10	sp: 5.5		Li: 1.8	Ac: 1.8 Mc:90.9	
12	fl: 1.8		Li:45.7 Sa: 4.1	Ac: 2.7 Ci:45.7	100

Abreviaturas:

fl: Pseudomonas fluorescens

sp: Pseudomonas sp.

Li: Aeromona liquefaciens

Sa: Aeromona salmonicida

Ac: Acinetobacter sp.

Ci: Citophaga sp.

Fv: Flavobacterium sp.

Mi: Mirococcus tetragenus

TABLA 2.- AGUA

CONTAJES TOTALES UFC/100 ML.

DIA	AGAR OZR	AGAR PCA
3	360	110
4	20	70
5	500	100
6	290	0
7	440	20
9	70	20
10	200	200
11	100	3200

TABLA 3.- ALGAS

CONTAJES TOTALES UFC/ML.

DIA	AGAR OZR	AGAR PCA
3	890	220
4	1210	1170
5	1290	390
6	2000	1000
7	31800	7100
9	23800	11900

5.3 - Incidencias Bacteriológicas en el Sistema.

El comportamiento de las colonias bacterianas dentro del tanque de cultivo, mostró una íntima relación con los resultados presentados para el seguimiento bacteriológico de los factores que influyeron en el tanque de cría, tales como el suministro de algas al tanque, la alimentación con artemia y alimento artificial.

Las muestras de alimento seco, entre los cuales están Frippak, Higashimaru y Nippay, mostraron contener un alto porcentaje de colonias del tipo *Acinetobacter* sp., *Aeromonas liquefaciens*, *Vibrio alginus* y *Pseudomonas* sp.

En los resultados para las muestras tomadas de Artemia, se encontraron contajes elevados de ufc/ml., especialmente para *Acinetobacter*, *Aeromonas liquefaciens*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Citofaga* sp.

En las muestras de algas se notó predominancia de *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., *Acinetobacter* sp. y también presencia de *Citofaga* sp. y *Vibrio* sp.

En el agua que ingresó al tanque para los recambios de agua se observó la presencia de *Pseudomonas* sp., *Vibrio alginus*, *Aeromonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Citofaga* sp. y *Micrococos*, aunque todas las colonias presentaron contajes sumamente bajos.

La tubería de algas mostró presencia de *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., y *Vibrio alginus* en predominancia.

La tubería de agua presentó colonias del tipo *Pseudomonas* sp., *Vibrio alginus*, *Acinetobacter* sp. y *Aeromonas* sp. en conteos de ufc bajos.

La tubería de aire presentó una ligera presencia de *Pseudomonas* sp., *Vibrio alginus*, y *Acinetobacter* sp., que puede ser considerada como completamente desinfectada.

5.4 - Formas de Prevención en el Manejo del Sistema.

La prevención es o debe ser la principal ayuda en el control de enfermedades en animales acuáticos. La prevención implica que el problema de enfermedad es controlado antes que éste se vuelva notable en términos de pérdidas de producción, enfermedad o muerte (3).

Entre las formas de prevención en el manejo del sistema, se considera de principal importancia el tratar de evitar el ingreso de gran cantidad de colonias en el tanque de cultivo, lo cual se puede prevenir realizando una mejor limpieza de la artemia, así mismo realizando una buena decapsulación de los cistos de artemia y eliminar las bacterias que se encuentran en el corum de quitina que recubre los cistos; las algas que se suministran al tanque pueden ser purificadas a

partir de cepas por métodos de aislamiento con micropipeta, aislamiento en placas de agar o purificación con tratamientos antibióticos; en el alimento seco se debe tener mucho cuidado también.

En general las formas de prevención del sistema se rigen por las siguientes normas: en algas, mantener técnicas asepticas de cultivo y evitar contaminación en los cultivos algales, realizando aislaciones y purificando las cepas; en cuanto a artemia, tener cuidados en el proceso de eclosion, cosecha y desinfección; el alimento artificial, que no sea expuesto a la humedad, y realizar análisis de la calidad del mismo.

En cuanto al manejo se debe tener cuidado y tomar precauciones en cuanto a la calidad de agua, y al proceso mismo de cultivo.

Se recomienda realizar desinfecciones periódicas de todas las tuberías para así disminuir y evitar el desarrollo bacteriológico en ellas.

También realizar períodos de desinfección y sanitación en intervalos de producción es considerada una buena medida de prevención de contaminación en el sistema.

Tal vez la mejor medida preventiva para evitar el desarrollo de una enfermedad en los tanques de cría es sin duda proporcionar a los animales en desarrollo una adecuada nutrición, con dietas nutricionalmente balanceadas, suministrándoles las cantidades de

vitaminas, proteínas, carbohidratos y lípidos que ellos requieren, así, manteniendo animales saludables, las bacterias no encontrarán un medio adecuado en el que ellas puedan desarrollarse satisfactoriamente para llegar a provocar una enfermedad.

Otra medida de prevención, la cual no es muy recomendada, constituye el tratamiento químico, el cual puede ser realizado una vez que pruebas como antibiogramas o MIC, Concentración Mínima Inhibitoria, se hayan hecho, con lo cual se puede controlar la población bacteriana dentro del tanque de cultivo; al realizarse ésto, debe tenerse mucho cuidado ya que previamente debe estudiarse la flora microbiana existente en el sistema digestivo de los animales, para así no crear una disminución o una destrucción de la misma, dando con esto una mayor probabilidad a las bacterias para que puedan infectar al animal con mayor facilidad.

CAPITULO VI

ANALISIS DE RESULTADOS.

6.1 - Tablas de Datos y Resultados.

Las tablas de datos y resultados se detallan a continuación, para las tres fases que se desarrollaron en este estudio, la primera fase está comprendida por el seguimiento bacteriológico del tanque 1 en el que se realizaron únicamente contajes totales de unidades formadoras de colonia por cada mililitro de muestra y además se realizaron contajes en los agares específicos.

La segunda fase consiste de contajes totales de unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra para el tanque 2 en todos sus estadios larvarios, considerando contajes en los agares específicos y además aislaciones e identificaciones de las especies de bacterias encontradas con sus porcentajes de incidencia.

La tercera fase en que se realizó el seguimiento bacteriano en el tanque 3, consta de contajes totales de unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra en todos sus estadíos larvarios, aislamientos e identificación de las especies bacterianas encontradas y además el seguimiento microbiológico del sistema.

Cabe mencionar que los tanques 1 y 2 corresponden a la última fase de producción del laboratorio, para entrar inmediatamente a un secado anual intensivo, el tanque 3 fue el primer tanque en producción luego de este secado, y puede hacerse una comparación entre las cantidades de ufc/ml. y las especies encontradas con sus respectivos porcentajes.

Otro dato importante es que las muestras fueron tomadas siempre antes de realizar el recambio de agua, tomándolas directamente del tanque en estudio, cuando el nivel del agua del tanque de cultivo no ha sido disminuido aun para efectuar el recambio de agua, con el que se disminuye alrededor del 50% del total de ufc/ml. del tanque de cría

Los tanques de cultivo siempre recibieron un tratamiento de antibiótico aproximadamente después de 5 horas de haberse realizado el recambio de agua.

CUADRO No. 1

CONTAJES TOTALES EN PLACAS DE AGAR PCA, TCBS, MS Y MCK EN
TANQUE 1
UFC/ML. x1000

DIA	ESTADIO	PCA	TCBS	MS	MCK	SOB. %
1	N5	5.2	0.1	0.3	0	99.7
2	Z1	10	0	6	0	99.4
3	Z2	6.2	0.1	2.8	0.4	91.2
4	Z3	10	0.2	6.3	2	86.1
5	Z/M	10	0.3	10	4	85.8
6	M1	10	0.6	10	4.3	85.6
7	M2	10	0.8	10	4	85.1
8	M2/S	10	1.4	10	1.2	83.3
9	M3	30	1.7	30	4.7	81.6
10	M/PL	100	19	100	15	79.8
11	PL1	300	100	100	100	78.1
12	PL2	300	100	100	100	77.5
13	PL3	300	300	100	100	76.9
14	PL4	300	300	100	100	76.5
15	PL5	300	300	100	100	74.5
16	PL6	300	300	100	100	72.8

CUADRO No. 2

CONTAJES TOTALES EN PLACAS DE AGAR OZR, PCA, TCBS, MS Y MCK EN
 UFC/ML. x1000
 TABLUE 2

DIA	ESTADIO	OZR	PCA	TCBS	MS	MCK	SOB. %
1	M5	2.7	2.8	1.3	0.1	0	97.4
2	Z1	10.9	3.1	11	0	0	94.1
3	Z2	0.3	0.4	1.2	0.5	0	90.5
4	Z3	10	2.2	0.6	1.4	0	87.6
5	Z/M	10.9	10	0.2	0	0	85.5
6	M1	12	10	5.2	1.9	0.2	82.1
7	M2	20	4.7	0.4	2.5	0	81.2
8	M2/3	14	10	0.4	4.4	0.2	79.1
9	M3	15	10	0.9	10	10	76.8
10	M/PL	30	30	1	10	30	71.8
11	PL1	143	100	3	30	70	69.2
12	PL2	180	125	3	62	33	68.5
13	PL3	175	152	3	58	32	67.6
14	PL4	300	300	5	39	57	67.1
15	PL5	130	75	9	66	3	66.7
16	PL6	300	300	15	100	24	65.9
17	PL7	300	300	97	78	80	65.3

CUADRO No. 3

CONTAJES TOTALES EN PLACAS DE AGAR OZR, PCA, TCBS, MS Y MCK EN
TANQUE 3
UFC/ML. x1000

DIA	ESTADIO	OZR	PCA	TCBS	MS	MCK	SOB. %
1	N5	1	1	0.7	0	0	98.2
2	Z1	7	10	0.1	2.3	0	96.1
3	Z2	4.7	7	0.2	1.3	0	90.1
4	Z3	9.9	11.9	5.2	2.9	0.6	88.9
5	Z/M	10.5	18.11	0.1	10.2	0.4	83.8
6	M1	31.7	26.7	2.8	11.8	4.6	77.1
7	M2	16	22.7	3.2	3.6	5.1	76.9
8	M2/3	32	25	5.1	10	0.5	76.8
9	M3	356	251	43	100	23	75.9
10	M/PL	248	128	42	300	34	73.5
11	PL1	203	168	131	300	30	73.4
12	PL2	303	209	58	300	25	73.1
13	PL3	216	217	254	300	80	72.8
14	PL4	228	226	159	220	136	72.7
15	PL5	253	128	113	142	6	72.5
16	PL6	256	220	68	36	4	72.1
17	PL7	324	168	65	40	33	71.8

CUADRO No. 4

PORCENTAJE DE INCIDENCIA DE LAS COLONIAS ENCONTRADAS
EN EL TANQUE 2 EN SUS ESTADIOS LARVARIOS

DIA	V. parh.	A. salm.	âcin.	Citof.	V. algs.
1	17.5	15	62.5	5	0
2	45.7	4.5	45.7	4.1	0
3	60	20	6.7	13.3	0
4	5.7	0	94.3	0	0
5	1.8	0	90.1	8.1	0
6	24.4	2.4	61	12.2	8
7	0	2	49	49	15
8	2.8	0	69.4	27.8	6
9	5	0.6	31.5	62.9	26
10	6.9	1.7	4.4	87	5
11	0	2	24	74	25
12	0	1.9	32.7	65.4	20
13	0	1.7	42.1	56.2	25
14	0	2.4	48.8	48.8	35
15	0	4.4	73.5	22.1	40
16	0	0	50	50	70
17	10	30	30	30	10

V. parh.: *Vibrio parahaemolyticus*

A. salm.: *Aeromonas salmonicida*

âcin.: *Acinetobacter* sp.

Citof.: *Citophaga* sp.

V. algs.: *Vibrio alginus*

NOTA: *Vibrio alginus* esta considerado como porcentaje por placa.

CUADRO No. 5

PORCENTAJE DE INCIDENCIA DE LAS COLONIAS ENCONTRADAS EN EL
TANQUE 3 EN SUS ESTADIOS LARVARIOS

DIA	Pseudom.	Vibrio	Aerom.	Otros	V.algs.
1	0	10.3	31.6	58.1	0
2	18.6	0	62.1	19.3	5
3	19.4	0	52.8	27.8	0
4	19.6	0	48	32.4	0
5	44	0.4	33.6	22	0
6	27.9	1.2	25.5	45.4	18
7	19.4	5.4	35.8	39.4	13
8	2.4	0.3	30.5	66.8	75
9	1.5	0.4	39.2	58.9	75
10	1.6	0.8	41	56.5	10
11	5.4	1.2	38	55.4	20
12	6.2	7.4	29.7	56.7	48
13	0.7	48	24	27.3	15
14	36.9	9.6	24	29.5	7
15	9	0.4	19.7	70.9	15
16	10.8	8.4	21.7	59.1	3
17	25.5	10.8	14	49.7	10

NOTA: Los datos para Vibrio alginus estan dados en porcentaje por placa y no por colonias totales.

CUADRO No. 3

PORCENTAJES DE COLONIAS CONSIDERADAS DENTRO DEL GRUPO OTROS
PARA EL TANQUE 3

DÍA	Acin.	Citof.	Flav.	Microc.	Crom.	C.salm.
1	99	1	0	0	0	0
2	100	0	0	0	0	0
3	90	0	10	0	0	0
4	77.1	2.1	0	20.8	0	0
5	96.4	1.8	0	0	1.8	0
6	52.1	40.5	0	0	4.7	2.5
7	83.3	1.7	0	0	15	0
8	45.5	45.5	0	0	7.1	0
9	65.8	0	0	0	32.9	1.3
10	72.5	17.4	0	0	10.1	0
11	54	10.3	0	0	35.7	0
12	52.4	0.5	45	0	2.1	0
13	88.5	11.5	0	0	0	0
14	81.3	18.7	0	0	0	0
15	55.6	44.4	0	0	0	0
16	63.3	20.4	4.1	12.2	0	0
17	91	9	0	0	0	0

Acin.: Acinetobacter sp.
 Citof.: Citophaga sp.
 Flav.: Flavobacterium sp.
 Microc.: Micrococcus tetragena
 Crom.: Chromobacterium violaceum
 C.salm.: Citophaga salmonicolor

6.2 - Gráficos.

Los gráficos que a continuación se presentan corresponden a las tres fases de este estudio, que consiste de los tanques 1, 2 y 3 respectivamente.

Los factores que se han considerado para los gráficos son dos: uno es el contaje total de unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra del tanque, y el otro factor considerado es el porcentaje de sobrevivencia del respectivo tanque en estudio.

Como una guía para el entendimiento de los gráficos, se ha considerado reemplazar el estadio de los animales en cultivo por la variable día del cultivo en el que cada estadio corresponde a un día determinado del cultivo de larvas de camarón.

El gráfico No. 1 corresponde a los datos presentados para el tanque No. 1 de la primera fase del estudio.

El gráfico No. 2 corresponde a la segunda fase de este estudio, lo cual es el tanque No. 2.

Y la tercera fase, que comprende el tanque No. 3 esta representada en el gráfico No. 3.

GRAFICO Nº 1
CONTAJES TOTALES DE UFC/ML.x1000
TANQUE I

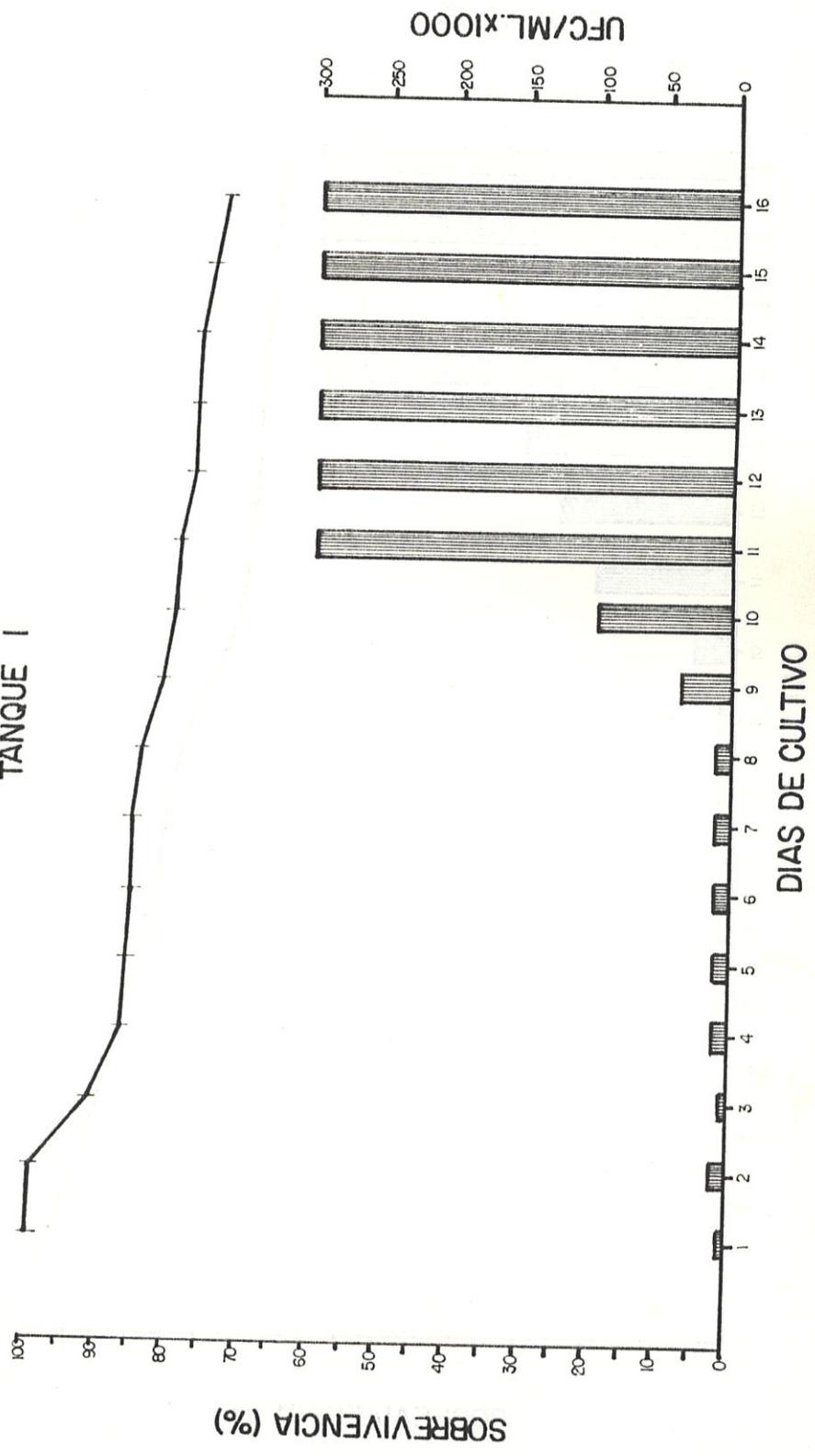


GRAFICO Nº2
CONTAJES TOTALES DE UFC/ML.x1000
TANQUE 2

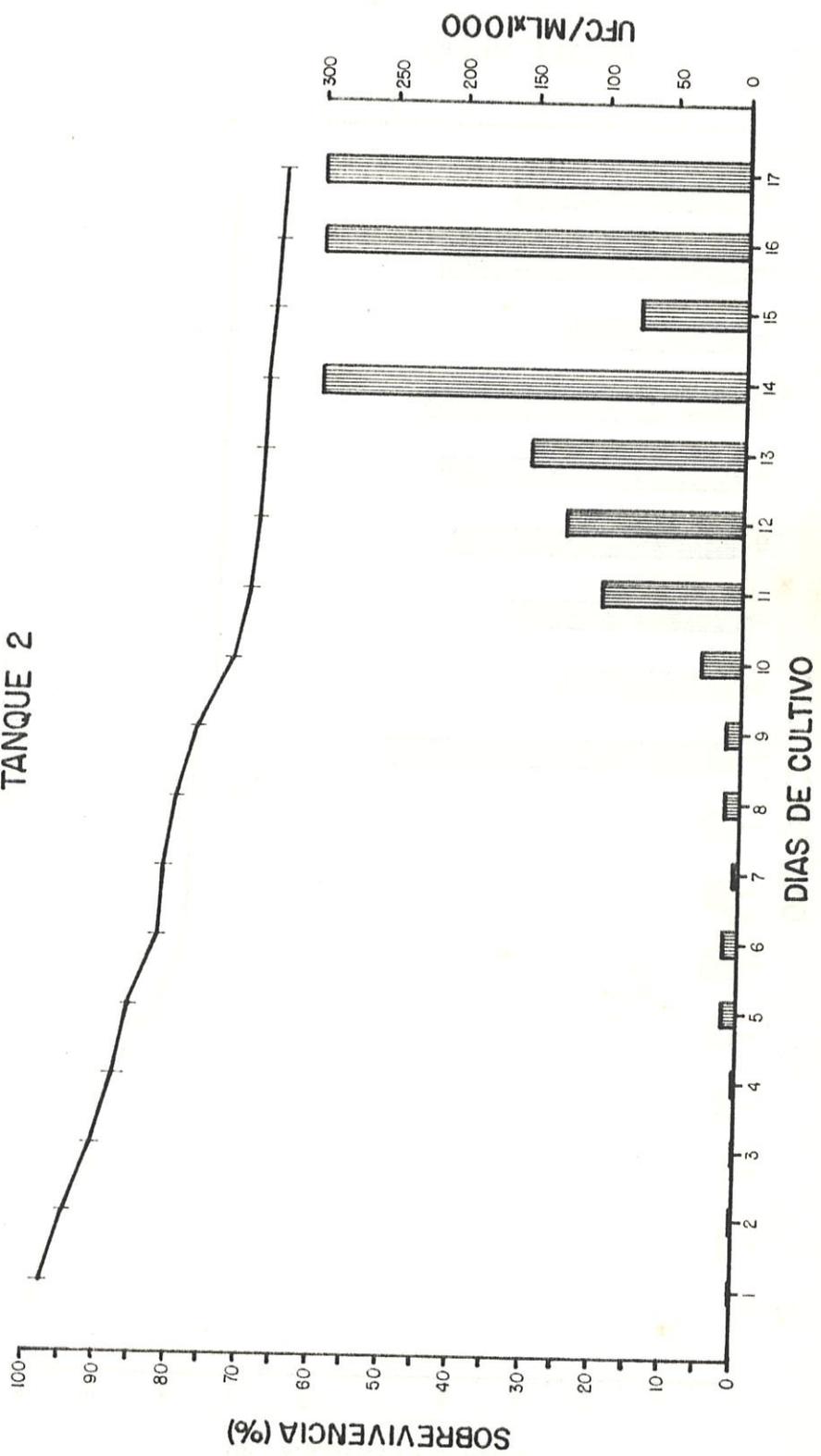
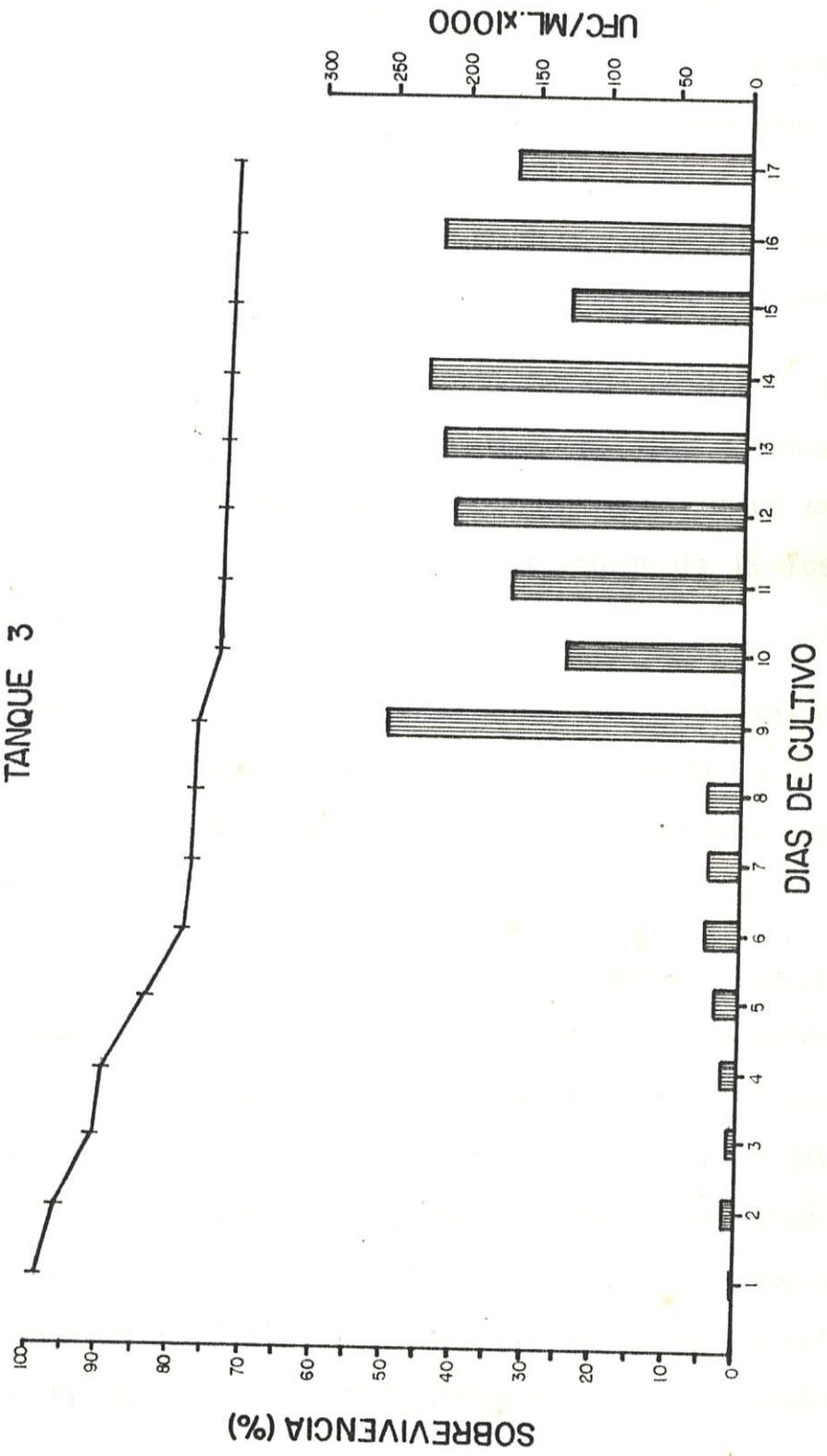


GRAFICO Nº 3
CONTAJES TOTALES DE UFC/ML.x1000
TANQUE 3



6.3 - Resultados

Como resultado del estudio realizado, se pudo determinar la presencia e incidencia de los grupos de bacterias tales como *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas* y Otros entre los cuales constan *Flavobacterium* sp., *Cytophaga* sp., *Acinetobacter* sp., *Cromobacterium violaceum* y *Micrococos tetragenas*.

En cuanto al comportamiento presentado por las colonias para los tanques en general los contajes totales son elevados y similares en los tres tanques, aunque uno de ellos, el tanque 3 corresponde al inicio de la fase de producción después del secado anual.

Para el tanque 1, las mortalidades mas altas se registran en el estadio de Zoea y Mysis, y en el paso de Mysis a Post-Larva, pero esta parece estabilizarse en cuanto llega al estadio de Post-Larva.

Los contajes totales de ufc/ml. son bajos al inicio del cultivo, manteniendose asi hasta el dia 8 (Paso M2/M3), a partir del cual, los contajes se incrementan exponencialmente para llegar a un nivel máximo de 300.000 ufc/ml. En el tanque 2, la mortalidad de los animales tiene un comportamiento similar al tanque 1, obsrvandose una caída en el dia 6 y una ligera estabilización en los estadios de Mysis, y que a partir de Post-Larva 1, la mortalidad es

muy baja y por lo tanto la sobrevivencia se mantiene casi estable.

Los contajes totales de ufc/ml. son inicialmente muy bajos, y presentan un incremento en los días 5 y 6, que corresponden al paso de Zoea a Mysis, disminuyendo luego en el día 7 para empezar nuevamente a incrementarse a partir de este día, significativamente desde el día 10, y presentando un pico el día 14, una disminución en el día 15 y nuevamente un incremento hasta los niveles máximos.

La curva de sobrevivencia para el tanque 3 tuvo un comportamiento similar a las anteriores, con altas mortalidades en el estadio de Zoea, un mayor porcentaje de mortalidad para el paso de Zoea 3 a Mysis 1, con una relativa estabilidad para los estadios de Mysis, una caída para el paso a Post-Larva y un mantenimiento del porcentaje de sobrevivencia para todos los estadios de Post-Larva.

Los contajes totales de ufc/ml. se van incrementando paulatinamente, mostrando un pico en el día 9 (Mysis 3), y continuando luego su incremento paulatino, en este tanque los contajes totales no alcanzan los niveles máximos.

En el tanque 2, antes del secado anual, las bacterias que predominaron fueron *Acinetobacter*, *Citophaga*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromona salmonicida* y *Vibrio alginus*, como puede observarse en el cuadro No. 4, *Citophaga* se va incrementando en su porcentaje de incidencia con los días del cultivo, lo que no ocurre con *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromona salmonicida* se va

incrementando también con el cultivo, pero conservando niveles de incidencia bajos, el comportamiento de *Acinetobacter* sp. es muy variable en los estadios larvarios, el comportamiento de *Vibrio alginus* es con un marcado incremento en el porcentaje de presencia en la placa pese a las diluciones realizadas.

En el tanque 3, las bacterias que incidieron mayormente en el cultivo son *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp., *Acinetobacter* sp. y *Citophaga* spp.; *Flavobacterium* sp., *Micrococcus tetragena*, y *Cromobacterium violaceum* mostraron una presencia esporádica en el análisis de las muestras.

En este tanque que corresponde al inicio de la fase de producción, después del secado anual, se observó una mayor variedad de especies bacterianas comparadas con las encontradas en el tanque 2, con un bajo porcentaje de incidencia para *Vibrio parahaemolyticus*, y un alto porcentaje para *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter*; *Citophaga* se mantuvo bajo también y las especies restantes se consideran esporádicas aunque *Cromobacterium* se mantuvo presente en los estadios de Z3/M1 hasta PL2 incrementándose y así mismo decayendo en sus porcentajes. El comportamiento para *Vibrio alginus* fue variable, observándose un pico en M2/3.

Las mortalidades más altas se registran en el paso de Zoea a Mysis y de Mysis a Post-Larva, pero ésta parece estabilizarse mientras dura el estadio en sí y al llegar a Post-Larva, parece no haber una

mortalidad significativa para estos casos, aunque los contajes de ufc/ml. son elevados, una de las razones puede ser el incremento del recambio de agua, ya que el agua que entra tiene una presencia muy baja de bacterias.

En resumen, las bacterias que tienen un mayor porcentaje de incidencia lo constituyen el grupo de Aeromonas, seguido por Pseudomonas y Vibrio, aunque el grupo calificado como Otras presenta porcentajes muy elevados.

En el tiempo la presencia de bacterias Vibrio parahaemolyticus, Aeromonas hydrophila, Citrobacter y Vibrio, al igual que el grupo Otras, se relaciona a la especie de agua que se utiliza para el cultivo y a la temperatura del agua, ya que las bacterias presentes en el agua que se utiliza para el cultivo de los peces, presentan las características de alta incidencia y alta mortalidad.

En el tiempo 2, en los días de mayor incidencia de mortalidad, el día 10 y el día 11, los tipos de bacterias que predominaron fueron Aeromonas (1033), Vibrio parahaemolyticus (2443) y Citrobacter (2233), para el día 10 y para el día 11 fueron Citrobacter (2733) y Vibrio parahaemolyticus (2543).

En el tiempo 3, que se refiere a la fase final del estudio, se nota que el contaje de bacterias que se les da a las especies de salmónidas, que fueron clasificadas en los grupos de Pseudomonas, Vibrio, Aeromonas y otros, el grupo Pseudomonas, se presentaba constante en los porcentajes relativamente

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El estudio llevado a cabo en la Compañía Pesquera "Acuesemillas", para determinar los principales tipos de bacterias que afectan el cultivo de larvas de camarón en laboratorio, presenta los siguientes puntos como conclusiones del mismo:

- 1.- Se determinó la presencia de las especies bacterianas *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromona salmonicida*, *Acinetobacter* sp., *Citophaga* sp. y *Vibrio alginus* en el tanque 2, que corresponde a la segunda fase del estudio, notándose que *Acinetobacter* y *Citophaga*, presentan los porcentajes más altos de incidencia y que siempre estuvieron presentes en el cultivo.
- 2.- En el tanque 2, en los días de mayor porcentaje de mortalidad, el día 6 y el día 10, las especies bacterianas que predominaron fueron *Acinetobacter* (61%), *Vibrio parahaemolyticus* (24.4%) y *Citophaga* (12.2%), para el primero; y para el día 10, fueron: *Citophaga* (87%) y *Vibrio parahaemolyticus* (6.9%).
- 3.- En el tanque 3, que corresponde a la tercera fase del estudio, se notó por el contrario la presencia de una variedad de especies bacterianas, que fueron clasificadas en los grupos de *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas* y otros. El grupo *Pseudomonas*, se mantuvo constante y en porcentajes relativamente

considerables en los primeros días del cultivo, en donde cuya fuente de contagio fue sin duda el ingreso de algas al tanque de cultivo, ya que se demostró en las muestras analizadas de algas, que *Pseudomonas* tiene una afinidad especial por los cultivos algales. El grupo *Vibrio*, ocurre a partir de el día 5, incrementándose paulatinamente, lo que tiene relación directa con el suministro de artemia al tanque de cultivo. El grupo *Aeromonas*, que se presenta desde el inicio del cultivo, se mantiene en altos porcentajes durante el ciclo. El grupo *Otros*, que presenta siempre los porcentajes de incidencia mas altos, tiene como miembro principal, las especies del grupo *Acinetobacter*, seguida por *Citophaga*

4.- La presencia de *Flavobacterium* sp. en la fase 3 del estudio, fue muy esporádica, notándose su presencia en los días 3, 12 y 16, coincidiendo en el día 3 con una caída en la sobrevivencia, lo que no ocurre en los días 12 y 16.

5.- El grupo *Micrococos*, que también fue esporádico en el tanque de cría, se presentó también en las muestras del agua que ingresa para el recambio de agua del tanque, en la tubería de agua y en la muestra de alimento seco correspondiente a Nipai O.

6.- La presencia de *Cromobacterium violaceum* es a partir del día 5 hasta el día 12, atravesando por una sección en la que existe una mortalidad significativa para el tanque, hasta la estabilización de la misma, en el estadio de Post-Larva.

7.- El comportamiento de *Vibrio alginus* fue similar para los tanques de las fases 2 y 3, en que su presencia empieza a partir del día 6 de cultivo y desde entonces se mantiene presente hasta el final del ciclo.

8.- En el tanque 2, que corresponde al período final del ciclo de producción del laboratorio, se detectaron los grupos de *Vibrio*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* y *Citophaga*, caso contrario al tanque 3, en que existió una gran variedad de especies bacterianas encontradas.

9.- En los estadíos de Post-Larva, en que los contajes totales de ufc/ml. alcanzan niveles máximos, la sobrevivencia se mantiene estable, esto ocurre debido a factores como condición nutricional del animal, estado de resistencia del mismo, un marcado incremento en el recambio de agua, etc.

10.- En una comparación entre las fases del estudio, puede verse la eficiencia o no del proceso de limpieza y desinfección del laboratorio, ya que en la fase 3, que corresponde al inicio del período de producción, los contajes totales de ufc/ml. no alcanzan niveles máximos y se encuentran en un nivel controlable.

En el desarrollo de este estudio, y el seguimiento bacteriológico, se puede anotar ciertas recomendaciones que pueden ayudar a prevenir el desarrollo de una infección bacteriana en los tanques de cultivo de larvas de camarón:

- 1.- Mantener un control microbiológico diario de la condición del cultivo del tanque, así mismo de las fuentes de posible contagio.
- 2.- Realizar etapas intermedias de limpieza y desinfección profundas, en las que puedan ser destruidos aquellos organismos sospechosos a ser patógenos.
- 3.- Una adecuada nutrición y un control de los alimentos, debe ser una de las medidas más importantes en la prevención de enfermedades, si un animal se encuentra fuerte y bien alimentado, las bacterias no podrán ingresar a él y causarle perjuicios.
- 4.- El control de la calidad y cantidad de agua es muy necesario como una medida preventiva para controlar la proliferación de bacterias en el tanque.
- 5.- El conocimiento de técnicas asépticas para el manejo de los tanques de cultivo y en especial en los cultivos algales, representa una ayuda para evitar contaminación.
- 6.- Controlar y cuidar los alimentos secos, evitando la exposición de éstos a la humedad, y realizar análisis de contenido nutricional de los mismos.
- 7.- Una buena limpieza y desinfección de la artemia en el proceso de eclosión, cultivo y cosecha.

8.- En caso de ser necesario, la aplicación de una terapia de antibióticos debe ser realizada, para lo cual se debe considerar ciertos puntos:

-Determinación del agente patógeno.

-Cuántos organismos están presentes por unidad de volumen?

-Que relación tienen ellos con la flora microbiana natural existente.ún

-Son ellos patógenos ?

-Cómo pueden ser tratados?

9.- Para la determinación de la terapia de antibióticos correcta es necesario, hacer pruebas de resistencia y sensibilidad, mediante un antibiograma o un MIC (Concentración Mínima Inhibitoria), para determinar el antibiótico y su cantidad correcta a ser usada en el cultivo.

10.- Un punto muy importante es el conocimiento de los antibióticos a tratarse, su composición, el grado de producir resistencia en los organismos, la efectividad y el campo de acción, y su mecanismo de acción en contra de los microorganismos.



BIBLIOGRAFIA

- 1.- Austin, B., and Allen, Dawn A., Microbiology of Laboratory-Hatched Brine Shrimp (*Artemia*), 1981.
- 2.- Brock, James A., Identification of Gram-negative Bacteria.
- 3.- Brock, James, Shrimp Diseases, 1986.
- 4.- Brock, Thomas D., Biología de los Microorganismos, 1978.
- 5.- Brown, Janet, Antibiotics: their use and abuse in Aquaculture, 1989.
- 6.- Cipriani, Glen R.; Wheeler, Ray S.; and Sizemore, Ronald K., Characterization of Brown Spot Disease of Gulf Coast Shrimp, 1979.
- 7.- Colorni, A., A Study on the Bacterial Flora of Giant Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, larvae fed with *Artemia* nauplii, 1985.
- 8.- DIFCO, Medios de Cultivo Deshidratados y Reactivos para Microbiología, Décima Edición, 1984.
- 9.- ESPOL, Curso de Microbiología, 1987.

- 10.- ESPOL, Curso de Microbiología, 1988
- 11.- Johnson, S.K., Handbook of Shrimp Diseases.
- 12.- Lewis, D. H., Predominant Aerobic Bacteria of Fish and Shellfish, 1973..
- 13.- Lightner, Donald V., Diseases of Cultured Penaeid Shrimp, 1983.
- 14.- Merchant-Packer, Bacteriología y Virología Veterinarias.
- 15.- Scimone, John, Clinical Bacteriology.