

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS PRESENTES EN EL AGUA DE LOS TANQUES DE LARVICULTURA DE CAMARÓN (*Litopenaeus vannamei*) EN LOS LABORATORIOS AQUALAB UBICADO EN LA LOCALIDAD DE AYANGUE Y JOHN WILLIAM UBICADO EN EL SECTOR LA DIABLICA, PROVINCIA DEL GUAYAS – ECUADOR, DURANTE LOS MESES DE OCTUBRE Y DICIEMBRE DEL AÑO 2004.

**AÍDA LUCÍA GUERRERO GUERRERO
PAULA ANDREA BELALCÁZAR BENAVIDES**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
DEPARTAMENTO DE RECURSOS HIDROBIOLÓGICOS
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
SAN JUAN DE PASTO
2005**

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS PRESENTES EN EL AGUA DE LOS TANQUES DE LARVICULTURA DE CAMARÓN (*Litopenaeus vannamei*) EN LOS LABORATORIOS AQUALAB UBICADO EN LA LOCALIDAD DE AYANGUE Y JOHN WILLIAM UBICADO EN EL SECTOR LA DIABLICA, PROVINCIA DEL GUAYAS – ECUADOR, DURANTE LOS MESES DE OCTUBRE Y DICIEMBRE DEL AÑO 2004.

**AÍDA LUCÍA GUERRERO GUERRERO
PAULA ANDREA BELALCÁZAR BENAVIDES**

**Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar el título de
Ingeniera en Producción Acuícola**

**Presidente
HENRY JURADO GÁMEZ
Zootecnista M.Sc.**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
DEPARTAMENTO DE RECURSOS HIDROBIOLÓGICOS
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
SAN JUAN DE PASTO
2005**

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado, son responsabilidad exclusiva del autor”.

Artículo 1 del acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanada del honorable concejo directivo de la Universidad de Nariño.

Notas de aceptación:

Henry Jurado Gámez . Zoot M.Sc
Presidente de tesis

Dr. Héctor Fabio Valencia Ríos
Jurado delegado

Dr. Álvaro Pazos Moncayo. Bac M.Sc.
Jurado

San Juan de Pasto, 25 de mayo de 2005

AGRADECIMIENTOS

Las autoras expresas sus agradecimientos a:

Doctor Héctor Fabio Valencia Ríos. Medico Veterinario Zootecnista. Esp. Decano de la Facultad de Ciencias Pecuarias.

Doctor Álvaro Pazos Moncayo. Bacteriólogo. M. Sc. Profesor Universidad de Nariño.

Henry Jurado Gámez. Zootecnista M. Sc. Profesor Universidad de Nariño.

Doctor Eduardo Díaz Granda. Ingeniero Pecuario M. Sc. Gerente de la división de laboratorios de la empresa EXPALSA.

José Enrique Borbor. Químico Farmaceuta. Jefe de maduración de la división de laboratorios de la empresa EXPALSA.

Felipe Xavier Zavala Ramos. Biólogo. Jefe de producción de la división de laboratorios de la empresa EXPALSA.

Juan Luzardo. Biólogo. Concepto Azul.

Personal del Laboratorio JOHN WILLIAM.

Edsel Núñez. Biólogo. Laboratorio AQUALAB.

Personal del Laboratorio AQUALAB.

Programa de Ingeniería en Producción Acuícola.

Luis Alfonso Solarte. Secretario Facultad de Ciencias Pecuarias.

Guido Villota. Biólogo. Esp. Laboratorio de Microbiología. Universidad de Nariño.

Jairo España. Zootecnista. Laboratorio Universidad de Nariño.

Y todas aquellas personas, que de una u otra forma aportaron al trabajo en mención.

DEDICATORIA

Este es el fin de una etapa importante dentro de la vida del ser humano, y a su vez es la llave que permite abrir la puerta que te lleva hacia otra fase importante de la vida, incrementándose día a día el sentido de la responsabilidad que debemos tener ante las situaciones que se seguirán presentando, durante toda la vida.

Para culminar este importante suceso, debo agradecer infinitamente a mi *mami*, el ser más importante en mi vida, a quien le debo lo que soy, y a quien le entrego este triunfo, de igual forma a mi *papi*, quien nunca soltó mi mano. Agradezco a Dios, por su constante guía durante todo este largo camino. Agradezco a mi familia por su paciencia y comprensión, y por último, agradezco a mis amigas: María Isabel Santacruz y Diana Angélica López, por su constante apoyo durante todo este proceso.

Por ultimo quiero citar una frase, que recuerdo desde que la lei, y ahora pongo muy en práctica:

“Y cuando quieres algo todo el universo conspira para que realices tu deseo”

Paulo Coelho

Suerte a todos!

Aída Lucía Guerrero Guerrero

DEDICATORIA

Cuando se ha recorrido un camino, y se ha terminado un propósito, al mirar lo que se ha dejado atrás, vislumbramos el pasado como una secuencia de actos guardados en archivo de recuerdos de nuestras mentes; hoy el lector que desea consultar este trabajo alcanza a percibir tan solo un pequeño fragmento de lo vivido, espero que esto, que para mi es el diario de muchas experiencias adquiridas, sea de mucha ayuda para futuras generaciones.

Debo agradecer a la infinita energía de Dios y el universo, por confabular a mi favor, en la consecución de éste proyecto y en la motivación para culminar mi carrera, también por permitirme estar conciente de que las piedras que causan tropiezos, forman peldaños para las personas que mantienen firmes sus propósitos, que las grandes obras nacen de pequeñas ideas, y que esas grandes obras, no solo son el producto del genio que la crea, si no también de las manos afectivas y pacientes que lo apoyan y estimulan.

Mis agradecimientos más profundos y sinceros son especialmente a mi madre por brindarme la oportunidad de educarme, por ser mi apoyo, mi guía y mi ejemplo de superación, a mis hermanos y amigos, por hacer de mi vida algo agradable, a mi tío por influirme en una sabia filosofía de vida, y a mi novio por tener siempre la palabra precisa en el momento justo.

A ustedes gracias.

Paula Andrea Belalcázar B

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	30
1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	31
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	32
3. OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVO GENERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4. MARCO TEÓRICO	34
4.1 GENERALIDADES	34
4.2 ESTRUCTURA DE LAS BACTERIAS	34
4.2.1 Membrana celular	34
4.2.2 Protoplastos	34
4.2.3 Región nuclear	34
4.2.4 Flagelos	35
4.2.5 Cápsulas y capas mucosas	35
4.2.6 Pared celular	35
4.2.7 Citoplasma	35
4.2.8 Pelos (pilli)	35
4.2.9 Esporas	36
4.3 MORFOLOGÍA DE LAS BACTERIAS	36

4.3.1 Forma cocácea	36
4.3.2 Forma bacilar	36
4.3.3 Forma espirilar	36
4.3.4 Forma de involución	36
4.3.5 Forma de L	36
4.3.6 Gonidios	36
4.4 NUTRICIÓN DE LAS BACTERIAS	37
4.4.1 Fotótrofos	37
4.4.2 Quimiótrofos	37
4.4.3 Autótrofos	37
4.4.4 Heterótrofos	37
4.5 COLONIAS BACTERIANAS	38
4.6 BACTERIAS DEL MAR	38
4.7 GÉNEROS MÁS COMUNES DE BACTERIAS MARINAS PRESENTES EN EL AGUA DE CULTIVOS DE LARVAS DE CAMARÓN (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	42
4.7.1 <i>Vibrios</i>	43
4.7.2 <i>Aeromonas</i>	44
4.7.3 <i>Pseudomonas</i>	44
4.7.4 <i>Photobacterium</i>	45
4.8 PATOGENICIDAD DE LAS BACTERIAS EN LARVICULTURA DE CAMARÓN (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	45
4.8.1 Vibriosis	45

4.8.2 Septicemia	46
4.8.3 Síndrome de Zoea	46
4.9 MEDIOS DE CULTIVO	47
4.9.1 Medio de cultivo para las bacterias marinas	47
4.9.2 Pruebas bioquímicas	47
4.10 PROBIÓTICOS	50
5. DISEÑO METODOLÓGICO	52
5.1 LOCALIZACIÓN	52
5.2 POBLACIÓN Y MUESTRA	53
5.2.1 Laboratorio Aqualab	53
5.2.2 Laboratorio John William	53
5.3 INSTALACIONES	53
5.3.1 Laboratorio Aqualab	54
5.3.2 Laboratorio John William	54
5.4 MATERIALES Y EQUIPOS	56
5.5 PERIODO DE ESTUDIO	57
5.6 PLAN DE MANEJO	58
5.7 METODOLOGÍA DE TRABAJO	58
5.7.1 Preparación de diluciones	59
5.7.2 Medios selectivos	59
5.7.3 Medios para aislamiento y conteo	62
5.7.4 Recuento de colonias	64

5.7.5 Tinción de gram	64
5.7.6 Medios para la realización de pruebas bioquímicas para bacterias gram-negativas.	66
5.8 DISEÑO ESTADÍSTICO	73
5.9 VARIABLES EVALUADAS	75
6. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	76
6.1 GÉNERO Y ESPECIES ENCONTRADAS EN EL LABORATORIO AQUALAB	76
6.2 UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC) EN EL LABORATORIO AQUALAB	88
6.3 SOBREVIVENCIA LARVAL SEGÚN CANTIDAD DE MICROORGANISMOS EN EL LABORATORIO AQUALAB	92
6.4 GÉNERO Y ESPECIES ENCONTRADAS EN EL LABORATORIO JOHN WILLIAM	95
6.5 UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC) EN EL LABORATORIO JOHN WILLIAM	102
6.6 SOBREVIVENCIA LARVAL SEGÚN CANTIDAD DE MICROORGANISMOS EN EL LABORATORIO JOHN WILLIAM	104
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	107
7.1 CONCLUSIONES	108
7.2 RECOMENDACIONES	109
BIBLIOGRAFÍA	110
ANEXOS	113

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Unidades experimentales trabajadas en los tanques del Laboratorio Aqualab	74
Cuadro 2. Unidades experimentales trabajadas en el Laboratorio Aqualab	74
Cuadro 3. Unidades experimentales trabajadas en los tanques del Laboratorio John William	74
Cuadro 4. Unidades experimentales trabajadas en el Laboratorio John William	75
Cuadro 5. Porcentaje por microorganismo encontrado en el tanque 23. Laboratorio Aqualab.	76
Cuadro 6. Porcentaje por microorganismo encontrado en el tanque 24. Laboratorio Aqualab.	77
Cuadro 7. Porcentaje por microorganismo encontrado en el tanque 29. Laboratorio Aqualab.	79
Cuadro 8. Porcentaje por microorganismo encontrado en el tanque 30. Laboratorio Aqualab.	80
Cuadro 9. Porcentaje por microorganismo encontrado en el agua de mar – zona de bombeo. Laboratorio Aqualab.	80
Cuadro 10. Porcentaje por microorganismo encontrado en la cisterna. Laboratorio Aqualab.	82
Cuadro 11. Porcentaje por microorganismo encontrado en el agua de los nauplios de los laboratorios de maduración Macrobio y Centinela previo a la siembra. Laboratorio Aqualab.	82
Cuadro 12. Porcentaje por microorganismo encontrado en el agua del masivo de algas previo a la siembra. Laboratorio Aqualab.	83
Cuadro 13. Medio Plate Count para determinar unidades formadoras de colonias (UFC), Tanque 23. Laboratorio Aqualab.	88

Cuadro 14. Medio Plate Count para determinar unidades formadoras de colonias (UFC), Tanque 24. Laboratorio Aqualab.	89
Cuadro 15. Medio Plate Count para determinar unidades formadoras de colonias (UFC), Tanque 29. Laboratorio Aqualab.	89
Cuadro 16. Medio Plate Count para determinar unidades formadoras de colonias (UFC), Tanque 30. Laboratorio Aqualab.	90
Cuadro 17. Supervivencia larval según cantidad de microorganismos. Tanque 23	92
Cuadro 18. Supervivencia larval según cantidad de microorganismos. Tanque 24	93
Cuadro 19. Supervivencia larval según cantidad de microorganismos. Tanque 29	94
Cuadro 20. Supervivencia larval según cantidad de microorganismos. Tanque 30	95
Cuadro 21. Porcentaje por microorganismo encontrado en el tanque 7. Laboratorio John William.	96
Cuadro 22. Porcentaje por microorganismo encontrado en el tanque 21. Laboratorio John William.	96
Cuadro 23. Porcentaje por microorganismo encontrado en el agua de los nauplios de los laboratorios de maduración Macrobio y Centinela previo a la siembra. Laboratorio Aqualab.	97
Cuadro 24. Porcentaje por microorganismo encontrado en el agua del masivo de algas previo a la siembra. Laboratorio Aqualab.	98
Cuadro 25. Medio Plate Count para determinar unidades formadoras de colonias (UFC), Tanque 7. Laboratorio John William.	102
Cuadro 26. Medio Plate Count para determinar unidades formadoras de colonias (UFC), Tanque 21. Laboratorio John William.	103
Cuadro 27. Supervivencia larval según cantidad de microorganismos. Tanque 7.	104

Cuadro 28. Supervivencia larval según cantidad de microorganismos. 105
Tanque 21.

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Morfología de las colonias.	38
Figura 2. Mapa localización geográfica de la Localidad de Ayangue y el Sector La Diablica provincia del Guayas – Ecuador	52
Figura 3. Cisterna	54
Figura 4. Sala de larvicultura. Tanques de vibra de vidrio	54
Figura 5. Masivos de algas, tanques de 13 toneladas de capacidad	54
Figura 6. Tanques de vibra de vidrio	55
Figura 7. Masivo de algas	55
Figura 8. Diagrama formación de diluciones en solución salina al 3 %, de la muestra tomada por tanque	59
Figura 9. Fotografía colonias bacterianas en agar TCBS	61
Figura 10. Fotografía colonias bacterianas en agar TCBS	61
Figura 11. Fotografía colonias bacterianas en agar CHAPMAN	61
Figura 12. Fotografía colonias bacterianas en agar MARINO	61
Figura 13. Técnica de agotamiento	63
Figura 14. Fotografía colonias formadas en agar Plate Count	63
Figura 15. Técnica vertido en placa	63
Figura 16. Homogenización de la muestra con el medio	63
Figura 17. Fotografía bacilos gram negativos	65
Figura 18. Fotografía pleomorfismo, característico de las bacterias marinas	65

Figura 19. Figura 19. Prueba de indol, motilidad y presencia se H ₂ S en el medio de cultivo SIM.	70
Figura 20. Prueba de los tres azúcares en el medio de cultivo TSI	70
Figura 21. Prueba del citrato en medio de cultivo Citrato Simmons	71
Figura 22. Prueba de la ureasa en el medio de cultivo Urea	71
Figura 23. Prueba de la ornitina en el medio de cultivo MIO	71
Figura 24. Prueba de Oxidación-Fermentación en el medio de cultivo OF	72
Figura 25. Prueba de Rojo de metilo en el medio RMVP	72
Figura 26. Prueba de Voges Proskauer en medio de cultivo MRVP	72
Figura 27. Prueba de catalasa, reacción positiva	73
Figura 28. Prueba para asimilación de carbohidratos	73
Figura 29. Porcentaje de microorganismos en el tanque 23. Laboratorio Aqualab	77
Figura 30. Porcentaje de microorganismos en el tanque 24. Laboratorio Aqualab	78
Figura 31. Porcentaje de microorganismos en el tanque 29. Laboratorio Aqualab	79
Figura 32. Porcentaje de microorganismos en el tanque 30. Laboratorio Aqualab	81
Figura 33. Porcentaje de microorganismos en el agua de mar – zona de bombeo. Laboratorio Aqualab	81
Figura 34. Porcentaje de microorganismos en la cisterna. Laboratorio Aqualab	83
Figura 35. Porcentaje de microorganismos en el agua de los nauplios de los laboratorios de maduración Macrobio y Centinela previo a la siembra. Laboratorio Aqualab	84

Figura 36. Porcentaje de microorganismos en el agua del masivo de algas. Laboratorio Aqualab	85
Figura 37. Porcentaje de microorganismos totales en los tanques de larvicultura en el Laboratorio Aqualab	85
Figura 38. Porcentaje de bacterias Gram negativas y Gram positivas en los tanques de larvicultura en el Laboratorio Aqualab	86
Figura 39. . Porcentaje de microorganismos en el tanque 7. Laboratorio John William	97
Figura 40. Porcentaje de microorganismos en el tanque 21. Laboratorio John William	98
Figura 41. Porcentaje de microorganismos en el agua de los nauplios de los laboratorios de maduración Macrobio y Centinela previo a la siembra. Laboratorio John William	99
Figura 42. Porcentaje de microorganismos en el agua del masivo de algas. Laboratorio John William.	100
Figura 43. Porcentaje de microorganismos totales en los tanques de larvicultura en el Laboratorio Aqualab	101
Figura 44. Porcentaje de bacterias Gram negativas y Gram positivas en los tanques de larvicultura en el Laboratorio John William	102

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Parámetros fisicoquímicos del agua. Tanque 23	114
Anexo B. Parámetros fisicoquímicos del agua. Tanque 24	115
Anexo C. Parámetros fisicoquímicos del agua. Tanque 29	116
Anexo D. Parámetros fisicoquímicos del agua. Tanque 30	117
Anexo E. Parámetros fisicoquímicos del agua. Tanque 7	118
Anexo F. Parámetros fisicoquímicos del agua. Tanque 21	119
Anexo G. Recuento de colonias.	120
Anexo H. Laboratorio Aqualab. Tanque 23	121
Anexo I. Laboratorio Aqualab. Tanque 24	125
Anexo J. Laboratorio Aqualab. Tanque 29	130
Anexo K. Laboratorio Aqualab. Tanque 30	134
Anexo L. Bioquímicas Laboratorio Aqualab. Tanque 23	140
Anexo M. Bioquímicas Laboratorio Aqualab. Tanque 24	142
Anexo N. Bioquímicas Laboratorio Aqualab. Tanque 29	144
Anexo O. Bioquímicas Laboratorio Aqualab. Tanque 30	146
Anexo P. Siembra y cosecha. Laboratorio Aqualab	149
Anexo Q. Laboratorio John William. Tanque 7	150
Anexo R. Laboratorio John William. Tanque 21	153
Anexo S. Bioquímicas Laboratorio Aqualab. Tanque 7	157
Anexo T. Bioquímicas Laboratorio Aqualab. Tanque 21	159

Anexo U. Siembra y cosecha. Laboratorio Aqualab	161
Anexo V. Laboratorio Aqualab. Zona de bombeo	162
Anexo W. Laboratorio Aqualab. Cisterna	163
Anexo X. Laboratorio Aqualab. Agua de Nauplio v, Laboratorios Macrobio y Centinela	165
Anexo Y. Laboratorio Aqualab. Masivo de algas	166
Anexo Z. Laboratorio John William. Agua de Nauplio v, Laboratorios Macrobio y Centinela	167
Anexo 1. Laboratorio John William. Masivo de algas	168
Anexo 2. UFC/ml. por tanque, muestras de la superficie. Laboratorio Aqualab	170
Anexo 3. UFC/ml. por tanque, muestras de la superficie. Laboratorio Aqualab	171
Anexo 4. UFC/ml. por tanque, muestras de la superficie. Laboratorio John William.	172
Anexo 5. UFC/ml. por tanque, muestras de la superficie. Laboratorio John William.	173

GLOSARIO

AEROBIO: organismo que requiere oxígeno libre para su crecimiento y desarrollo.

ANAEROBIO: organismo que crece en ausencia de oxígeno molecular.

ANAEROBIO FACULTATIVO: organismos que pueden crecer en condiciones aerobias o anaerobias.

ASÉPTICO: exento de microorganismos, capaces de causar contaminación o infección.

BUFFERS: soluciones que resisten cambios de pH en un sistema, necesarios para mantener constante el pH de un medio de cultivo, permitiéndoles estabilidad tanto en acidez como en alcalinidad.

CARGA BACTERIANA: concentración de bacterias en un medio.

CEPA: especies de microorganismos de carácter conocido, que se conservan cultivados en laboratorio, para determinados ensayos y experimentos.

CORRIDA: periodo en que se lleva a cabo un cultivo larval de camarón, que tiene una duración promedio de 25 días. Específicamente en los laboratorio de Ecuador, llaman a este periodo de esta forma.

COLONIA: vegetación de microorganismos en un medio de cultivo sólido, visible microscópicamente.

CULTIVO: población de microorganismos que crecen en un medio.

CULTIVO PURO: cultivo que solo contiene una especie de microorganismos.

DILUCIÓN: proceso mediante el cual, por medio de una solución estéril, se puede diluir y ajustar la turbidez, de las bacterias a una concentración deseada.

ESTADIO LARVAL: es la fase por la que atraviesan algunos organismos antes de se juveniles. El camarón tiene tres fases larvarias: nauplio, zoea y mysis.

ESTERILIZACIÓN: técnica usada para eliminar todos los organismos vivos de un objeto, en la que se emplean procesos físicos como: calor, presión, vapor etc, y proceso químicos como: cloro, alcohol, ácidos y soluciones antisépticas.

FERMENTACIÓN: oxidación anaerobia de los carbohidratos y compuestos hidrocarburoados semejantes por la acción enzimática de los microorganismos; en este proceso aportador de energía, no interviene el oxígeno gaseoso.

FLORA BACTERIANA: población de microorganismos presentes, presentes en un caso determinado; por ejemplo: flora intestinal.

GÉNERO *Staphylococcus*: bacterias (cocos) que se presentan en agrupaciones irregulares, semejantes a racimos de uvas.

GÉNERO *Streptococcus*: cocos que se dividen formando cadenas de células individuales.

HALÓFILAS: microorganismos cuyo crecimiento, se acelera o depende de cargas elevadas de sal.

HATCHERY: término que se utiliza para nombrar el cultivo larval de una especie.

HIDRATOS DE CARBONO: compuestos de carbono, oxígeno e hidrógeno, que sirven en un medio de cultivo como fuente de carbono, para el desarrollo de bacterias, de igual manera sirven para la identificación de las especies por fermentación.

INCUBACIÓN: proceso mediante el cual, los microorganismos suelen desarrollarse en un medio de cultivo, a una temperatura constante y período de tiempo determinado.

INDICADORES: sustancias químicas que se incorporan en los medios de cultivo, sirven para determinar la producción de acidez o la alcalinidad, como producto de la degradación de los nutrientes incorporados en los medios de cultivo.

INHIBICIÓN: suspensión del crecimiento o multiplicación de los microorganismos.

LARVA: Nombre científico de las formas juveniles de todas aquellas especies, que experimentan una metamorfosis completa en el curso de su desarrollo para convertirse en adultos.

MASIVO DE ALGAS: es la forma de definir un cultivo de alto volumen y concentración; los masivos de algas pueden empezar con un volumen inicial de 250 litros hasta llegar a volúmenes de 26 toneladas. Los masivos son el resultado de un arduo trabajo en el departamento de producción, fase realizada en laboratorio, donde se purifica y mantiene la cepa.

MEDIO DE CULTIVO: composición empleada para proporcionar elementos nutritivos, en el crecimiento y multiplicación de los microorganismos.

MEDIOS SELECTIVOS Y DIFERENCIALES: medios de cultivo que tienen incorporados en sus componentes, sustancias químicas especiales, con la finalidad de inhibir algunos tipos de bacterias mientras permiten el crecimiento de otras.

MEDIO UNIVERSAL O GENERAL: medio de cultivo que permite de todo tipo de bacterias presentes en una muestra a evaluar, así mismo facilita obtener un conteo total de la flora bacteriana en dicha muestra.

MESÓFILAS: organismos que se desarrollan con preferencia a temperaturas moderadas entre los 25°C a 40°C.

MICROARÓFILO: microorganismos que crecen mejor en presencia de pequeñas cantidades de oxígeno atmosférico.

MYSIS: tercer estadio del camarón, previo a postlarva, consta de tres fases. En este estadio la característica visible es el nado hacia atrás, indicando el desarrollo de los pleopodos o patas nadadoras.

NAUPLIO: primer estadio del camarón, una vez eclosiona del huevo, consta de cinco fases, en las cuales su alimentación es endógena, es decir se alimenta de la reserva del vitelo, tienen fototaxismo positivo, encontrándose en la superficie de la columna de agua.

OXIDACIÓN: combinación de un cuerpo con oxígeno, separación de hidrógeno; pérdida de electrones.

PATÓGENO: que causa enfermedad.

PÉPTIDO: molécula compuesta de dos o más aminoácido.

PEPTONA: proteína parcialmente hidrolizada.

PLEOMORFISMO: existencia de formas diferentes en la misma especie o raza de microorganismos.

POSTLARVA: es una etapa del camarón, inmediata a la tercera fase de mysis, en esta etapa el camarón se encuentra completamente desarrollado y fuerte para

poder ser sembrado en los estanques en la camaronera, donde se convertirá en juvenil y posteriormente en adulto.

REDUCCIÓN: proceso químico que implica la separación de oxígeno o la adición de hidrógeno; incorporación de electrones.

SACAROLÍTICO: capaz de escindir o degradar los compuestos azucarados.

SICRÓFILAS: microorganismos que pueden desarrollarse bien a 0°C , su temperatura óptima para crecer, es 15°C o menos.

TRANSFERENCIA: en larvicultura de camarón, la palabra transferencia hace referencia a el transpaso de las larvas a otro tanque con el fin de generarles espacio por su tamaño que aumenta rápidamente, a demás permite contabilizar el cultivo por tanque, la transferencia es como una cosecha, se realiza los mismos pasos, más no se despacha.

TERMÓFILO: organismo que crece mejor a 50°C o más.

VIBRIOSIS: enfermedad que en camarón se caracteriza por: opacidad en el músculo estriado y cutícula, expansión de los cromatóforos en pleopodos y pereopodos y flexión dorsal en el tercer segmento.

ZOEA: segundo estadio larval de camarón, consta de tres fases en las cuales se observa claramente la transformación de ojo naupliar a ojos peduculares, a demás en este estadio inician la alimentación exógena, o sea externa.

RESUMEN

Los análisis microbiológicos y pruebas de identificación bioquímica, se llevaron a cabo en los laboratorios de larvicultura de camarón (*Litopenaeus vannamei*) de la provincia del Guayas – Ecuador: Laboratorio Aqualab, ubicado en la Localidad de Ayangue y Laboratorio John William, ubicado en el Sector La Diablica.

Con las pruebas realizadas en este estudio, se determinó los principales tipos de bacterias, presentes en el agua de los tanques de larvicultura, la relación con el grado de sobrevivencia larval y el comportamiento presentado por las colonias, mediante contajes de unidades formadoras de colonias por ml.(UFC/ml.)

El estudio realizado consta de tres fases: la primera, correspondiente a la toma de las muestras (100 ml. De agua de superficie y fondo de cada tanque), posterior sembrada de las mismas en medios de cultivo selectivos como: Agar TCBS, Agar Marino y Agar Chapman, y en el medio universal Plate Count Agar. La segunda fase, se realizaron contajes totales de las colonias y selección morfológica de las mismas, para en una tercera fase ser aisladas y purificadas en agar TSA, para finalmente realizarse tinción de gram, para la identificación del grupo bacteriano, y las siguientes pruebas de identificación bioquímica: Prueba de H₂S, Indol y Motilidad, prueba Triple Azúcar Hierro, prueba del Citrato, prueba de la Ureasa, prueba de Ornitina, prueba Oxidación-Fermentación, prueba Rojo de Metilo, prueba Voges Proskauer, prueba de Reducción del Nitrato, prueba de Catalasa, prueba de Oxidasa y prueba de Asimilación de Carbohidratos.

Los resultados obtenidos demostraron, que el género más predominante fue *Vibrio spp.* representando el 63.95 %, y las especies de éste más representativas fueron: *Vibrio tubiashii*, con el 20.75 %, seguida por del *Vibrio fischeri* con el 15.72 % y *Vibrio alginolyticus* con el 12.58 %, para el Laboratorio Aqualab.

En el Laboratorio John William, el género predominante fue *Vibrio spp.* con el 69.66%, y las especies predominantes fueron: *Vibrio damsela* con el 19.10 %, *Vibrio tubiashii* con 17.98 % y *Vibrio alginolyticus* con el 13.48 %.

Con respecto al grupo bacteriano, las bacterias gram negativas fueron más representativas en los dos laboratorios. Laboratorio Aqualab 70.6 % y Laboratorio John William 69.66 %.

El comportamiento presentado por las colonias para los tanques evaluados en los laboratorios Aqualab y John William, en los contajes totales de (UFC/ml.) fueron similares, presentándose una constante de crecimiento presentándose inicialmente valores bajos, incrementándose levemente en la muestra tomada

después de la siembra, hasta alcanza su pico más alto en el día dos de muestreo, disminuyendo para el día tres e incrementándose moderadamente para los días cuatro y cinco próximos al día de cosecha de las larvas.

Los porcentajes de sobrevivencia larval en el Laboratorio Aqualab representan un margen normal de acuerdo a la incorporación del probiotico, según el plan de manejo de la división de laboratorios de la empresa Expalsa s.a., los porcentajes de sobrevivencia larval, deben ser superiores al 60 %, cumpliendo con lo determinado por la empresa.

Los porcentajes de sobrevivencia larval, en los tanques evaluados en Laboratorio John William, son menores al porcentaje que maneja la división, en comparación con el Laboratorio Aqualab, estos son inferiores, lo que coincide con la no incorporación del probiotico a los tanques que fueron permitidos evaluar con esta condición.

Con el presente estudio, se pudo observar, la influencia del probiotico en la sobrevivencia larval y se demostró, la importancia que tienen los análisis microbiológicos, para el control y optimización de la producción larval en los laboratorios dedicados a este fin.

ABSTRACT

The microbiological analyses and tests of biochemical identification, were carried out in the laboratories of shrimp larviculture (*Litopenaeus vannamei*) of the county of the Guayas–Ecuador: Aqualab Laboratory, located in the Town of Ayangué and John William Laboratory, located in the town The Diablica.

With the tests carried out in this study, it was determined the main types of bacteria, present in the water of the larviculture tanks, the relationship with the larval survival degree and the behavior presented by the colonies, by means of counting of units to form of colonies for ml. (UFC/ml.)

The carried out study consists of three phases: the first one, corresponding to the taking of the samples (100 ml. Of surface water and bottom of each tank), later sowed of the same ones in selective cultivation means as: Agar TCBS, Agar Marine and Agar Chapman, and in the universal means Plate Count Agar. The second phase, they were carried out total counting of the colonies and selection morphologic of the same ones, for in a third phase to be isolated and purified in agar TSA, for finally to be carried out gram tint, for the identification of the bacterial group, and the following tests of biochemical identification: Test of H₂S, Indol and Motility, prove Triple Sugar Iron, prove of the Citrate, prove of the Urease, test of Ornithine, prove Oxidation-fermentation, prove Red of Methyl, prove Voges Proskauer, test of Reduction of the Nitrate, test of Catalase, test of Oxidase and test of Assimilation of Carbohydrates.

The obtained results demonstrated that the most predominant genus was *Vibrio* spp. representing 63.95%, and the species of this more representative they were: *Vibrio tubiashii*, with 20.75%, continued for of the *Vibrio fischeri* with 15.72% and *Vibrio alginolyticus* with 12.58%, for the Aqualab Laboratory.

In the John William Laboratory, the predominant genus was *Vibrio* spp. with 69.66%, and the predominant species were: *Vibrio damsela* with 19.10%, *Vibrio tubiashii* with 17.98% and *Vibrio alginolyticus* with 13.48%.

With regard to the bacterial group, the bacteria negative gram were more representative in the two laboratories. Aqualab Laboratory 70.6% and John William Laboratory 69.66%.

The behavior presented by the colonies for the tanks evaluated in the Aqualab and John William laboratories, in the total counting of (UFC/ml.) they were similar, being presented a constant of growth being with low values initially, being increased slightly in the sample taken after the sowing, until it reaches their

higher pick in the day two of sampling, diminishing for the day three and being increased moderately for the days four and five next to the day of the larvas crop.

The percentages of larval survival in the Aqualab Laboratory represents a normal margin according to the incorporation of the probiotico, according to the plan of handling of the division of laboratories of the Expalsa s.a. company, the percentages of larval survival, should be superior to 60%, fulfilling that determined by the company.

The percentages of larval survival, in the tanks evaluated in John William Laboratory, are smaller to the percentage than it manages the division, in comparison with the Aqualab Laboratory, these are inferior, what coincides with the non incorporation from the probiotico to the tanks that allowed jurisdiction to evaluate with this condition.

With the present study, one could observe, the influence of the probiotico in the larval survival and it was demonstrated, the importance that have the analyses microbiologics, for the control and optimization of the larval production in the laboratories dedicated to this activity.

INTRODUCCIÓN

Según Rheinheimer¹ una de las ramas de la ecología es la microbiología de las aguas, la cual se ocupa de la interacción de los organismos acuáticos con su espacio vital y con los demás miembros de su comunidad biológica.

En el agua del mar existe una importante población microbiana formada por bacterias y protozoarios, comprobándose que la distribución de esta es muy amplia, siendo extraordinariamente abundantes en la región litoral, en relación a la gran cantidad de vida animal y vegetal que en ella existe.

En la larvicultura de camarón, la microbiología marina es una herramienta que permite conocer el tipo de bacterias que se encuentran presentes en el medio acuático y a la vez llevar un control, factor a tener en cuenta ya que este, es el hábitat en el que se desarrollan los organismos a cultivar, y de su calidad depende la sobrevivencia de las larvas.

Según Soluap² el papel de las bacterias como agentes etiológicos de las enfermedades de camarones penaeidos que en condiciones naturales, hace parte de la microbiota normal de los camarones; se ve sometido a variaciones causadas por estrés, fluctuación de temperatura, inadecuada manipulación, lo que lleva a que el organismo experimente una reducción inmunológica, favoreciendo la invasión de la microbiota normal con propiedades patógenas, convirtiéndose en agentes causantes de enfermedades.

Este trabajo permitió conocer que tipos de bacterias se encuentran presentes en el agua de los cultivos de larvas de camarón *Litopenaeus vannamei*, desde el estadio de nauplio v, hasta post-larva (PL) comercial.

¹ RHEINHEIMER, Gerhard. Microbiología de las aguas. 4^a ed. Zaragoza: ACRIBIA, 1987. 1 p.

² SOLUAP, Ener. Introducción a las patologías de camarones penaeus en cautiverio. Guayaquil: Cabal, 2000. 193 p.

1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

En los laboratorios de larvicultura de Ecuador, existen mortalidades permitidas, las cuales no son atribuidas a factores específicos; los factores microbiológicos no son descartables como causa parcial o total de estas mortalidades.

Este hecho también se hace presente, en los cultivos larvales de la costa pacífica Colombiana, en donde al igual que en Ecuador, la identificación de las bacterias presentes en los cultivos, se realiza por simple observación de color, determinado en las colonias presentes en agar TCBS, a las bacterias verdes se las identifica como patógenas y a las amarillas no patógenas, también se da importancia a la presencia de luminiscencia en las bacterias, estas características no tienen relación directa con la patogenicidad, por lo que surge la necesidad de aplicar técnicas para la identificación y caracterización de las cepas bacterianas; Dichas técnicas no pueden ser utilizadas en todos los laboratorios, debido al costo que éstas implican, los laboratorios de nuestra región se ven en desventaja en comparación a los de Ecuador puesto que los costos de la implementación de estas técnicas incrementarían los de producción. Muchos de los laboratorios de Ecuador tienen la facilidad de acceder a este tipo de estudios debido a la demanda de sus productos, lo que los conduce a utilizar nuevas técnicas para incrementar y mejorar su producción.

En la actualidad los laboratorios de Ecuador, han remplazado los análisis microbiológicos por la utilización de probióticos como controladores biológicos, sin embargo los porcentajes de mortalidades no se han reducido en su totalidad; este hecho permite considerar los estudios microbiológicos como parte importante dentro del cultivo tanto en los animales como en el agua en este caso, lo que permite llevar controles específicos con el fin de optimizar la producción.

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

No se conoce con exactitud los tipos de bacterias que se encuentran presentes en el agua de los tanques de larvicultura de camarón *Litopenaeus vannamei* en los laboratorios Aqualab y John William del Ecuador.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar las bacterias presentes en el agua de los tanques de larvicultura de camarón *Litopenaeus vannamei* desde estadio nauplio v hasta postlarva comercial, en los laboratorios Aqualab ubicado en la localidad de Ayangue y John William ubicado en el sector La Diablica, provincia del Guayas – Ecuador, durante los meses de octubre y diciembre del año 2004.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Aislar e identificar las bacterias presentes en el agua de los tanques de larvicultura en los laboratorios: Aqualab, donde se trabaja con presencia de probiótico y John William, donde se trabaja en ausencia de probióticos.

Cuantificar los géneros y las especies más frecuentes encontradas en el transcurso de la investigación.

Establecer el porcentaje de sobrevivencia larval en cada uno de los tanques a evaluar, de acuerdo a la cantidad de microorganismos existentes.

4. MARCO REFERENCIAL

4.1 GENERALIDADES

Según Cortes³, las bacterias, incluidas en el reino mónera, son organismos unicelulares que carecen de una organización interna bien definida, son organismos generalmente unicelulares de tamaño variable cuyo límite inferior está en las 0,2 μ y el superior en las 50 μ ; sus dimensiones medias oscilan entre 0,5 μ y 1 μ . Las bacterias tienen una estructura menos compleja que la de las células de los organismos superiores, son células procariotas, es decir su región nuclear, está formado por un único cromosoma y carecen de membrana nuclear definida; se reproducen por división celular sencilla, cuando alcanzan un tamaño y un metabolismo crítico, se dividen y forman dos células hijas idénticas, cada una de éstas recibe aproximadamente la mitad de la masa celular de la célula original e inicia su crecimiento.

4.2 ESTRUCTURA DE LAS BACTERIAS

Según Cortes⁴, estructuralmente las bacterias constan de:

4.2.1 Membrana celular. Pared que poseen la mayoría de las bacterias, es rígida, dúctil y elástica; impide la ruptura osmótica del protoplasto y protege al organismo contra agentes físico químicos Su composición química es compleja y consiste en proteínas, polisacáridos y a veces lípidos. La membrana de las bacterias gramnegativas, posee un elevado contenido lipídico y una mayor variedad de amino ácidos que las grampositivas.

4.2.2 Protoplasto. Contenido vivo de la célula envuelto en una membrana celular única de tres capas formado por el citoplasma; funciona como una membrana que regula el intercambio de metabolitos entre la célula y el exterior.

4.2.3 Región nuclear.. El núcleo como tal no existe en la célula bacteriana como en las plantas y animales; el citoplasma lleva en su interior una estructura nuclear y el material genético de la bacteria, el cual esta formado por un único filamento de ácido desoxirribonucleico (ADN), que mide cerca de 1 mm de longitud (1000 veces el tamaño de la bacteria).

³ CORTES, José. Microbiología. (online). 2002 (cited 1^o abril., 2004. Avaiale from Internet: URL: www.joseacortes.com/microbiologia/buscamedios.

⁴ Ibid.

4.2.4 Flagelos. Solo existen en ciertas especies, son filamentosos y de longitud variable, constituyen los órganos de locomoción. Según las especies, pueden estar implantados en uno o en los dos polos de la bacteria o en todo su entorno.

Según Hawker⁵ Los vibrios tienen un solo flagelo polar (monotricos), otros microorganismos como el *Spirillum* poseen flagelos en uno o en los dos polos (lofotricos), los organismos bacilares tienen uno o varios flagelos que salen de uno o ambos polos de la bacteria o encontrarse alrededor de todo el cuerpo (posición peritrica).

4.2.5 Cápsulas y capas mucosas. Según Cortes⁶ es una capa gelatinomucosa de tamaño y composición variables que juega un papel importante en las bacterias patógenas; las bacterias que pierden dicha cápsula se tornan avirulentas, siendo esta la que protege a la bacteria del ataque de fagocitos del huésped.

De acuerdo con Valenzuela y Silvestri⁷, las bacterias poseen también otras estructuras como son:

4.2.6 Pared celular. Es una estructura rígida que le da forma a la bacteria, lo que le permite vivir en un medio hipotónico sin explotar, ya que evita que el citoplasma se expanda hasta romper la membrana; no es una estructura vital pero le permite no limitarse a sobrevivir en un medio isotónico únicamente.

4.2.7 Citoplasma. Líquido viscoso donde está disuelto más del 50% de las proteínas de la célula, incluyendo la mayoría de enzimas encargadas de la síntesis de proteínas; además se encuentra el RNA mensajero y RNA de transferencia y otras pequeñas moléculas solubles como aminoácidos, nucleótidos, moléculas intermedias producto del metabolismo de los carbohidratos y moléculas inorgánicas.

4.2.8 Pelos (Pili). Término designado a los apéndices filamentosos que pueda tener la bacteria diferente a los flagelos; estos no le dan movilidad y su función no está definida. En su composición química se encuentra una proteína llamada pilina.

⁵ HAWKER, L.E et al. Elementos de Microbiología General. Introducción a la Microbiología de los microorganismos. Zaragoza: ACRIBIA, 1984. 29 p.

⁶ CORTES, José. Op. Cit.,

⁷ VALENZUELA, Emilia María y SILVESTRI, José. Microbiología general. Santafé de Bogotá: División de recursos educativos UNISUR. 1990. p. 17- 22.

4.2.9 Esporas. Se forman como respuesta a un ambiente adverso, es decir, cuando las condiciones ambientales son desfavorables, especialmente por la ausencia de sustancias importantes como alanina, cinc, hierro y fosfatos.

4.3 MORFOLOGÍA DE LAS BACTERIAS

Según Hawker, et. al⁸, se reconocen tres tipos de bacterias verdaderas: el cocáceo, el bacilar y el espirilar; en determinados géneros se puede encontrar variaciones en cuanto a forma y tamaño de cada célula, lo que se denomina pleomorfismo. Además de las formas comúnmente conocidas las bacterias pueden originar otra morfología de acuerdo a las condiciones en que se encuentren, estas formas son: involución, formas de L y gonidios.

4.3.1 Forma cocácea. La mayoría de los cocos son esféricos, pero existen especies con ciertas modificaciones (esfenoides o reniformes); este tipo de células pueden dividirse regular o irregularmente en uno, dos, tres o más planos y quedar adheridas o separarse, dichas divisiones son útiles para la caracterización taxonómica.

4.3.2 Forma bacilar. Los bacilos son cilindros rectos o ligeramente curvos. Algunos bacilos se encuentran como células aisladas y otros formando colonias rugosas quedando adheridos en cadenas.

4.3.3 Forma espirilar. Son bastones fuertemente curvados que pueden ser largos o cortos dependiendo del género, por ejemplo, en los vibrios son cortos dando aspecto de coma al ser observados al microscopio.

4.3.4 Forma de involución. Son organismos de forma anormal, son típicos de cultivos viejos.

4.3.5 Forma de L. Ciertas condiciones estimulan a que la bacteria desarrolle una forma pleomórfica infrecuente; si el estímulo se elimina después de una breve exposición la bacteria adopta nuevamente su forma normal, por el contrario si este estímulo persiste las células mueren o adoptan la llamada forma L.

4.3.6 Gonidios. Cierta tipo de bacterias producen células flageladas muy diminutas denominadas gonidios.

⁸ HAWKER, L.E et al. Op. Cit., 31 p.

4.4 NUTRICIÓN DE LAS BACTERIAS

Según Stanier, et. al⁹ los microorganismos toman del ambiente todas las sustancias que requieren para la síntesis de materiales celulares y generar energía; por lo tanto, los medios de cultivo deben contener los nutrientes necesarios en cantidades apropiadas a los requerimientos específicos.

Según Pelczar, et. al¹⁰, las bacterias se pueden dividir en grupos de acuerdo a sus requerimientos nutricionales: fotótrofos, quimiótrofos, autótrofos y heterótrofos.

4.4.1 Fotótrofos. Dentro de este grupo se encuentran las bacterias fototróficas que son organismos que consumen CO₂ como fuente principal de carbono y las bacterias fotoorganotróficas, que necesitan otros compuestos orgánicos como los alcoholes, los ácidos grasos y los aminoácidos.

4.4.2 Quimiótrofos. Se encuentran las bacterias del género *Nitrobacter spp.*, son capaces de oxidar nitritos a nitratos y fijar CO₂ para suplir sus necesidades de carbono y energía; a este grupo también pertenecen las bacterias quimioorganotróficas que obtienen la energía mediante la oxidación de compuestos orgánicos de carbono.

4.4.3 Autótrofos. Son los organismos con las necesidades nutricionales más simples pero con una capacidad de síntesis compleja, utilizan el CO₂ como fuente nutritiva satisfaciendo sus necesidades de carbono, caso contrario a lo que ocurre con los heterótrofos; transforman los compuestos que asimila en carbohidratos, grasas, proteínas, ácidos nucleicos y otras sustancias que constituyen la célula.

4.4.4 Heterótrofos. Los organismos de este tipo varían considerablemente sus necesidades nutricionales para su desarrollo, todas necesitan de carbono orgánico en diferentes composiciones; utilizan CO₂ el cual, por si solo no satisface sus necesidades de carbono. Las necesidades de nitrógeno también varían, algunas necesitan del nitrógeno atmosférico y otras de compuestos de nitrógeno inorgánico; otras bacterias necesitan de vitaminas para su crecimiento y otras lo hacen en ausencia de estas. En general las necesidades nutricionales de las bacterias heterótrofas varían de acuerdo a la especie, algunas necesitan de compuestos simples y otras necesitan de una compleja escala de nutrientes.

⁹ STANIER, Roger. et al. Microbiología. 2^{da} edición. Barcelona: REVERTÉ, 1996. 24 p.

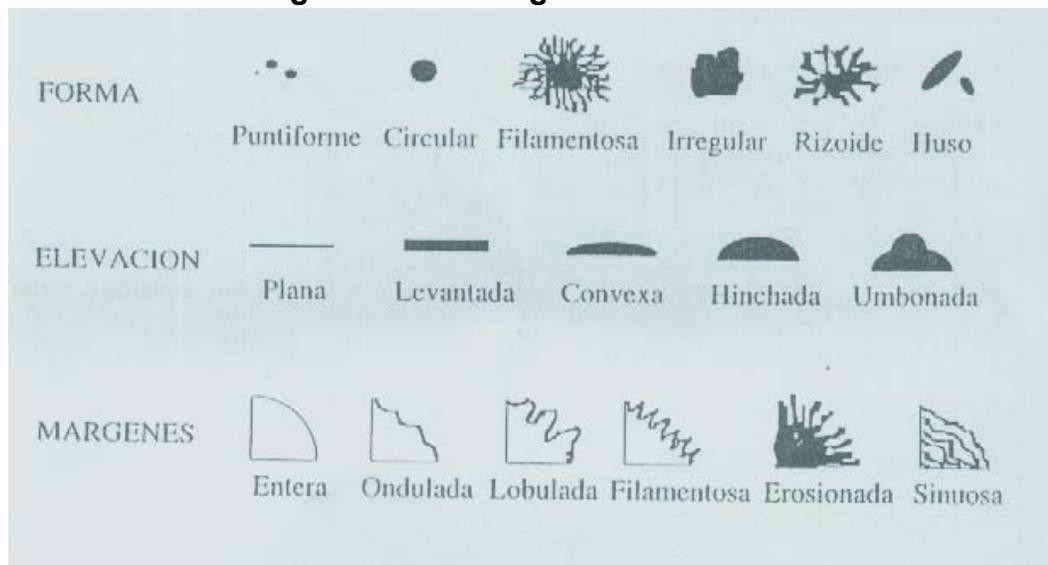
¹⁰ PELCZAR, Michael. J. et al. Microbiología. 2^{da} edición. México: MCGRAW-HILL, 1982. 90 p.

4.5 COLONIAS BACTERIANAS

De acuerdo con Hawker, et. al¹¹, la apariencia de las colonias es generalmente la misma en cada especie de bacteria teniendo esta característica un valor taxonómico, otras características a tener en cuenta son el diámetro de cada colonia, la forma, el color, la superficie y el aspecto de los bordes de cada una de ellas. Las cepas capsuladas (virulentas) dan origen a colonias lisas y las cepas no capsuladas (avirulentas) a colonias rugosas, algunas bacterias móviles dan origen a colonias que migran, dejando un rastro definido de pequeñas colonias.

Según lo estipulado por Solís¹² el aspecto morfológico de las colonias que forman las bacterias puede ser: (Figura 1).

Figura 1. Morfología de las colonias



Solís, A. Miniaturización e identificación de bacterias marinas asociadas al camarón, 1996.

¹¹ HAWKER, L.E. Op. Cit., 40 p.

¹² SOLÍS, A. Miniaturización y simplificación de pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias marinas asociadas al camarón. Guayaquil. Facultad de ingeniería marina y ciencias del mar. Escuela superior politécnica del litoral ESPOL, 1996. 17 p.

4.6 BACTERIAS DEL MAR

Según Rheinheimer¹³, la flora bacteriana de las aguas continentales guarda una relación similar a la de la tierra, caso contrario con la encontrada en el mar que se puede clasificar como autóctona debido a las características que poseen. En el mar la mayoría de las bacterias son organismos halófilos, es decir, que el medio en que viven tiene una proporción óptima de cloruro de sodio.

Según el mismo autor citando a Zo Bell y Upham¹⁴ la concentración salina más adecuada oscila entre 25 y 40 ppm (partes por millón), para su óptimo desarrollo; siendo la proporción de más o menos 35 ppm, la adecuada para el desarrollo de bacterias marinas autóctonas.

De acuerdo con Rheinheimer¹⁵, además de las bacterias halófilas en el agua marina existen otras que son únicamente halotolerantes lo que significa que también pueden crecer en agua dulce, pero no son importantes en mar abierto, ya que su hábitat preferiblemente son las proximidades de la costa, sobretodo en bahías y estuarios, sin embargo, su volumen es inferior con respecto al conjunto de toda la flora bacteriana marina.

Según el mismo autor citando a Zo Bell y Upham¹⁶ las bacterias marinas son del tipo gram negativas, ya que según sus investigaciones el 80% de las encontradas en la costa del sur de California, tenían este carácter tintorial. Las proporciones de estas alcanzaron incluso el 95% en las colonias que crecen en placas de agar que se siembran con agua marina.

La mayor parte de las bacterias encontradas en el mar son móviles; entre el 75 y el 85% de los cultivos puros examinados poseen flagelos. Casi todas las bacterias marinas son anaerobias facultativas, que por regla general se desarrollan mejor en presencia de oxígeno, sin embargo, existen algunas especies aerobias estrictas y en menor cantidad a estas se encuentran las bacterias anaerobias estrictas.

¹³ RHEINHEIMER, Gerhard. Op. Cit., 28 p.

¹⁴ ZO BELL y UPHAM. Citados por: RHEINHEIMER, Gerhard. Microbiología de las aguas. Zaragoza: ACRIBIA, 1987. 28 p.

¹⁵ RHEINHEIMER, Gerhard. Op. Cit., 28 p.

¹⁶ ZO BELL y UPHAM. Op. Cit., 29 p.

Según el mismo autor citando a Zo Bell¹⁷, el crecimiento de las bacterias marinas es más lento en comparación de las bacterias terrestres.

La mayor parte de las bacterias marinas son capaces de utilizar bajas concentraciones de nutrientes, lo que les permite desarrollarse en el mar; la adaptación a las bajas concentraciones de principios nutritivos podría ser la causa del pleomorfismo que muestran este tipo de bacterias, en los cultivos, manifestándose tanto en cultivos sólidos como líquidos, observando diversas formas celulares, presentando bacterias de forma bacilar, cocos, vibriones o filamentos y espirales más o menos largos. En cultivos viejos es común encontrar ramificaciones; el pleomorfismo también es observado en otros biótupos, pero según estudios realizados es más frecuente en las bacterias marinas.

Según Rheinheimer¹⁸, las bacterias marinas se desarrollan óptimamente a una temperatura entre 18° y 22° C, aunque existen algunas especies que se desarrollan a temperaturas bajas entre 0° y 4° C.

Según Rheinheimer citando a Stokes¹⁹, en el mar existe en alta proporción bacterias de tipo psicrófilas especialmente las de tipo facultativas, son bacterias que pueden crecer a temperaturas bajas como 0° C pero que su temperatura óptima esta a 20° C o más.

De acuerdo con Rheinheimer²⁰, así como hay bacterias que desdoblan los azúcares y las grasas, existen bacterias que pueden desdoblar compuestos de elevado peso molecular como la celulosa, el agar, los alginatos, la quitina, los hidrocarburos y fenoles. Así mismo, existen bacterias capaces de producir una desnitrificación (reducción de los nitratos a nitritos y estos en nitrógeno libre) y otras que realizan desulfuración (reducen los sulfatos en hidrógeno sulfatado), el número de las bacterias desnitrificantes es mucho mayor en comparación al otro grupo mencionado.

Las bacterias de mar no constituyen un grupo homogéneo morfológicamente, la forma de la mayoría de ellas corresponde a los grupos fundamentales: cocos,

¹⁷ ZO BELL. Citado por: RHEINHEIMER, Gerhard. Microbiología de las aguas. Zaragoza: ACRIBIA, 1987. 29 p.

¹⁸ RHEINHEIMER, Gerhard. Op. Cit., 30 p.

¹⁹ STOKES. Citado por: RHEINHEIMER. Microbiología de las aguas. Zaragoza: ACRIBIA, 1987. 30 p.

²⁰ RHEINHEIMER, Gerhard. Op. Cit., 30 p.

bacilos, espirilos y vibriones; el grupo mayoritario está compuesto por bacilos gramnegativos, flagelados, no esporulados.

En el mar abundan las bacterias de forma curva, y las especies flageladas de los géneros *Vibrio spp.* y *Beneckeia spp.*, es también común hallar el germen llamado *Microcycclus marinus* que carece de flagelo y es de forma curva o circular; además de las especies mencionadas existe en número reducido bacterias filamentosas, ramificadas y pediculadas.

En repetidas ocasiones se ha observado bacterias conocidas como ultramicrobacterias, capaces de atravesar poros de 0.2 micras de los filtros de membrana, generalmente son bacilos muy cortos que pertenecen a los géneros *Pseudomonas spp.*, *Aeromonas spp.*, *Vibrio spp.* y *Alcaligenes spp.*, este tipo de bacterias fueron encontradas por Macdonell y Hood en 1982 en estuarios de las costas Americanas.

Las bacterias marinas no constituyen ninguna unidad sistemática sino que se encuentran integradas en numerosos géneros y familias con inclusión de especies terrestres; el hecho de ser halófilas y psicrófilas facultativas las diferencia de las especies terrestres emparentadas y con una actividad metabólica similar.

Según Starr citado por Rheinheimer²¹, en el mar las especies comúnmente encontradas pertenecen a los géneros: *Pseudomonas spp.*, *Beneckeia spp.*, *Alcaligenes spp.* y *Flavobacterium spp.*, en los sedimentos también es común el género *Bacillium spp.*, son géneros que comprenden bacterias terrestres y agua dulce.

De acuerdo con Rheinheimer²², es interesante la presencia de bacterias fotógenas, que tienen el mar como medio para difusión; son capaces de transformar la energía química en energía luminosa y producir luz intensa de color verdoso o azulado, algunas de estas bacterias pertenecen al género *Photobacterium spp.* (Pseudomonadaceae); otras son incluidas dentro del género *Vibrio spp.*

Según Rheinheimer citando a Spencer²³, la clasificación del género *Photobacterium spp.* únicamente por la luminiscencia no está bien justificada, ya

²¹ STARR. Citado por: RHEINHEIMER. Microbiología de las aguas. Zaragoza: ACRIBIA, 1987. 30 p.

²² RHEINHEIMER, Gerhard. Op. Cit., 32 p.

²³ SPENCER. Citado por: RHEINHEIMER. Microbiología de las aguas. Zaragoza: ACRIBIA, 1987. 32 p.

que al trabajar la bacteria en cultivo puro, pierde esta propiedad; por consiguiente se debe asignar las especies pertenecientes a este género dentro de las *Aeromonas spp.* (Pseudomonadaceae) y *Vibrio spp.* (Spirillaceae).

Según el mismo autor citando a Hedrie et al²⁴, de acuerdo a las investigación que realizo, propone tres grupos para las fotobacterias en los géneros: *Vibrio spp.*, *Photobacterium spp.* y *Lucibacterium spp.*

Según Rheinheimer afirma²⁵, casi todas las bacterias fotógenas son halófilas creciendo óptimamente en concentraciones salinas que oscilan entre 20 ppm. y 40 ppm., hasta ahora solo se ha descrito una sola especie de agua dulce *Vibrio albensis*.

Además de las bacterias C-heterótrofas, en el mar existen otras que se denominan como fotoautótrofas y quimioautótrofas, las primeras se hallan donde hay ácido sulfhídrico y luz suficiente para su asimilación, esto ocurre en las zonas inmediatas a la costa. Las bacterias quimioautótrofas viven tanto en aguas costeras como en mar abierto.

Según Stanier²⁶, la mayor parte de los ambientes naturales con elevada osmolaridad tienen concentraciones elevadas de sal especialmente cloruro de sodio; los organismos que crecen en este tipo de ambientes se denominan halófilos. Las bacterias se pueden dividir en cuatro amplias categorías con respecto a su tolerancia a la sal:

- No halófilas.
- Organismos marinos.
- Halófilos moderados.
- Halófilos extremos.

Existen dos grupos de bacterias importantes dentro de los halófilos. Los cocos sin motilidad o halococcus y los bacilos pequeños de flagelación polar llamados *Halobacterium*.

²⁴ HEIDRIE. Citado por: RHEINHEIMER. Microbiología de las aguas. Zaragoza: ACRIBIA, 1987. 32 p.

²⁵ RHEINHEIMER, Gerhard. Op. Cit., 32 p.

²⁶ STANIER, Roger. et al. Op. Cit., p. 360-361.

Según Rheinheimer²⁷ en las zonas periféricas del mar, donde el agua es salobre, o sea, con concentración salina inferior a 30 ppm., hay presencia de bacterias halófilas, además de las bacterias autóctonas y de las halotolerantes de agua dulce.; la concentración óptima para este tipo de bacterias oscila entre 5 y 20 ppm.

4.7 GÉNEROS MÁS COMUNES DE BACTERIAS MARINAS PRESENTES EN EL AGUA DE CULTIVOS DE LARVAS DE CAMARÓN (*Litopenaeus vannamei*)

De acuerdo con el Manual de Concepto Azul²⁸

4.7.1 *Vibrios*. Los *Vibrios* son bacilos Gram-negativos rectos o curvos, (0.5-0.8µm de diámetro y 1.4-2.6µm de longitud), mótils por uno o más flagelos polares encerrados en una envoltura, no forman endosporas o microcistos; son bacterias anaerobias facultativas; quimioorganotróficas, con ambos tipos de metabolismo respiratorio y fermentativo; no desnitrifican o fijan Nitrógeno molecular. Muchos de ellos son halófilos ya que requieren de 2-3 % de cloruro de sodio en los medios para desarrollarse y no requieren factores de crecimiento orgánicos; la mayoría toleran condiciones alcalinas moderadas creciendo a pH 9.0 y crecen bien en medios que contienen agua de mar. D-glucosa y otros carbohidratos son catabolizados con producción de ácido pero no de gas; oxidasa positivo.

Los *Vibrios* crecen en una variedad de medios de cultivo. La mayoría de las especies formarán colonias convexas, lisas, blancas cremosas con bordes regulares en un cultivo en agar universal. En algunas especies pueden darse algunas variantes en la morfología de las colonias particularmente después de repetidos cultivos y almacenamiento en medios más complejos. La temperatura óptima de crecimiento varía considerablemente, todas crecen a 20°C y la mayoría a 30 °C.

Son difíciles de identificar ya que hay mucha similitud en sus reacciones bioquímicas, muchas veces la diferencia está en 1-2 caracteres bioquímicos, de tal manera que las nuevas especies descubiertas han requerido de estudios como la hibridación del ADN para establecer sus diferencias.

La mayoría de las especies son de origen marino; se les ha aislado de agua de mar, sedimentos y alimentos marinos especialmente bivalvos (mejillones, ostras, almejas) y crustáceos (cangrejos, camarones). algunas especies también pueden

²⁷ RHEINHEIMER, Gerhard. Op. Cit., 35 p.

²⁸ MANUAL CONCEPTO AZUL. Guayaquil. P 18- 19.

crecer en agua dulce. Muchas especies son patógenas para vertebrados e invertebrados marinos.

Debido a que un gran número de vibrios se presentan en la microflora de camarones sanos y enfermos, se ha considerado que algunas especies de ellos pueden ser patógenos oportunistas, es decir que una cepa puede ser patógena o no en función del contexto. Sin embargo, otra interpretación está ligada al hecho de que la identificación de cepas bacterianas de camarones es muy imprecisa. Así, el concepto de patógeno oportunista podría ser sometido a cuestionamiento en ciertos números de casos, siendo dos cepas confundidas según los criterios taxonómicos utilizados mientras que corresponden a una cepa patógena y a una no patógena.

A pesar de esta posible conducta oportunista de vibrios de camarones peneidos, algunos síndromes recientes de camarones peneidos han sido causados por *Vibrio spp.*, los cuales se comportan más como patógenos reales que como patógenos oportunistas.

4.7.2 Aeromonas. Pertenecen a la familia Vibrionaceae y también son responsables de ciertas enfermedades del camarón. Las especies de este género pueden ser aisladas en agar nutritivo (NA) o en tripticosa soya agar (TSA), siendo su crecimiento usualmente inhibido en agar Tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS). Cepas de *Aeromonas salmonicida* no son mótils y pueden ser aisladas en TSA, produciendo colonias pequeñas y con pigmentación café. Cepas de *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria* son mótils. La temperatura óptima de crecimiento es de 22 a 28 °C.

Son bacilos rectos con extremos redondeados casi esféricos (0.3-1.0 µm. de diámetro y 1.0-3.5 µm. en longitud); aparecen solos, en pares o en cadenas cortas; gram-negativas; usualmente mótils por un flagelo polar simple; son bacterias anaerobias facultativas; quimio-organotróficas, con ambos tipos de metabolismo, respiratorio y fermentativo; oxidasa y catalasa positivo, usualmente ornitina negativo; reducen nitratos y pueden crecer en agua dulce.

De acuerdo con Soluap²⁹ son bacilos gramnegativos, móviles mediante flagelos polares, son citocromo oxidasa y catalasa positivos, quimio-organotrófos y aerobios, atacan fermentativamente a los carbohidratos, algunas cepas son psicrófilas, creciendo la mayoría a 10° C.

²⁹ SOLUAP, Ener. Op Cit., 67 p.

4.7.3 *Pseudomonas*. De acuerdo con el Manual de Concepto Azul³⁰, pertenecen a la familia de las Pseudomonadaceae, y son asociadas también con las enfermedades de los camarones peneidos. Las especies de *Pseudomonas* son nutricionalmente no exigentes y pueden ser aisladas en medios generales, tales como TSA o NA, con temperaturas de incubación de 20 a 25 °C. Pueden producir pigmentos, en particular fluorescentes, que son importantes para su caracterización.

Los representantes del género *Pseudomonas* spp. son bacilos rectos o ligeramente curvos de aproximadamente 0.5-1.0 x 1.5-5.0 µm de tamaño; gram-negativos; móviles por uno o varios flagelos polares sin envoltura; quimioheterótrofos; muchas especies acumulan poli-β-hidroxibutirato como reserva de carbón; son estrictamente aerobios, dando una reacción oxidativa en la prueba oxidación-fermentación (OF). La mayoría de las especies son oxidasa positiva; todas son catalasa positiva; la mayoría no pueden crecer en condiciones ácida (pH 4.5) y no requieren factores orgánicos de crecimiento.

Según Collins y Lyne citando a Donovan y Furniss³¹ son bacilos gramnegativos no esporulados, que se mueven mediante flagelos polares, que pueden producir un pigmento fluorescente; son catalasa y oxidasa positivos, utilizan la glucosa de forma oxidativa y no producen gas.

4.7.4 *Photobacterium*. Según Collins y Lyne citando a Donovan y Furniss³² a este género pertenecen las bacterias luminiscentes, aisladas del agua de mar y que no se pueden identificar como *Vibrio* spp.. Son especies difíciles de distinguir de los *Vibrio* luminiscentes, son bioquímicamente menos activas que los *Vibrio*, utilizando un rango estrecho de compuestos de carbono, crecen con dificultad a temperatura de 37° C.

Según Pelczar, et. al³³ son microorganismos aerobios y heterotróficos, que están difundidos tanto en los ecosistemas acuáticos como terrestres, son quimioorganotróficas.

³⁰ MANUAL CONCEPTO AZUL. Op. Cit., 21 p.

³¹ DONOVAN J.T. y FURNISS A.L. Citados por: COLLINS, C.H. y LYNE, Patricia. M. Op. Cit., 330 p.

³² Ibid. 330 p.

³³ PELCZAR, Michael. J. et al. Op. Cit., 768 p.

4.8 PATOGENICIDAD DE LAS BACTERIAS EN LARVICULTURA DE CAMARÓN (*Litopenaeus vannamei*)

De acuerdo con Soluap³⁴, a fin de comprender mejor el papel de las bacterias como agentes etiológicos de las enfermedades de los camarones peneidos, es preciso aclarar desde un principio, que la mayoría de las bacterias aerobias y heterótrofas aisladas a partir de casos de esas enfermedades son en condiciones naturales, componentes de la bacterioflora normal de los camarones, que al ser sometidos a estrés, experimentan una reducción en su resistencia, la cual favorece la invasión de la bacterioflora normal que tenga propiedad para actuar como patógenos.

Según el mismo autor, las enfermedades provocadas o asociadas con la presencia de bacterias en los camarones peneidos, pueden ser consideradas básicamente desde el punto de vista de problemas sépticos, problemas cuticulares y problemas comunes que afectan a las larvas. Entre las enfermedades bacterianas más comunes encontradas en **hatchery** están:

4.8.1 Vibriosis. De acuerdo con Soluap³⁵ es una manifestación oportunista de *Vibrios spp.*, es probablemente el resultado de otras condiciones primarias que favorecen la proliferación de las poblaciones bacterianas, debido principalmente a otras enfermedades infecciosas, en enfermedades nutricionales, heridas y factores ambientales externos que producen estrés, entre otros. Las larvas infectadas por estas bacterias, presentan colonización masiva de los apéndices, del tracto digestivo, hepatopáncreas y en su fase terminal septicemia.

De acuerdo al Manual de Concepto Azul³⁶ entre las especies del género *Vibrio spp.* implicadas como agentes causantes de infecciones y enfermedades en camarones peneidos se encuentra *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. damsela*, *V. splendidus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus*, (Lightner 1993), *V. anguillarum* (Lewis, Lightner, Rosemark y Fisher 1988, *V. aestuarianus*, *V. pelagius*, *V. campbellii*, *V. fischeri*, *V. nereis*, *V. tubiashi*, (Austin, 1995) *V. logei*, *V. marinus*, *V. hollisae* *V. fluvialis*, *V. furnissii*, (Lightner, 1995) *V. penaeicida*. (Ishimaru, 1995).

Los camarones peneidos pueden ser infectados en cualquier estadio, pero particularmente las larvas y postlarvas. En cultivos, parece que la vibriosis se

³⁴ SOLUAP, Ener. Op. Cit., P 163- 193.

³⁵ Ibid., 162 p.

³⁶ MANUAL CONCEPTO AZUL. Op. Cit., 20 p.

presenta en circunstancia de sobrepoblación, bajas concentraciones de oxígeno disuelto y otras características del agua, tales como temperaturas altas, bajos recambios y pobre calidad de agua. La vibriosis en peneidos puede alcanzar hasta un 50 % de mortalidad en los cultivo a un máximo de 48 horas

4.8.2 Septicemia. Según Soluap³⁷ En los peneidos la sintomatología del síndrome de septicemia bacteriana, es muy específica, se pueden detectar signos de opacidad en la musculatura abdominal, flexión dorsal del abdomen, letargia y enrojecimiento de pleopodos y pereopodos; al iniciarse la infección, el primer signo que se suele observar, es un cambio paulatino de color de la musculatura abdominal, al cual en lugar de ser incolora y translúcida, es opaca y blanquecina, en algunos casos se detectan indicios de melanización de los filamentos branquiales y expansión de los melanóforos y eritróforos, en el tegumento de los apéndices; las larvas infectadas muestran movimientos natatorios desorientados, irregulares o retardados muy a menudo nado de lado, en etapa terminal los animales tienden a quedarse en el fondo del tanque.

Los posibles agentes etiológicos corresponden a bastones Gram negativos móviles, han sido identificadas las siguientes especies: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum* y *Vibrio parahaemolyticus*. Las mortalidades representan el 60 % a 70 % de la población.

4.8.3 Síndrome de Zoea . De acuerdo con Morales³⁸ los primeros signos clínicos en observarse, al microscopio óptico, corresponden a una descamación de las células epiteliales del hepatopáncreas e intestino; estas células se sitúan individualizadas dentro de la luz intestinal, se observa una detención en la alimentación y ausencia de heces, los movimientos contráctiles del tubo digestivo cesan y la muerte llega rápidamente.

Según Siabichay³⁹ en laboratorios que presentaron el síndrome, fueron aisladas y clasificadas las cepas de *Vibrio harveyi* y *Vibrio vulnificus* utilizando para su identificación criterios de referencia del manual Bergey's y tablas preparadas por Solis.

³⁷ SOLUAP, Ener. Op. Cit., 202 p.

³⁸MORALES, Ileana. Observaciones sobre el síndrome de descamación del epitelio digestivo "bolitas" en larvas de *Penaeus vannamei* en Ecuador. En : Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. (1o.: 1993 : Guayaquil). Ponencia del I Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. Guayaquil : Escuela Politécnica del Litoral, 1992. 204 p.

³⁹ SIABICHAY, Kléber. Op. Cit., 49 p.

Retomando a Morales⁴⁰ quien afirma, que se ha observado mayor incidencia del síndrome durante los estadios de postlarva, pero existen mayores mortalidades cuando se presenta en estadios más jóvenes como mysis y especialmente zoea, pudiéndose llegar a perder hasta el 90 % de la población en 24 horas.

4.9 MEDIOS DE CULTIVO

4.9.1 Medios de cultivo para bacterias marinas. De acuerdo con el Manual de medios de cultivo Merck⁴¹ presentan las siguientes características:

▣ **Agar TCBS (Tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa).** Medio para el aislamiento selectivo de *Vibrio spp.* enteropatógenos y otros géneros como *Pseudomonas spp.* y *Aeromonas spp.*

▣ **Agar CHAPMAN.** Medio selectivo para el aislamiento y diferenciación de estafilococos (bacterias gram-positivas)

De acuerdo con Solís⁴² presentan las siguientes características:

▣ **Agar TSA (tripticosa soya agar).** Medio que permite el crecimiento de diferentes especies bacterianas, facilitando su aislamiento y purificación antes de la realización de pruebas bioquímicas.

▣ **Agar marino.** Medio específico para aislar bacterias marinas en el que pueden crecer distintas especies.

4.9.2 Pruebas bioquímicas. Según Cortes⁴³, las siguientes pruebas permiten conocer las especies de bacterias aisladas en los medios de cultivo:

▣ **Prueba del citrato.** Esta prueba sirve para determinar si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, provocando una alcalinización del medio.

▣ **Producción de H₂S.** Esta prueba determina la producción de sulfuro de hidrógeno por la bacteria.

⁴⁰ MORALES, Ileana. Op. Cit., 204 p.

⁴¹ MANUAL DE MEDIOS DE CULTIVO. MERCK: Darmstadt. 2002. p. 106 - 174 -194.

⁴² SOLÍS, A. P. Cit., 28 p.

⁴³ CORTES. Op. Cit.,

▣ **Prueba de indol.** Mediante esta prueba se detecta la liberación de indol en un cultivo bacteriano. Dicha liberación se debe a la degradación del aminoácido triptófano mediante el enzima triptofanasa.

▣ **Prueba de motilidad.** Permite observar si la bacteria es móvil, mediante la presencia de flagelos.

▣ **Prueba del rojo de metilo/Voges Proskauer (RMVP).** Estas dos pruebas permiten la diferenciación dentro de las enterobacterias, estas son anaerobios facultativos que utilizarán la glucosa en dos fases: primero la metabolizan aeróbicamente, consumiendo rápidamente el oxígeno del medio, y luego la metabolizan por vía anaerobia (fermentación). Ésta puede ser de dos tipos: Fermentación ácido mixta y fermentación butilén glicólica.

▣ **Prueba de la ureasa.** Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa.

▣ **Reducción de nitratos.** Sirve para determinar la capacidad de un organismo de reducir el nitrato en nitritos.

▣ **Prueba de la catalasa.** Se utiliza para comprobar la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo.

▣ **Prueba de la oxidasa.** Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana.

▣ **Prueba de oxidación – fermentación de Hugh-Leifson.** Según Montealegre⁴⁴ sirve para la degradación oxidativa y fermentativa de los carbohidratos. Los productos de la fermentación son ácidos mixtos relativamente fuertes, y fáciles de detectar; los productos de la oxidación son ácidos débiles y necesitan un medio para su detección más sensible.

⁴⁴ MONTEALEGRE, Jaime. Características bioquímicas de las bacterias (online). (Santiago de Chile, Chile): 2002 (cited 3 mayo,2004. Available from Internet: URL:www.agronomia.uchile.cl/webcursos/microbiologiagrál/Guia_Lab_08_(1).

▣ **Prueba triple azúcar hierro (TSI).** De acuerdo con Cárdenas y Guevara, citando a Koneman⁴⁵, esta prueba es indispensable para la identificación de bacilos gramnegativos fermentadores.

▣ **Prueba de la ornitina.** Según Mac Faddin⁴⁶ L-ornitina es un aminoácido descarboxilado por la enzima ornitina descarboxilasa dando como resultado la diamina putrescina y anhídrido carbónico
De acuerdo con Solís⁴⁷

▣ **Prueba de tolerancia al 0% de salinidad.** Esta prueba permite evaluar la resistencia que pueden tener las bacterias para sobrevivir en un medio sin sal.

▣ **Prueba para la asimilación de carbohidratos.** La prueba con diferentes carbohidratos se realiza con el objeto de conocer cuál es el sustrato que la bacteria utiliza como fuente de carbono.

5.10 PROBIÓTICOS

De acuerdo con Intriago⁴⁸ el término probiótico se define como una preparación que contiene microorganismos, que al ser utilizados sus metabolismos como aditivos alimenticios, afectan al huésped de forma benéfica; en su mayoría, los microorganismos que se utilizan como probióticos crecen y/o funcionan en el tracto digestivo del huésped.

Según Gullian⁴⁹ los probióticos son cultivos de microorganismos vivos que colonizan el tracto digestivo de los camarones que lo consumen cuyo objetivo es

⁴⁵ KONEMAN, E. et al., Diagnostico microbiológico (1987). Citado por : CÁRDENAS, Jovita y GUEVARA, Myrian. Aislamiento y diferenciación de bacterias marinas degradadoras de petróleo pertenecientes al género *Pseudomonas* en la ensenada de Tumaco – Nariño. San Juan de Pasto: universidad de Nariño, 1999. p 123 -128.

⁴⁶ Mac FADDIN, Jean F. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. México: Editorial Médica Panamericana. 1991. 62 p.

⁴⁷ SOLÍS, A., Op. Cit., 20 p .

⁴⁸ INTRIAGO, Walter. Problemas de aislamiento y caracterización de bacterias asociadas al síndrome de zoea II y demostración experimental de su patogenicidad. Guayaquil, 1998, p. 25- 28. Trabajo de grado (Ingeniero Acuicultor). Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería marítima y ciencias de mar.

⁴⁹ GULLIAN, Mariel. Diagnostico y control de enfermedades. En Acuicultura. Revista especializada de la camara nacional de acuicultura No 47, p. 8-9. Guayaquil: Edición internacional, Mayo -Junio del 2003.

asegurar el normal equilibrio entre las poblaciones de bacterias benéficas y peligrosas del cultivo, sin que resulte dañino para el hospedero. Una característica muy deseable es que los microorganismos que los componen sean capaces de colonizar y adherirse fácilmente a la pared intestinal, crece rápidamente, aumenta la resistencia del hospedero a las enfermedades, además de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas.

Si bien estas características son las deseables son muy pocas las bacterias que logran cumplir en su totalidad dichos requisitos. Sin embargo, mientras demuestren ser inocuas para el camarón sus propiedades ya sean únicas o múltiples pueden ser aprovechadas de manera exitosa; entre las bacterias y levaduras más utilizadas en cultivos de camarón se incluyen:

▣ ***Bacillus cereus***. A pesar de no adherirse al epitelio intestinal han demostrado ser eficaces en el desplazamiento de patógenos; su acción por lo tanto no depende de su capacidad de adherencia sino de su capacidad de colonización.

▣ ***Vibrio alginolyticus***. Cepa illi, se caracteriza por crecer rápida e invasivamente en el tracto digestivo del animal, incluso en el hepatopáncreas su presencia física evita que su espacio sea ocupado por organismos no deseados.

▣ **Levaduras**. No son huéspedes habituales de la flora digestiva del camarón, se utilizan por su poder fermentativo y por su riqueza en la producción de sustancias que ayudan al proceso de digestión; el metabolismo propio de las levaduras situado en condiciones de anaerobiosis pone a disposición de los camarones enzimas, vitamina B, aminoácidos, minerales, iones metálicos y otros co-factores importantes en la nutrición; las más usadas son: *Sacharomyces cerevisiae*, *Sacharomyces fragilis*.

▣ ***Lactobacillus sp.*** Son bacterias capaces de transformar la lactosa en ácido láctico, al disminuir el pH a niveles tan bajos hacen posible la supervivencia de microorganismos tan peligrosos como las *Pseudomonas spp.* y los *Vibrio spp.* Por otro lado la baja del pH protege al organismo de los efectos secundarios de acciones de infecciones virales y fúngicas. Se destaca la especie *Lactobacillus acid*, capaz de fabricar vitaminas del grupo B, productor de peróxido de hidrógeno, sustancia que impide el crecimiento de ciertas bacterias anaerobias.

▣ ***Vibrio probioticus***. Es capaz de inhibir el crecimiento de organismos patógenos mediante la producción de sustancias o péptidos antibacterianos.

Los probióticos surgen como una alternativa al uso de antibióticos para el control de enfermedades en larvas de camarón.

■ **BACTHER PREMIUM.** Complejo microbiano y enzimático cuyo campo de acción son los desechos orgánicos presentes en el agua, dando un balance bioactivado del medio de producción; contribuye a la degradación de los desechos orgánicos y de las toxinas; a demás estabiliza el medio interviniendo en los proceso biológicos equilibrando los parámetros que contribuyen al desarrollo de una flora microbiana benéfica, crea condiciones optimas evitando stress, disminuye la incidencia de bacterias patógenas, manteniendo un medio sano para la larva.

Composición: microorganismos y enzimas nitrificantes, proteoliticos y celuloliticos, levadura, enzimas y metabolitos biológicamente activados.

■ **BPA:** es un potencializador de productos microbianos, fuente da carbono y nitrógeno orgánico que al ser utilizado en condiciones de aireación, induce al crecimiento y multiplicación de los microorganismos benéficos, además aumenta su capacidad de establecimiento en los sitios de utilización.

Composición: extracto de levadura, glucosa, peptona de carne, aminoácidos, vitaminas, minerales y ácidos nucleicos.

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 LOCALIZACIÓN

El proyecto se desarrolló en dos de los laboratorios de la empresa EXPALSA (Exportadora de Alimentos S.A.):

De acuerdo a Encarta⁵⁰ el laboratorio Aqualab, ubicado en la localidad de Ayangue a 25.1 Kilómetros de la Península de Santa Elena, encontrado a una latitud de 2° 01' sur y una longitud de 80° 43' oeste en la provincia del Guayas; Ayangue posee un clima tropical, con una temperatura promedio de 25°C, una altura de 0 a 10 metros sobre el nivel del mar y una precipitación anual inferior a 500 mm.

De acuerdo a Encarta⁵¹ el laboratorio John William, ubicado en el sector La Diablica a 6.20 Kilómetros del Cantón La Libertad, encontrado a una latitud de 2° 16' sur y una longitud de 80° 54' oeste en la provincia del Guayas, su temperatura promedio es de 25°C, tiene una altura entre 0 a 10 metros sobre el nivel del mar y posee una precipitación anual promedio de 500 mm. (Figura 2)

Figura 2. Mapa localización geográfica de la Localidad de Ayangue y el Sector La Diablica provincia del Guayas – Ecuador



Encarta, Atlas dinámico, mapas multimedia. 2002

⁵⁰ ENCARTA, Atlas dinámico, mapas multimedia. 2002

⁵¹ Ibid.

5.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

Las muestras fueron tomadas de dos laboratorios de la provincia del Guayas – Ecuador, en cada uno se manejó la misma metodología.; teniendo en cuenta que en el laboratorio Aqualab todos los tanques se manejan con la adición de probióticos, y en el laboratorio John William gracias a la colaboración del personal administrativo y técnico se nos permitió trabajar con dos tanques sin la aplicación de probióticos, ya que todos los laboratorios de la división de la empresa Expalsa S.A. tienen como protocolo de manejo la aplicación de probióticos (Bacter premium).

5.2.1 Laboratorio Aqualab. La primera muestra se tomó del reservorio o cisterna que surte a cada uno de los tanques de cultivo, al agua con los nauplios a sembrar, al masivo de algas previo al bombeo a los tanques y al agua de mar de la zona de bombeo, esto con el fin de tener una evaluación inicial de las condiciones bacteriológicas del agua que ingresa a los tanques de larvicultura; luego se tomó una muestra del agua de los tanques antes de la siembra y por ultimo 4 horas después de la siembra de los nauplios (nauplio v) en los tanques de fibra de vidrio. Los muestreos posteriores se hicieron cada cinco días, se evaluaron cuatro tanques, llevándose registros de los parámetros de calidad del agua de cada tanque desde la siembra hasta la cosecha con el fin de mantener un control. Tanque 23 (ver Anexo A), tanque 24 (ver Anexo B), tanque 29 (ver Anexo C) y tanque 30 (ver Anexo D).

5.2.2 Laboratorio John William. La primera muestra fue tomada directamente de los tanques antes de la siembra ya que no hay reservorio o cisterna en este laboratorio, adicional a esto se tomaron muestras del masivo de algas previo al bombeo y al agua con los nauplios a sembrar, horas después de la siembra de los nauplios (nauplio v), se tomó la siguiente muestra. Los muestreos siguientes se hicieron cada cinco días, se evaluaron dos tanques y se llevó control de los parámetros de calidad de agua. Tanque 7 (ver Anexo E) y tanque 21 (ver Anexo F).

Al ser homogéneas las condiciones de los tanques en cada laboratorio, se puede escoger una muestra al azar de tanques y ser representativa. A cada uno, se le evaluó la parte superficial y profunda y a cada muestra se le realizó sus respectivas pruebas.

5.3 INSTALACIONES

5.3.1 Laboratorio Aqualab. Laboratorio dedicado a la producción de larvas de camarón; sus instalaciones constan de un sistema de bombeo que impulsa el agua a dos cisternas de 800 toneladas de capacidad (Figura 3), luego es

distribuida en líneas independientes a la sala de filtración y acondicionamiento térmico para finalmente llegar a las áreas de producción. Posee tres salas de larvicultura con un total de 48 tanques de fibra de vidrio (16 en cada sala), cada uno con una capacidad de 13 toneladas de capacidad (Figura 4). Tienen un sistema de control de temperatura con un intercambiador de titanio por el que circula agua caliente lo que permite mantener un rango de temperatura constante. Adicional a esto, el laboratorio cuenta con un departamento de algas que trabaja con masivos (tanques de 13 toneladas de capacidad) para el suministro de fitoplancton a las salas de larvas . (Figura 5)



Figura 3. Cisternas

Figura 4. Sala de Larvicultura.
Tanques de fibra de vidrio.

Figura 5. Masivos de algas, tanques de 13 toneladas de capacidad.



5.3.2 Laboratorio John William. Este laboratorio cuenta con 22 tanques de fibra de vidrio, de 20 toneladas de capacidad (Figura 6), cada tanque está equipado con una línea de aire que atraviesa el tanque y un serpentín que permite el aumento y mantenimiento de la temperatura del agua indispensable en época de frío; cada tanque tiene una salida de agua ubicada al extremo de este que cae a un canal común para todos, la entrada de agua es independiente para cada tanque. En la parte de masivos de algas (Figura 7), para larvicultura se trabaja con tanques de cemento pintados de blanco con capacidades de 26 toneladas.



Figura 6. Tanques de fibra de vidrio.



Figura 7. Masivos de algas

5.4 MATERIALES Y EQUIPOS

- Cajas de Petri.
- Autoclave.
- Balanza Analítica.
- Microscopio.
- Nevera.
- Incubadora.
- Estufa.
- Cuenta colonias.
- Beacker.
- Erlenmeyer.
- Probetas.
- Pipetas 10, 5, 1.0 y 0.1 ml.
- Micropipetas de 10 μ l - 100 μ l
- Tubos de vidrio con tapa.
- Tubos de ensayo.
- Tubos eppendorf.
- Perlas de vidrio.
- Asa de inoculación curva.
- Asa de inoculación recta.
- Porta objetos.
- Cubre objetos.
- Papel aluminio.
- Papel parafilm.
- Cinta de enmascarar.
- Frascos para muestras de laboratorio clínico.
- Malla 100 μ .
- Bolsas con gel congelante.
- Mechero Bunsen o de gas.
- Mecheros de alcohol.
- Gradillas de madera y plástico.
- Guantes quirúrgicos.
- Tapa bocas.
- Algodón.
- Agar TCBS.
- Agar marino.
- Agar CHAPMAN.
- Agar TSA.
- Caldo TSB.

- Agar SIM.
- Agar TSI.
- Agar citrato SIMMONS.
- Agar urea.
- Agar MIO.
- Agar bacteriológico.
- Medio de cultivo OF (oxidación-fermentación).
- Caldo nitrato.
- Caldo Rojo de Metilo Voges Proskauer (RMVP).
- Cloruro de sodio (NaCl).
- Cinc en polvo.
- Reactivo Griess-Ilosvay.
- Reactivo de Kovac's.
- D(+) Glucosa.
- D(+) Sacarosa o sucrosa.
- D(+) Lactosa.
- L-arabinosa.
- D-manosa.
- D-manitol.
- D-galactosa.
- Púrpura de bromo cresol.
- Hidróxido de sodio al 0.02N.
- Tiras indicadoras de oxidasa.
- Hidróxido potásico.
- Rojo de metilo.
- Etanol absoluto.
- Peróxido de hidrógeno o agua oxigenada.
- α -naftol.
- Agua destilada.
- Cristal violeta.
- Lugol.
- Alcohol al 96%.
- Safranina.
- Alcohol.
- Cloro.
- Ácido clorhídrico (HCl).

5.5 PERÍODO DE ESTUDIO

El trabajo de campo se realizó durante dos períodos (corridas) de producción, que tiene una duración de 25 días por cada una, más el tiempo de incubación requerido por cada prueba a realizarse. El primer estudio se realizó en el laboratorio Aqualab durante el mes de octubre del 2004; el segundo estudio se hizo en el laboratorio John William en el mes de diciembre del 2004, culminando en el laboratorio de Ingeniería en Producción Acuícola de la Universidad de Nariño en las primeras semanas del mes de enero del 2005; dado que en el mes de noviembre, fue aprobado y permitido realizar la segunda parte del estudio, donde se trabajó con dos tanques sin la aplicación de probióticos, el trabajo de campo se detuvo durante este mes, tiempo que fue utilizado en la recolección de información bibliográfica y apoyo a las actividades propias de la empresa, centradas básicamente en el área de larvicultura.

5.6 PLAN DE MANEJO

Se tomó un volumen de 100 ml. de muestra de cada tanque a evaluar, en frascos para muestras de laboratorio clínico (plásticos estériles), y se llevaron al laboratorio de investigación de Aqualab donde se realizó las pruebas. Lo primero que se hizo fue filtrar las muestras de agua por una malla de 100 μ , hecho esto se preparó las diluciones con solución salina al 3%, lo que equivale a 30 partes por mil, (teniendo en cuenta que la salinidad del mar oscila entre 30 y 34 partes por mil), para proceder a sembrar en el medio selectivo, en este caso, agar TCBS para formación de *Vibrios*, agar marino, y agar CHAPMAN para formación de *Staphylococcus*; una vez formadas las colonias, se procedió a cuantificarlas, con ayuda de un cuenta colonias, lo que permitió observar su morfología (ver figura 1); hecho esto se realizó las pruebas de tinción de Gram para identificar si son gram-positivas o gram-negativas, posteriormente se aisló y purificó la colonia de interés en agar TSA y por último se realizó las pruebas bioquímicas respectivas que permitieron identificar las especies bacterianas presentes. El mismo procedimiento se realizó en el laboratorio John William con la diferencia de que las pruebas bioquímicas no se realizaron en dicho laboratorio, pues no se contaba con un espacio suficientemente amplio y las instalaciones en las que se trabajó debían ser compartidas con el personal, impidiendo el normal desarrollo de sus actividades; por esta razón se tomó la decisión de sembrar las bacterias ya purificadas en tubos eppendorf que contenían caldo TSB, y glicerol al 15%, previamente marcados para evitar confusiones en el momento de inocular y posteriormente activar y sembrar, para ser congeladas a una temperatura de -4°C, todo en condiciones asépticas utilizando un mechero Bunsen, para posteriormente transportarlas desde la provincia del Guayas-Ecuador hasta la ciudad de Pasto-Colombia en un termo con bolsas de gel congelante, lo que permitió tener las muestras congeladas y preservadas. Una vez en el laboratorio de Ingeniería en

Producción Acuícola de la Universidad de Nariño se esterilizaron y prepararon los materiales para la realización de las pruebas bioquímicas y tinción de gram, teniendo en cuenta que las bacterias congeladas debían ser aclimatadas a temperatura ambiente, para ser activadas en el medio de cultivo TSB, una vez crecieron en dicho medio, se sembraron en agar TSA haciendo repiques para anular cualquier contaminación que se pudo presentar durante el aislamiento en los tubos eppendorf, posterior a esto se realizó tinción de Gram y pruebas bioquímicas a cada colonia para su identificación.

5.7 METODOLOGÍA DE TRABAJO

De acuerdo a lo estipulado por Carvaca⁴⁵ los medios utilizados fueron:

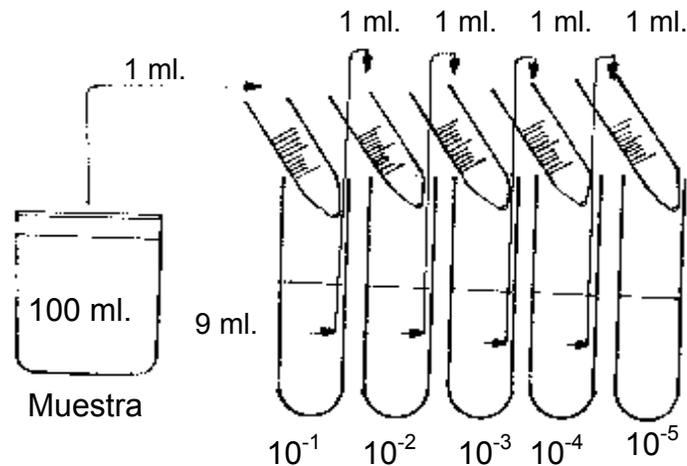
Es importante aclarar que todos los materiales utilizados fueron esterilizados previamente a su uso, para evitar focos de contaminación que puedan alterar los resultados.

5.7.1 Preparación de diluciones. Se prepararon diluciones con solución salina al 3% con el fin de favorecer el crecimiento de bacterias marinas. Las muestras líquidas fueron diluidas antes de ser sembradas en los medios. Se tuvo en cuenta las características de crecimiento de los medios, la turbidez o transparencia y la capacidad de sedimentación de materia orgánica de tal forma que las diluciones serán variables dependiendo de estos factores. El proceso de dilución de la muestra es el siguiente:

Con la ayuda de una pipeta estéril, se tomó 1 ml. de la muestra a evaluar y se adicionó a un tubo que contenía 9 ml. de solución salina al 3% esterilizada, se mezcló y se agitó bien. Esta primera dilución correspondió a una concentración de 1:10 (10^{-1}) y, de esta forma se continuó hasta obtener las diluciones deseadas, en este caso hasta la dilución 1:10.000 (10^{-4}). Figura 8.

⁴⁵ CARVACA, Fernando. Manual practico de bacteriología marina. Guayaquil: Escuela Superior Politécnica del Litoral. Fonapre-Caf, 1990. 24 p.

Figura 8. Diagrama formación de diluciones en solución salina al 3%, de la muestra tomada por tanque



5.7.2 Medios selectivos. Se trabajó con los siguientes medios selectivos: TCBS, Agar Marino y CHAPMAN; las diluciones escogidas para cada medio dependían de la carga bacteriana encontrada en el muestreo anterior.

Según lo estipulado en el Manual Práctico de Bacteriología Marina⁵² afirma lo siguiente:

■ **Agar TCBS (Tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa).** Es un medio selectivo utilizado para el cultivo y aislamiento de especies de *Vibrio spp.* presentes en las muestras de agua salina y estuarinas, especies marinas y otros materiales o fuentes objeto de investigación.

Para preparar 100 ml. del medio, se pesó 8.9 g. de TCBS y 1.5 g. de NaCl que fueron disueltos en 100 ml. de agua destilada en un erlenmeyer, se agitó constantemente, se llevó a ebullición para completar la disolución, lo cual se evidencia por la no formación de grumos en las paredes del erlenmeyer; este medio no se autoclava para evitar la degradación de las sales biliares lo que le quitaría selectividad al medio; se dejó enfriar hasta 45°C y se distribuyó en las cajas petri manteniendo condiciones de asepsia con la ayuda de un mechero Bunsen; una vez el medio se solidificó las cajas se invirtieron para que el vapor retenido en la tapa al condensarse no caiga en el medio y lo contamine. Las cajas ya preparadas fueron sembradas de acuerdo a la dilución escogida teniendo en

⁵² Ibid. p. 9-27.

cuenta el periodo de la corrida; la muestra se sembró en la parte superficial de la placa tomando 0.1 ml. de la dilución y homogenizando con perlas de vidrio; el tiempo de incubación fue de 24 horas a una temperatura de 37° C. (Ver Figuras 9 y 10)

▣ **Agar marino.** Es un medio utilizado para el crecimiento, desarrollo y conteo de la mayoría de las especies marinas, es empleado para el cultivo de especies de *Vibrio spp.*, *Aeromonas spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Pseudomonas spp.* y otros microorganismos marinos presentes en la muestra de estudio.

Para la preparación de este medio se pesaron 5.5 g. de agar marino y 0.85 g. de bactoagar y se disolvieron en un erlenmeyer con 100 ml. de agua destilada, se calentó hasta ebullición para que se disuelva el medio por completo, se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión (121°C), no se adicionó NaCl al medio ya que su composición tiene incorporado un alto contenido de esta sal; una vez el medio estuvo listo, se vertió en las cajas, se dejó solidificar para luego ser invertidas. Para sembrar se utilizó el mismo método que para el agar TCBS, el tiempo de incubación fue de 24 horas a una temperatura de 37° C. (Ver Figura 12)

▣ **Agar CHAPMAN.** Según el manual de medios de cultivo Merck⁵³, es un medio que permite el aislamiento y diferenciación de bacterias Gram-positivas (estafilococos). Para preparar este medio se utilizó 100 ml. de agua destilada y se adicionó 11.1 g. de agar CHAPMAN y 1,5 g de NaCl, se llevó a ebullición y se autoclavó por 15 minutos a 15 libras de presión. La muestra fue sembrada en la superficie tomando 0.1 ml. de la dilución, se homogenizó con perlas de vidrio. El tiempo de incubación fue de 24 horas a una temperatura de 37° C. (Ver Figura 11)



Figura 9. Fotografía colonias bacterianas en agar TCBS

⁵³ MANUAL DE MEDIOS DE CULTIVO. MERCK. Op. Cit., 74 p.

Figura 10. Fotografía colonias bacterianas en agar TCBS

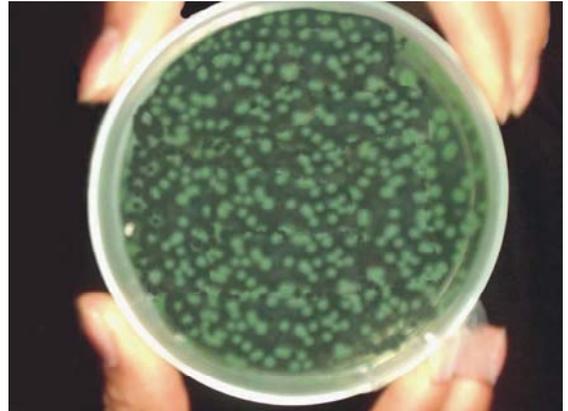


Figura 11. Fotografía colonias bacterianas en agar CHAPMAN

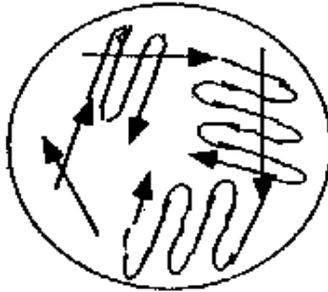
Figura 12. Fotografía colonias bacterianas en agar MARINO



5.7.3 Medios para aislamiento y conteo.

▣ **Medio para aislamiento. Agar TSA (Trypticase soya agar).** De acuerdo con Montaña⁵⁴ es de particular utilidad para el aislamiento de bacterias patógenas a partir de aguas marinas y estuarinas. A partir de un cultivo primario (agares selectivos) se hacen repetidos subcultivos de las bacterias de interés por el técnica de agotamiento (ver Figura 10), en este agar para purificación de la cepa. Una vez la cepa bacteriana purificada puede ser utilizada para tinción de gram y pruebas bioquímicas. Por cada colonia diferente encontrada se sembró en una caja de este agar.

Figura 13. Técnica de agotamiento



De acuerdo con Carvaca⁵⁵ la preparación de este medio es la siguiente: se pesó 4 g. de TSA y 1.5 g. de NaCl y se disolvió en un erlenmeyer con 100 ml. de agua destilada, se agitó vigorosamente y se llevó a ebullición para luego autoclavarse por 15 minutos a 15 libras de presión, posteriormente se distribuyó en cajas dejándose solidificar para luego ser invertidas, hecho esto, se procedió a sembrar. El tiempo de incubación fue de 24 horas a una temperatura de $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

▣ **Medio para conteo. Plate Count Agar.** Según Carvaca⁵⁶ es muy empleado para el examen microbiológico de alimentos, aguas y especies marinas, además para determinar la población bacteriana total presente en la muestra.

⁵⁴ MONTAÑO, John. Introducción a las técnicas de biología molecular (Dot Blot, PCR) y bacteriología (carga bacteriana en microplacas) utilizadas para la detección de patógenos que afecta al cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei* en el Ecuador. Guayaquil: Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Naturales, escuela de Biología, 2003. 15 p.

⁵⁵ CARVACA, Fernando Op. Cit., 22 p.

⁵⁶ Ibid. 25 p.

Este medio se preparó pesando 1.75 g. de Plate Count Agar y 1.5 g de NaCl y se suspendieron en 100 ml. de agua destilada, se agitó constantemente y se calentó hasta ebullición para disolver el medio completamente. Se llevó a autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión, manteniendo el medio en estado fundido. (Ver Figura 14)



Figura 14. Fotografía colonias formadas en agar Plate Count.

La técnica utilizada fue la de vertido en placa que consistió en tomar 1 ml. de la dilución a trabajar y vertiéndolo en la caja estéril, luego se adicionó el medio fundido y se agitó suavemente (ver Figura 15), en forma de ocho para homogenizar la muestra con el medio (ver Figura 16), se dejó solidificar el medio y se incubó a 37°C por 24 horas. Este procedimiento se hizo para dos cajas petri.

Figura 15. Técnica vertido en placa

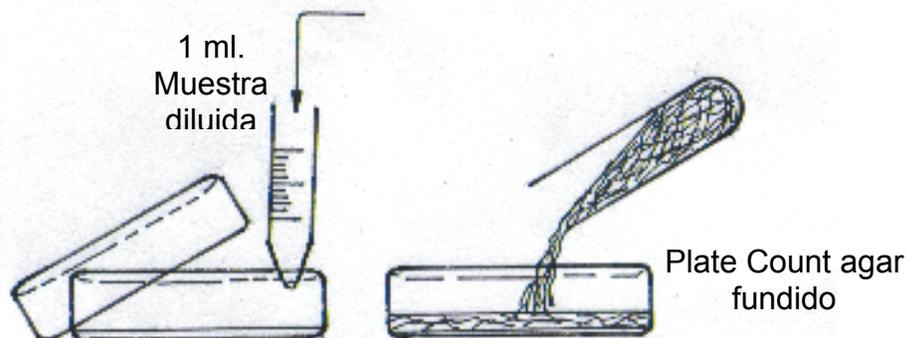
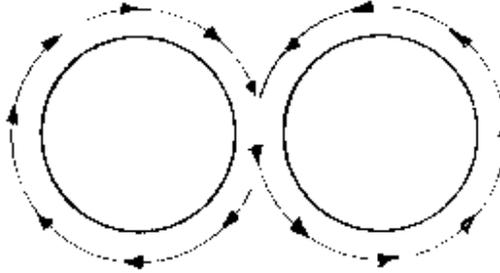


Figura 16. Homogenización de la muestra con el medio



‡ **Medio TSB (tripticosa soya caldo).** Este medio fue utilizado para la conservación de la bacteria antes de ser transportada al laboratorio de la Universidad de Nariño y posteriormente para la activación de la bacteria en el mismo laboratorio.

Una vez aisladas y purificadas las bacterias en agar TSA, se procedió a conservar las cepas para poder transportarla, para esto fue necesario preparar el medio (3 g. de TSB en 100 ml. de agua destilada), autoclavar por 15 minutos a 15 libras de presión, listo el medio se repartió 1 ml en cada tubo eppendorf (se preparó cuatro tubos por cada colonia de interés, para asegurar la cepa), a cada tubo se adicionó glicerol al 15% de la cantidad utilizada de TSB por tubo (0.15 ml.), se sellaron los tubos con papel parafilm y se llevó a congelación (-4°C); previo a esto las placas fueron selladas con papel parafilm y conservadas en nevera hasta completar el total de cepas de interés y poder inocularlas en TSB.

Para la activación de las cepas congeladas, en el laboratorio de la Universidad de Nariño, primero se aclimataron pasando de congelación a refrigeración y por último a temperatura ambiente. Posteriormente se preparó el medio (3 g. en 100 ml. de agua destilada, sin glicerol) y se autoclavó por 15 minutos a 15 libras de presión, pero esta vez en tubos de ensayo (5 ml. por tubo), se sembró cada colonia en un tubo diferente inoculando 1 ml. del tubo eppendorf. Se incubó por 24 horas a 37°C, la activación de la bacteria se observa porque pasado este tiempo el medio de color amarillento cristalino, se torna amarillo turbio.

5.7.4 Recuento de colonias. Se cuantificó el número de colonias encontradas en el agar Plate Count y se multiplicó por el factor de dilución empleado para obtener el recuento total en caja de la muestra con ayuda de un cuenta colonias, lo que permitió conocer la morfología (figura 1) de cada una de ellas; estos datos se llevaron en registros. (Ver Anexo G)

5.7.5 Tinción de gram. De acuerdo con Wistreich y Lechtman⁵⁷, esta prueba descubierta por Cristian Gram, permite conocer uno de los dos grupos en que se dividen las bacterias, las bacterias gram-negativas y las gram-positivas; para esto se realizó un protocolo que permite su identificación. (Ver Figuras 17 y 18)

■ Se tomó un frotis por cada una de las colonias y se extendió en cada porta objetos dejándolo secar al calor.

■ Se adicionó unas gotas de cristal violeta cubriendo la muestra, se dejó por 1 minuto y se lavó suavemente con agua.

■ Se adicionó lugol (yoduro de potasio y yodo), se dejó por 1 minuto y se lavó suavemente con agua.

■ Se adicionó alcohol al 96%, se dejó por 30 a 40 segundos y se lavó con agua.

■ Por último se adicionó Safranina, se dejó por 30 segundos a 1 minuto y se lavó; se deja secar, para luego observarse al microscopio e identificar el grupo al que pertenece la colonia bacteriana.

Una vez identificado el grupo, se procedió a realizar las pruebas bioquímicas, que en el caso de las gram-positivas se determinó con la prueba de catalasa; si la reacción fue positiva se asume que son *Staphylococcus spp.* y si fue negativa *Streptococcus spp.*. Para las gram-negativas se trabajó con las pruebas descritas a continuación.

⁵⁷ WISTREICH, George y LECHTMAN, Max. Practicas de laboratorio en microbiología. México: LIMUSA, 1989. p. 61-62.

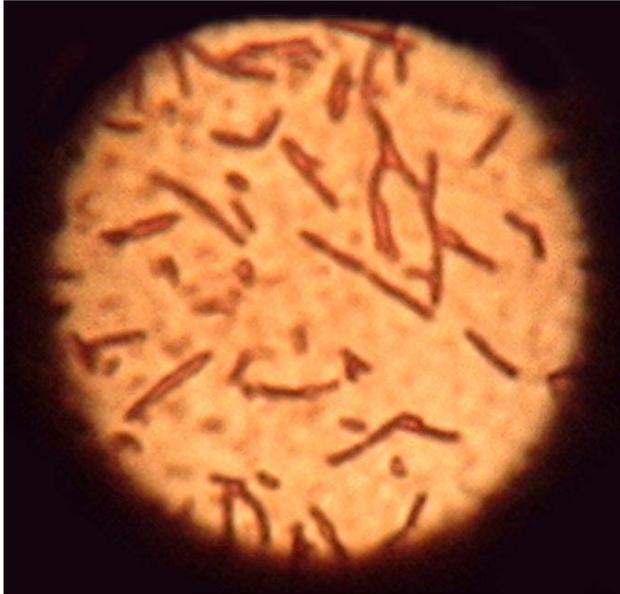
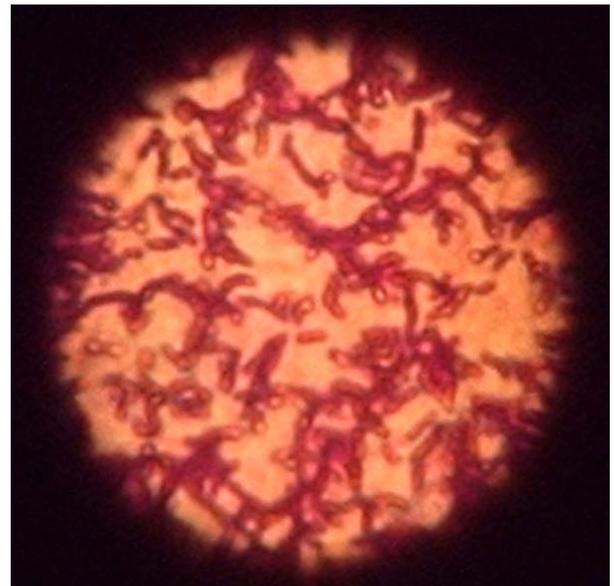


Figura 17. Bacilos Gram negativos.
Objetivo 100 X

Figura 18. Pleomorfismo, característico en bacterias marinas.
Objetivo 100 X



5.7.6 Medios para la realización de pruebas bioquímicas para bacterias gram-negativas.

De acuerdo con lo estipulado en el Manual Practico de Bacteriología Marina por Carvaca, se siguió el siguiente protocolo para el manejo y preparación de los medios.⁵⁸

⁵⁸ CARVACA, Fernando. Op Cit., p 31- 32- 33- 34 –35- 36- 37- 38- 39- 40- 41- 42- 45- 46- 47- 48.

▣ **Medio de cultivo SIM (sulfuro de hidrógeno-Indol-Motilidad).** Este medio sirve para determinar la producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S), la formación de indol y la motilidad, para la preparación de este medio de pesó 3.6 g. de SIM y se disolvió en un erlenmeyer con 100 ml. de agua destilada, se calentó hasta ebullición, luego se distribuyó el medio en tubos de ensayo con tapa (5 ml. por cada uno) y se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión, luego se retiraron y se dejaron solidificar en posición vertical a temperatura ambiente; el medio fue sembrado por punción central en la capa superficial del medio e incubado por 24 horas a $37^\circ C$.

La demostración del indol se efectúa mediante el reactivo de KOVACS, adicionándose de 4 a 5 gotas del reactivo a cada tubo previamente incubado, manifestándose una reacción positiva con una coloración rojo-púrpura a los pocos segundos de ser aplicado; la formación de H_2S se manifiesta por el ennegrecimiento de la zona de crecimiento y la motilidad se observa por la turbidez difusa del medio alrededor del canal de la picadura, tanto la motilidad como la presencia de H_2S se observan antes de la aplicación de reactivo. (Ver Figura 19)

▣ **Medio TSI (agar-hierro-tres-azúcares).** Con ayuda de este medio se puede conocer la degradación del azúcar con la formación de ácido. Es un agar compuesto por tres azúcares: lactosa, glucosa y sacarosa. Se preparó con 75% de agua de mar autoclavada y 25% de agua destilada, se adicionó la relación de 65 g. del medio por litro, se calentó y se distribuyó en tubos de ensayo con tapa (5 ml. por cada tubo), se llevó a autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión, se retiró y se dejó enfriar a temperatura ambiente en posición inclinada (pico de flauta); la muestra se sembró en los tubos de ensayo por punción y estrías tanto en la superficie como en la columna central; el tiempo de incubación fue de 24 horas a un temperatura de $37^\circ C$.

El medio de cultivo preparado es de color rojo-anaranjado, si el medio se torna rojo intenso, significa que no hay fermentación de glucosa, sacarosa ni lactosa, si se torna amarillo en la parte del fondo y rojo en la superficie (K/A), es que la fermentación solo ocurre en la glucosa por la producción de ácido, si la coloración amarilla se encuentra a lo largo de todo el tubo (A/A), hay fermentación de los tres azúcares, si se presenta una coloración roja a lo largo de todo el tubo (K/K), no hay fermentación de azúcares; si hay una presencia de un precipitado negro, hay formación de ácido sulfhídrico (H_2S), ya sea a lo largo del tubo o en forma de anillo negro, si hay presencia de gas se observa burbujas en todo o parte del medio, siendo aerobia, de lo contrario la especie es anaerobia. (Ver Figura 20)

▣ **Agar citrato SIMMONS.** Para algunas bacterias el citrato es una fuente única de carbono, este medio permite conocer que microorganismos trabajan de esa forma; la preparación de este medio es la siguiente: se pesó 2.43 g. del medio y se disolvió en 100 ml. de agua destilada, se calentó para disolver bien el medio y se distribuyó en tubos de ensayo con tapa (5 ml. por tubo), se autoclavo por 15 minutos a 15 libras de presión, por último se retiró los tubos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente en posición inclinada, la muestra se siembra en la parte superficial del medio formando estrías, el tiempo de incubación en este medio fue de 24 horas a 37° C.

Al cabo del tiempo de incubación las bacterias que utilizaron el citrato como fuente de carbono para su desarrollo, producen una alcalinidad que se ve influenciada por la presencia de un color azul que se observa en el medio, y en algunas ocasiones se observa crecimiento en la superficie estriada, si el medio no cambia, significa que la bacteria no necesita del citrato como fuente de energía; el color azul se debe a la acción del indicador de pH azul de bromo timol que se encuentra en el medio, el cual en condiciones alcalinas es azul, mientras que se torna verde o verde amarillento cuando el pH es ácido. (Ver Figura 21)

▣ **Agar urea.** En este medio se puede conocer que microorganismos degradan la urea por medio de su enzima ureasa, produciendo amoníaco y la sub siguiente alcalinidad.

Este medio fue preparado de la siguiente manera: se disolvió por ebullición 1.5 g. de agar agar en 90 ml. de agua destilada, se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión, se dejó enfriar a 50°C, paralelo a esto se pesó 2.9 g. de agar urea y se disolvió en 10 ml. de agua destilada, se mezclaron bajo condiciones asépticas ambos preparados y se distribuyeron en tubos de ensayo con tapa (5 ml. por tubo), se dejó enfriar a temperatura ambiente en posición inclinada; la muestra fue sembrada en la superficie del medio formando estrías, se incubó por 24 horas a una temperatura de 37° C. El medio de cultivo es claro y de color amarillento anaranjado, si se torna a color fucsia o rojo pasado el tiempo de incubación la reacción es positiva. (Ver Figura 22)

▣ **Medio MIO (Motilidad-Indol-Ornitina).** Este medio fue utilizado básicamente para la prueba de ornitina. Se preparó disolviendo la relación de 31 g. por litro de agua destilada, se calentó y se repartió en tubos de ensayo, se llevó al autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión, se retiró los tubos y se dejó enfriar para posteriormente sembrar la colonia de interés, se incubó a 37°C por 24 horas. El medio preparado es de color morado, una vez incubado se hace la lectura, si el medio toma una coloración morada o gris-púrpura turbia significa que la prueba es positiva ocurriendo la descarboxilación de la ornitina a putrescina. de igual forma si

hay presencia de una coloración amarilla y en el fondo púrpura. Si el medio cambia por completo a amarillo indica fermentación de la glucosa considerándose la prueba negativa, de igual forma si el medio no manifiesta ningún cambio de coloración conservando el original. (Ver Figura 23)

▣ **Medio de cultivo OF (oxidación-fermentación).** Este medio permite conocer la degradación oxidativa y fermentativa de carbohidratos; para este medio se preparó dos tubos por cada colonia a evaluar, con el fin de observar la característica oxidativa o fermentativa de la bacteria.

Para la preparación de este medio en un erlenmeyer se disolvió la relación de 9.4 g. del medio por litro de agua destilada, se calentó hasta ebullición y se llevó a autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión, se sembró dos tubos (5 ml. por tubo) uno con el medio de cultivo y el otro con el medio más una capa de agar bacteriológico de un centímetro de espesor, se inoculó atravesando el medio hasta el fondo y se incubó a 37° C por 24 horas; el medio preparado es de color verde claro, si se observa una coloración amarilla en los dos tubos significa que la reacción es fermentativa, si la coloración amarilla se presenta en el tubo no recubierto con el tapón de agar bacteriológico, la reacción que se presenta es oxidativa. (Ver Figura 24)

▣ **Caldo rojo de metilo/Voges Proskauer (MR/VP).** Para este ensayo se trabajó inicialmente con dos tubos de ensayo con caldo de MR/VP donde se sembró la colonia seleccionada, para la preparación se pesó 1.7 g. del medio y se disolvió en un erlenmeyer con 100 ml. de agua destilada, se distribuyó en tubos (5 ml. por tubo) y se autoclavó por 15 minutos a 15 libras de presión, una vez listo el medio se sembró y se incubó por 24 horas a 37° C, posteriormente se realizaron dos ensayos:

* Ensayo 1. Prueba del Rojo Metilo. Se añadió al tubo uno, cinco gotas de solución indicadora de rojo de metilo, si la reacción es positiva se observara un color rojo. (Ver Figura 25)

Preparación de la solución indicadora Rojo de Metilo: 0.04 g de rojo de metilo en 60 ml. de etanol absoluto.

* Ensayo 2 Voges Proskauer. Al tubo dos se le añadió 0.6 ml de reactivo de BARRITT y 0.2 ml de hidróxido potásico (KOH) al 40%, esta prueba se dejó destapada por 15 minutos antes de observarse el resultado, pasado este tiempo se realizó la lectura, los tubos que presentaban un anillo en la superficie de color rojo demostraban que la prueba era positiva. (Ver Figura 26)

Preparación del Reactivo de BARRITT: 5 g. de α -naftol en 100 ml. de etanol absoluto.

Preparación de hidróxido potásico al 40%: 40 g. de KOH en 100 ml. de agua destilada.

■ **Catalasa.** Se tomó una porción de la colonia a evaluar, sobre un porta objetos se depositó una gota de peróxido de hidrógeno H_2O_2 o agua oxigenada y se sobre pone la masa bacteriana; la reacción es positiva cuando hay producción de burbujas sobre la colonia bacteriana y es negativa cuando no hay dicha producción. (Ver Figura 27)

■ **Caldo nitrato.** Medio para la demostración de la reducción del nitrato, se tomó una colonia del cultivo a evaluar y se sembró en el medio, el medio es preparado tomando una relación de 16.5 g. por litro de agua destilada, se disolvió y se introdujo en los tubos de ensayo (5 ml. por tubo), se autoclavó por 15 minutos a 15 libras de presión y se dejó enfriar, luego se sembró la colonia de interés y se incubó por 24 horas a $37^\circ C$, el caldo preparado es claro e incoloro, la prueba se confirma con la adición del reactivo de GRIESS-ILOSVAYS (5 a 6 gotas) por tubo.

De acuerdo con MacFaddin⁵⁹ la interpretación de esta prueba es la siguiente: una vez incubado el medio se adiciona el reactivo GRIESS-ILOSVAYS, después de 1 minuto se observa la reacción, si es positiva se presenta una coloración roja o rosa oscura lo que significa que hay una reducción del nitrato en una proporción baja y si es amarillo la reducción a nitrito es alta; la reacción es negativa si el medio no cambia de color, para lo cual se confirma con la prueba del cinc, a los tubos negativos se adicionó un granulo de cinc, si el medio no cambia de color la reacción es positiva ya que indica que el nitrato se redujo a nitrito y cierta cantidad se reduce a estado gaseoso (N_2); si se presenta una coloración roja o rosa significa que no hubo reducción de nitrato por lo tanto es negativa.

■ **Oxidasa.** De acuerdo con el manual Merck⁶⁰ Para la identificación de la presencia del citocromo oxidasa, se trabaja con tiras indicadoras de oxidasa Merck que indican si hay o no presencia de esta enzima.

Se tomó la colonia a evaluar y se acerco a la tira indicadora, al cabo de 20 a 60 segundos se observó la respuesta, si se torna azul la prueba es positiva.

⁵⁹ Mac FADDIN, Jean F. Op Cit., p 743 744.

⁶⁰ MANUAL DE MEDIOS DE CULTIVO MERCK: Darmstadt. 2002. 303 p.

▣ **Asimilación de carbohidratos.** Para la preparación se trabajó de acuerdo a lo estipulado por Collins⁶¹, por cada carbohidrato se manejó un volumen de agua destilada de 100 ml., se trabajó al 5% cada uno y se adicionó 0.2 ml. de un indicador, en este caso púrpura de bromo cresol.

Preparación del indicador, púrpura de bromo cresol: 0.1 g. de púrpura de bromo cresol y 9.2 m. de NaOH al 0.02N en 250 ml. de agua destilada.

Se trabajó con los siguientes carbohidratos: L-arabinosa, D-manosa, D-manitol, Sucrosa y D-galactosa; el medio toma una coloración púrpura cristalina, no se calentó se distribuyó en tubos y se autoclavó, por último se procedió a sembrar y a incubar por 24 horas a 37°C; pasado el tiempo de incubación se realizó la lectura, si el medio cambia a amarillo, significa que la bacteria asimilo ese carbohidrato por lo tanto la prueba se considera positiva, si no cambia de color la prueba es negativa. (Ver Figura 28)

▣ **Prueba de tolerancia 0% de salinidad.** De acuerdo con Solis⁶² para esta prueba se trabajó con caldo nutritivo (NB), la lectura se hizo de acuerdo a la apariencia del medio, si se torna turbio significa que hubo crecimiento por lo tanto es positiva, si permanece igual es negativa; el medio es de color claro e incoloro con una tonalidad amarilla.

Para la preparación se disolvió la relación de 8 g. del medio por litro de agua destilada, se distribuyó en tubos de ensayo (5 ml. por tubo), se llevo a autoclavar por 15 minutos a 15 libras de presión, se retiraron los tubos con el medio y se dejaron enfriar a temperatura ambiente, posteriormente se inoculó una porción de la colonia de interés y se observó el crecimiento a las 24 horas de incubación a 37°C.

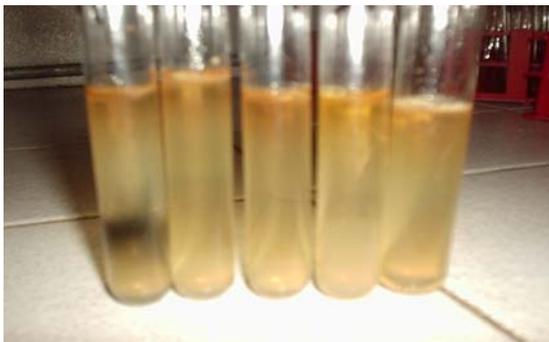


Figura 19. Prueba de indol, motilidad y presencia de H₂S en el medio de cultivo SIM.

⁶¹ COLLINS, C.H. Op Cit., 82 p.

⁶² SOLIS, A. Op Cit., 31 p.

Figura 20. Prueba de los tres azúcares en el medio de cultivo TSI



Figura 21. Prueba del citrato en medio de cultivo Citrato Simmons

Figura 22. Prueba de la ureasa en el medio de cultivo Urea





Figura 23. Prueba de la ornitina en el medio de cultivo MIO



Figura 24. Prueba de oxidación-fermentación en el medio de cultivo OF

Figura 25. Prueba de Rojo de metilo en el medio RMVP



Figura 26. Prueba de Voges Proskauer en medio de cultivo MRVP

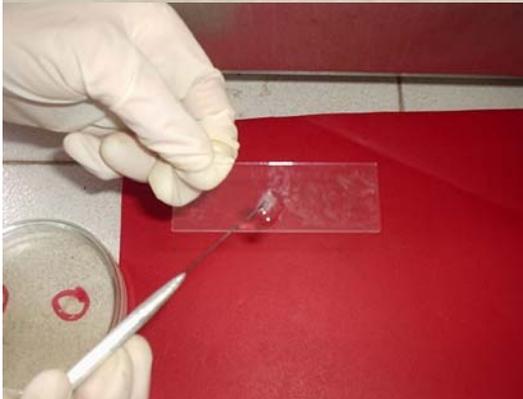


Figura 27. Prueba de catalasa, reacción positiva

Figura 28. Prueba para asimilación de carbohidratos



5.8 DISEÑO ESTADÍSTICO.

De acuerdo a lo estipulado por Naiman et. al ⁶³, el trabajo realizado es de tipo descriptivo. De esta manera, se utilizaron medidas de tendencia central, y representación gráfica, mediante la utilización de histogramas, con el fin de realizar los análisis respectivos de los datos arrojados durante el transcurso de la investigación.

Las unidades experimentales trabajadas, fueron todos los muestreos que se realizaron en cada laboratorio evaluado, tanto en los tanques como en las diferentes zonas que tienen relación con los tanques; las unidades experimentales se evaluaron de acuerdo a las fechas de muestreos de los laboratorio.

Cuadro 1. Unidades experimentales trabajadas en los tanques del Laboratorio Aqualab

Fecha de muestreo	Unidades Experimentales (UE)							
	Tanque 23		Tanque 24		Tanque 29		Tanque 30	
	Superficie	Fondo	Superficie	Fondo	Superficie	Fondo	Superficie	Fondo
4-Oct-04	2	2	2	2	2	2	2	2
9-Oct-04	1	1	1	1	1	1	1	1
15-Oct-04	2	2	2	2	2	2	2	2
20-Oct-04	1	1	1	1	1	1	1	1
24-Oct-04							1	1

⁶³ NAIMAN, Arnold. et al. Introducción a la estadística. México: McGRAW-HILL, 1987. p. 179 - 195.

Σ UE. Superficie y Fondo	6	6	6	6	6	6	7	7
Σ UE. Por TQ	12		12		12		14	
Total UE.	50							

Se trabajó con un total de 50 unidades experimentales en los tanques. (Ver Anexo H, I, J y K)

Cuadro 2. Unidades experimentales trabajadas en el Laboratorio Aqualab

Fecha de muestreo	Unidades Experimentales (UE)			
	Zona de bombeo	Cisterna	Agua Nauplios v	Masivo de algas
4-Oct-04	1	1	1	1
9-Oct-04		1		1
15-Oct-04		1		1
20-Oct-04		1		1
24-Oct-04				
Σ UE. Por muestra	1	4	1	4
Total UE.	10			

Se trabajó con un total de 10 unidades experimentales para las zonas relacionadas directamente con los tanques de muestreo. (Ver Anexo V, W, X y Y)

Durante la realización del trabajo de campo en el laboratorio Aqualab, se tomaron en total 60 muestreos o unidades experimentales.

Cuadro 3. Unidades experimentales trabajadas en los tanques del Laboratorio John William

Fecha de muestreo	Unidades Experimentales (UE)			
	Tanque 7		Tanque 21	
	Superficie	Fondo	Superficie	Fondo
3-Dic-04	2	2	2	2
8-Dic-04	1	1	1	1
13-Dic-04	1	1	1	1
18-Dic-04	1	1	1	1
21-Dic-04	1	1		
23-Dic-04			1	1
Σ UE. Por TQ	6	6	6	6

Total UE.	24
-----------	----

Continuación cuadro 3

Se trabajó con un total de 24 unidades experimentales en los tanques. (Ver Anexo Q y R)

Cuadro 4. Unidades experimentales trabajadas en el Laboratorio John William

Fecha de muestreo	Unidades Experimentales (UE)	
	Agua de Nauplios v	Masivo de algas
3-Dic-04	1	1
8-Dic-04		1
13-Dic-04		1
18-Dic-04		1
23-Dic-04		1
∑ UE. Por muestra	1	5
Total UE.	6	

Se trabajo con un total de 6 unidades experimentales para las zonas relacionadas directamente con los tanques de muestreo. (Ver Anexo Z y 1)

Durante la realización del trabajo de campo en el laboratorio John William, se tomaron en total 30 muestreos o unidades experimentales.

5.9 VARIABLES EVALUADAS. Se evaluó las siguientes variables durante el desarrollo de la investigación:

■ Género y especies más frecuentes. Los datos arrojados se compararon con las tablas de interpretación del Manual Concepto Azul y Bergey's Manual Systematic Bacteriology, permitiendo conocer las especies que se encontraban en el cultivo, y a su vez, evaluar la frecuencia con que estas se presentaban durante el desarrollo de la investigación.

■ Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Se trabajó con el medio Plate Count Agar para el conteo de colonias, se manejó dos cajas petri por cada muestra, se contó las colonias por cada caja, se promediaron los datos por muestra y se reporto de acuerdo al cuadro del anexo G .

■ Porcentaje de sobrevivencia larval. Se evaluó respecto a la cantidad de microorganismos encontrados por tanque y el porcentaje de sobrevivencia larval, que se realiza por conteo directo en dos etapas de la corrida, la primera de la siembra a la transferencia y la segunda de la transferencia a la cosecha.

6. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 GÉNERO Y ESPECIES ENCONTRADAS EN EL LABORATORIO AQUALAB

Para obtener los resultados de la primera variable planteada, inicialmente fue necesario evaluar la morfología de las colonias (ver figura 1) encontradas por cada tanque muestreado: Tanque 23 (ver anexo H), tanque 24 (ver anexo I), tanque 29 (ver anexo J) y tanque 30 (ver anexo K).

Para la identificación de la especie bacteriana se realizó pruebas bioquímicas y se interpretó de acuerdo a los manuales de Concepto Azul y Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Tanque 23 (ver anexo L), tanque 24 (ver anexo M), tanque 29 (ver anexo O) y tanque 30 (ver anexo P).

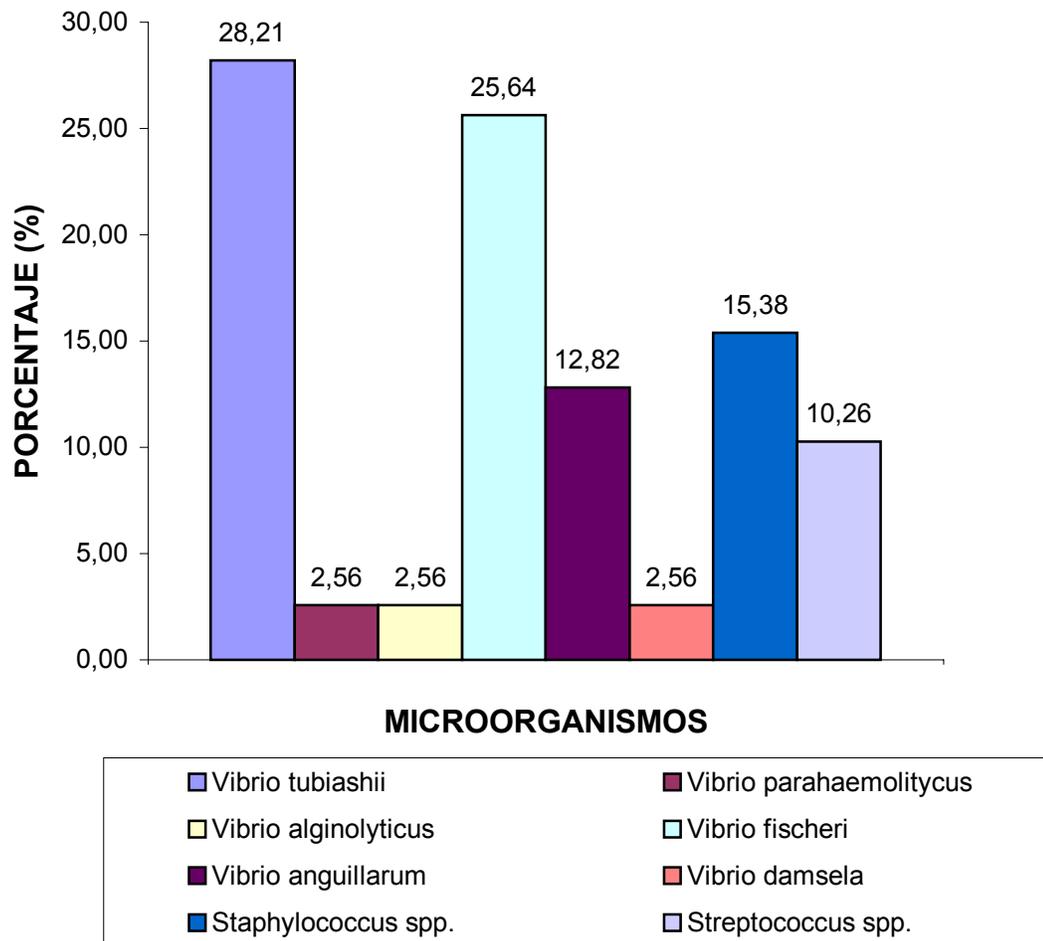
Identificadas las especies, se evaluó en porcentaje a cada una, de acuerdo a la frecuencia con que aparecían en cada tanque analizado, en el masivo de algas, en el agua de los nauplios previo a ser sembrados, en la cisterna de larvicultura y en la zona de bombeo.

Cuadro 5. Porcentaje por microorganismo encontrado en el tanque 23 Laboratorio Aqualab.

MICROORGANISMO	Cantidad total encontrada de microorganismos	PORCENTAJE (%)
<i>Vibrio tubiashii</i>	11	28.21
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	2.56
<i>Vibrio alginolyticus</i>	1	2.56
<i>Vibrio fischeri</i>	10	25.64
<i>Vibrio anguillarum</i>	5	12.82
<i>Vibrio damsela</i>	1	2.56
<i>Staphylococcus spp.</i>	6	15.38
<i>Streptococcus spp.</i>	4	10.26
Total	39	100 %

El Cuadro 5, muestra que el género predominante fue el *Vibrio* (74.4%) y dentro de éste, las especies más frecuentes en este tanque fueron el *Vibrio tubiashii* con el 28.21 %, *Vibrio fischeri* con el 25.64 % y *Vibrio anguillarum* (12.82%). Para las bacterias Gram-positivas, los *Staphylococcus spp.* (15.38 %) fueron las de mayor ocurrencia. La interpretación de los datos estadísticamente se puede ver en la Figura 29.

Figura 29. Porcentaje de microorganismos en el tanque 23. Laboratorio Aqualab.



Cuadro 6. Porcentaje por microorganismo encontrado en el tanque 24. Laboratorio Aqualab

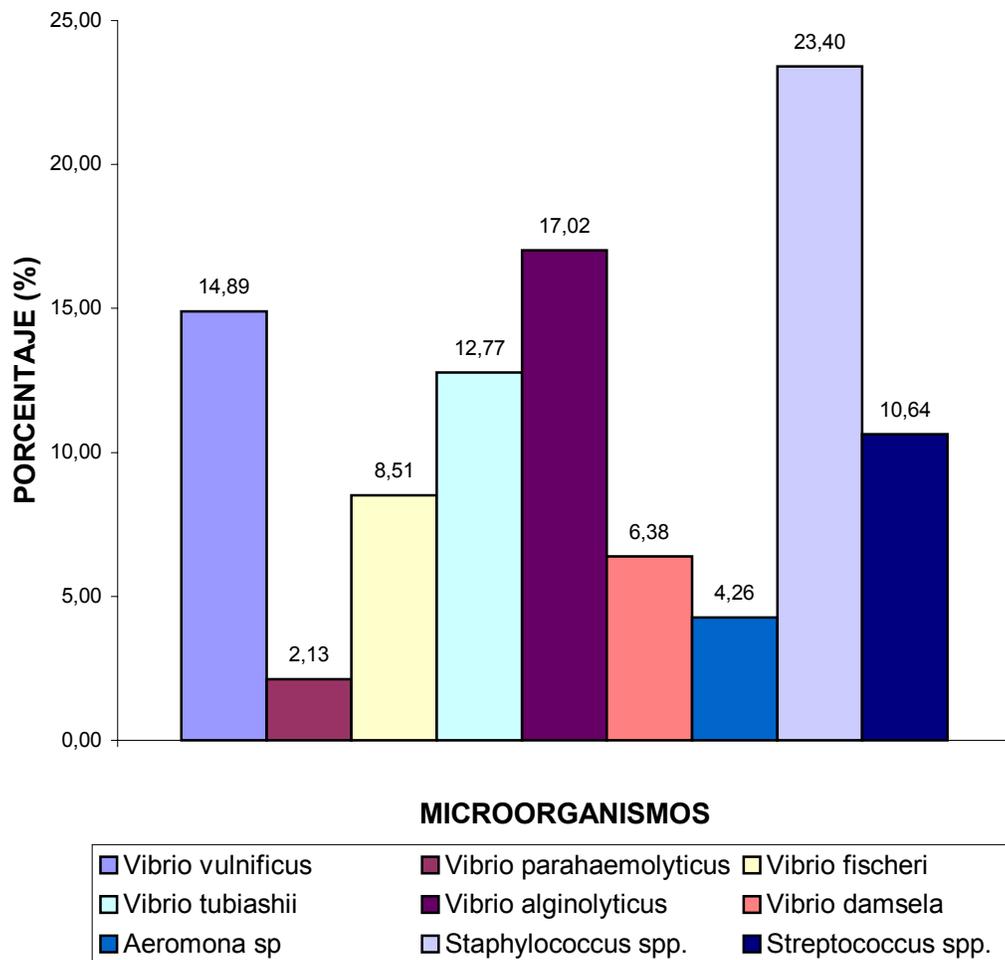
MICROORGANISMO	Cantidad total encontrada de microorganismos	PORCENTAJE (%)
<i>Vibrio vulnificus</i>	7	14,89
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	2,13
<i>Vibrio fischeri</i>	4	8,51
<i>Vibrio tubiashii</i>	6	12,77
<i>Vibrio alginolyticus</i>	8	17,02
<i>Vibrio damsela</i>	3	6,38
<i>Aeromona spp</i>	2	4,26

<i>Staphylococcus spp</i>	11	23,40
<i>Estreptococcus spp</i>	5	10,64
Total de especies	47	100 %

Continuación cuadro 6

El cuadro 6, muestra que el género predominante fue el *Vibrio* (61.7 %) frente al género *Aeromona spp.* (4.26 %). Las especies mas frecuentes en este tanque fueron el *Vibrio alginolyticus* (17.02 %), *Vibrio vulnificus* (14.89 %), *Vibrio tubiashii* (12.77 %). Para las bacterias Gram-positivas los *Staphylococcus spp.* representaron el mayor porcentaje con el 23. 40%. La interpretación de los datos se puede ver en la Figura 30.

Figura 30. Porcentaje de microorganismos en el tanque 24. Laboratorio Aqualab.



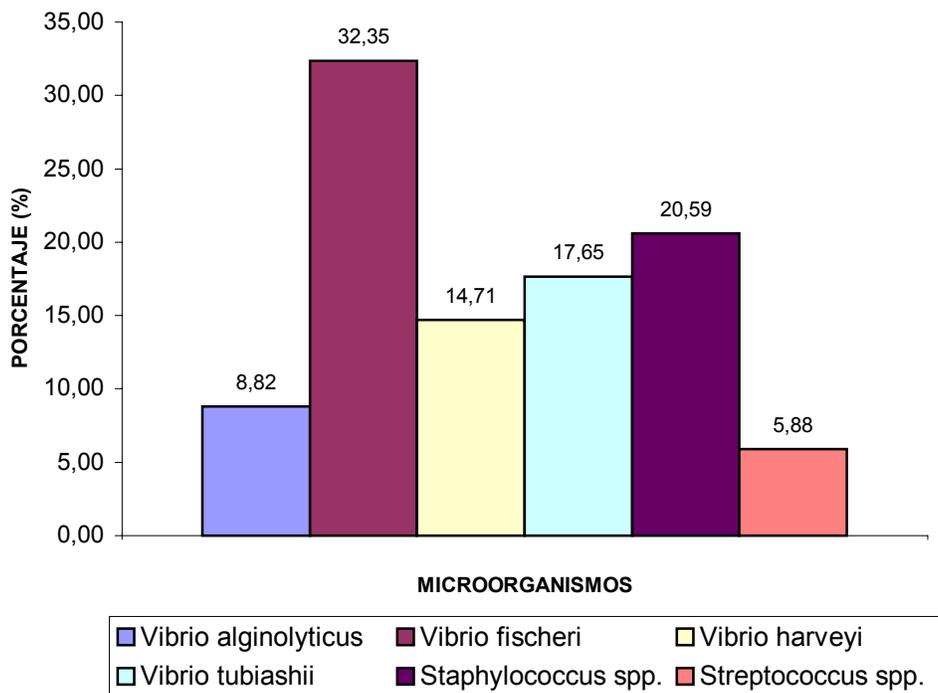
Cuadro 7. Porcentaje por microorganismo encontrado en el tanque 29. Laboratorio Aqualab

MICROORGANISMO	Cantidad total encontrada de microorganismos	PORCENTAJE (%)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	3	8,82
<i>Vibrio fischeri</i>	11	32,35
<i>Vibrio harveyi</i>	5	14,71
<i>Vibrio tubiashii</i>	6	17,65
<i>Staphylococcus spp</i>	7	20,59

<i>Streptococcus spp</i>	2	5,88
Total de especies	34	100 %

El cuadro 7, muestra el género el *Vibrio* 73.53 % como predominante; las especies mas frecuentes en este tanque fueron el *Vibrio fischeri* (32.35 %), seguida de *Vibrio tubiashii* (17.65 %). Para las bacterias Gram-positivas los *Staphylococcus spp.* se presentaron en mayor porcentaje con un 20.59 %. La interpretación de los datos se puede ver en la Figura 31.

Figura 31. Porcentaje de microorganismos en el tanque 29. Laboratorio Aqualab.



Cuadro 8. Porcentaje por microorganismo encontrado en el tanque 30. Laboratorio Aqualab

MICROORGANISMO	Cantidad total encontrada de microorganismos	PORCENTAJE (%)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	11	17,74
<i>Vibrio vulnificus</i>	9	14,52
<i>Vibrio damsela</i>	4	6,45

<i>Vibrio tubiashii</i>	10	16,13
<i>Vibrio hollisae</i>	3	4,84
<i>Vibrio campbelli</i>	1	1,61
<i>Vibrio anguillarum</i>	3	4,84
<i>Vibrio furnissi</i>	1	1,61
<i>Staphylococcus spp</i>	15	24,19
<i>Estreptococcus spp</i>	5	8,06
Total de especies	62	100 %

El cuadro 8, muestra predominante al género *Vibrio* 67.74 %; las especies mas frecuentes en este tanque fueron el *Vibrio alginolyticus* (17.74 %), *Vibrio tubiashii* (16.13 %) y *Vibrio vulnificus* (14.52 %). Para las bacterias Gram-positivas los *Staphylococcus spp.* se presentaron en mayor porcentaje con el 24.19 %. La interpretación de los datos estadísticamente se puede ver en la Figura 32.

Cuadro 9. Porcentaje por microorganismo encontrado en el agua de mar – zona de bombeo . Laboratorio Aqualab

MICROORGANISMO	Cantidad total encontrada de microorganismos	PORCENTAJE (%)
<i>v. alginoliticus</i>	1	33.3
<i>v. vulnificus</i>	1	33.3
<i>V. fischeri</i>	1	33.3
<i>Staphylococcus spp</i>	0	0
<i>Estreptococcus spp</i>	0	0
Total de especies	3	100 %

El cuadro 9, muestra predominante al género *Vibrio* (100 %). De acuerdo al cuadro estuvieron presentes tres especies en igual porcentaje en la muestra tomada al agua de mar. No hubo presencia de bacterias Gram-positivas. La interpretación de los datos se puede ver en la Figura 33.

Figura 32. Porcentaje de microorganismos en el tanque 30. Laboratorio Aqualab.

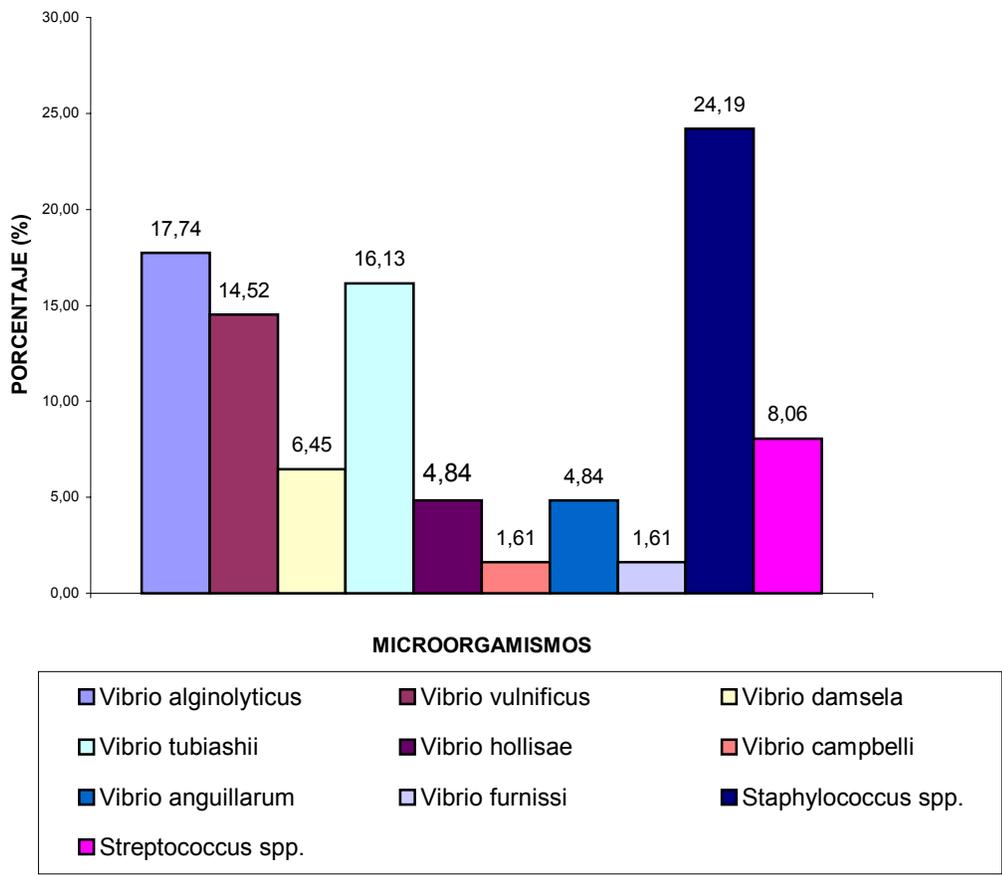
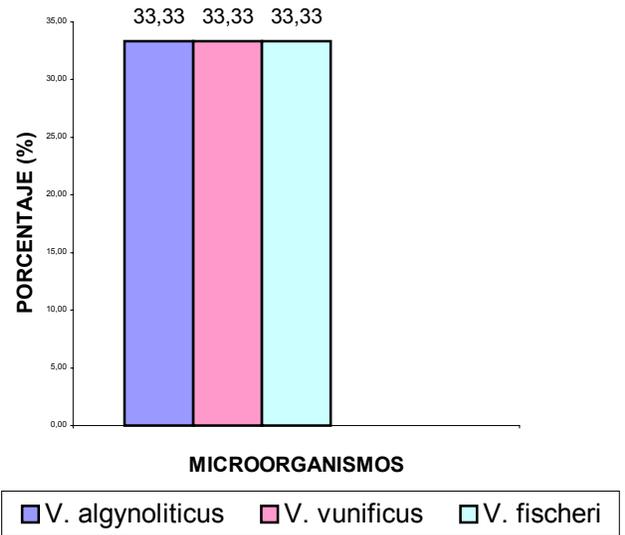


Figura 33. Porcentaje de microorganismos en el agua de mar – zona de bombeo. Laboratorio Aqualab.



Cuadro 10. Porcentaje por microorganismo encontrado en la cisterna de larvicultura. Laboratorio Aqualab

MICROORGANISMO	Cantidad total encontrada de microorganismos	PORCENTAJE (%)
<i>Vibrio tubiashii</i>	4	19,05
<i>Vibrio damsela</i>	3	14,29
<i>Vibrio alginolyticus</i>	3	14,29
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2	9,52
<i>Vibrio vulnificus</i>	2	9,52
<i>Vibrio fischeri</i>	1	4,76
<i>Vibrio furnissii</i>	1	4,76
<i>Aeromona sp</i>	2	9,52
<i>Staphylococcus spp</i>	2	9,52
<i>Streptococcus spp</i>	1	4,76
Total de especies	21	100 %

El cuadro 10, muestra que el género predominante es el *Vibrio* 76.18 % frente al género *Aeromona spp.* 9.53 %. Las especies mas frecuentes en la cisterna fueron el *Vibrio tubiashii* (19.05 %) seguida de las especies *Vibrio damsela* y *Vibrio alginolyticus* con el 14.29 % para cada una. Para las bacterias Gram-positivas los *Staphylococcus spp.* representaron el mayor porcentaje (9.52 %). La interpretación de los datos se puede ver en la Figura 34.

Cuadro 11. Porcentaje por microorganismo encontrado en el agua de los nauplios de los laboratorios de maduración Macrobio y Centinela, previo a la siembra en el Laboratorio Aqualab.

MICROORGANISMO	Cantidad total encontrada de microorganismos	PORCENTAJE (%)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	11,11
<i>Vibrio furnissii</i>	1	11,11
<i>Aeromona sp</i>	1	11,11
<i>Vibrio tubiashii</i>	2	22,22
<i>Vibrio alginolyticus</i>	2	22,22
<i>Staphylococcus spp</i>	2	22,22
<i>Streptococcus spp</i>	0	
Total de especies	9	100 %

El cuadro 11, muestra como al género predominante el *Vibrio* 66.66 % frente al género *Aeromona spp.* (11.11 %). Las especies mas frecuentes en el agua de los nauplios fueron *Vibrio tubiashii* y *Vibrio alginolyticus* con el 22.22 % cada una.

Para las bacterias Gram-positivas los *Staphylococcus spp.* representaron el mayor porcentaje (22.22%). La interpretación de los datos se puede ver en la Figura 35.

Cuadro 12. Porcentaje por microorganismo encontrado en el agua del masivo de algas. Laboratorio Aqualab

MASIVO DE ALGAS

MICROORGANISMO	Cantidad total encontrada de microorganismos	PORCENTAJE (%)
<i>Vibrio anguillarum</i>	3	21,43
<i>Vibrio furnissii</i>	1	7,14
<i>Vibrio alginolyticus</i>	2	14,29
<i>Vibrio tubiashii</i>	4	28,57
<i>Estafilococos</i>	4	28,57
<i>Estreptococo</i>	0	
Total de especies	14	100 %

El cuadro 12, muestra que el género predominante es el *Vibrio* 71.43 %. Las especies mas frecuentes en el masivo fueron el *Vibrio tubiashii* (28.57 %) seguida de la especie *Vibrio anguillarum* (21.43 %). Para las bacterias Gram-positivas los *Staphylococcus spp.* representaron el mayor porcentaje (28.57 %). La interpretación de los datos se puede ver en la Figura 36

Figura 34. Porcentaje de microorganismos en la cisterna de larvicultura. Laboratorio Aqualab.

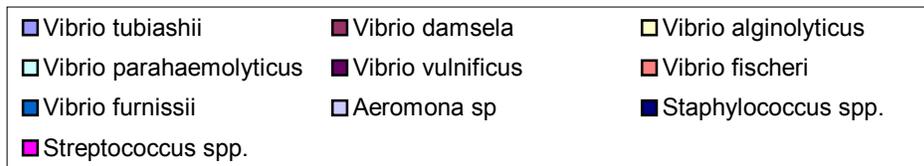
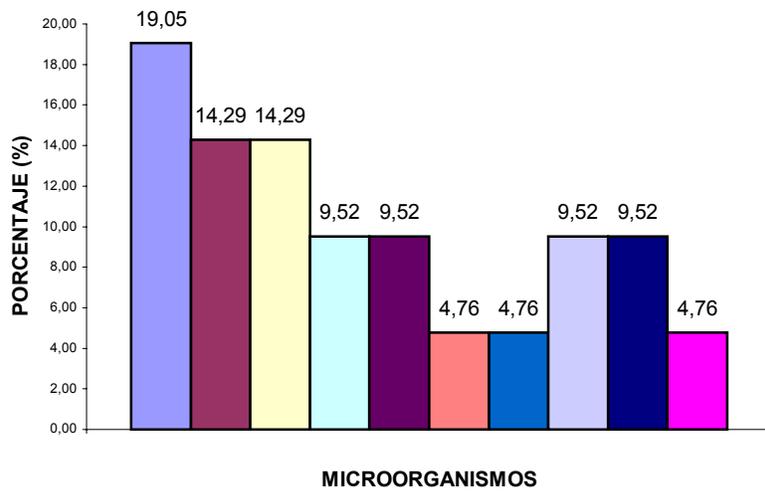
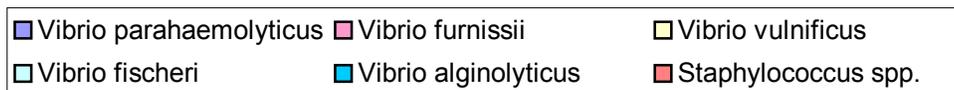
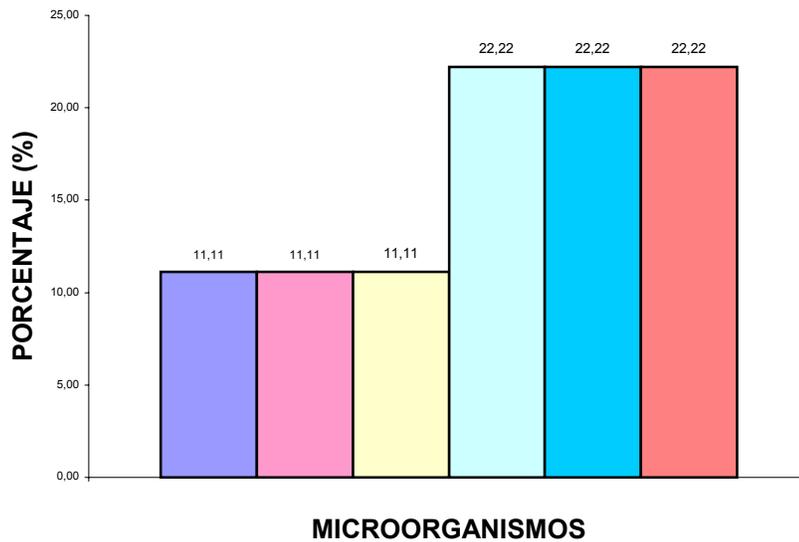


Figura 35. Porcentaje de microorganismos en el agua de los nauplios previo a la siembra. Laboratorio Aqualab.



De acuerdo a los resultados obtenidos en los muestreos de los tanques del Laboratorio Aqualab, el *Vibrio tubiashii*, es la especie que se presenta con mayor frecuencia en todos los tanques evaluados con el 20.75 %, seguida por del *Vibrio fischeri* con el 15.72 % y *Vibrio alginolyticus* con el 12.58 %. (Ver Figura 37). Con respecto al grupo bacteriano, las bacterias Gram negativas fueron más representativas en todos los tanques con el 65.41 %. (Ver Figura 38)

Figura 36. Porcentaje de microorganismos en el agua del masivo de algas, previo a la siembra. Laboratorio Aqualab.

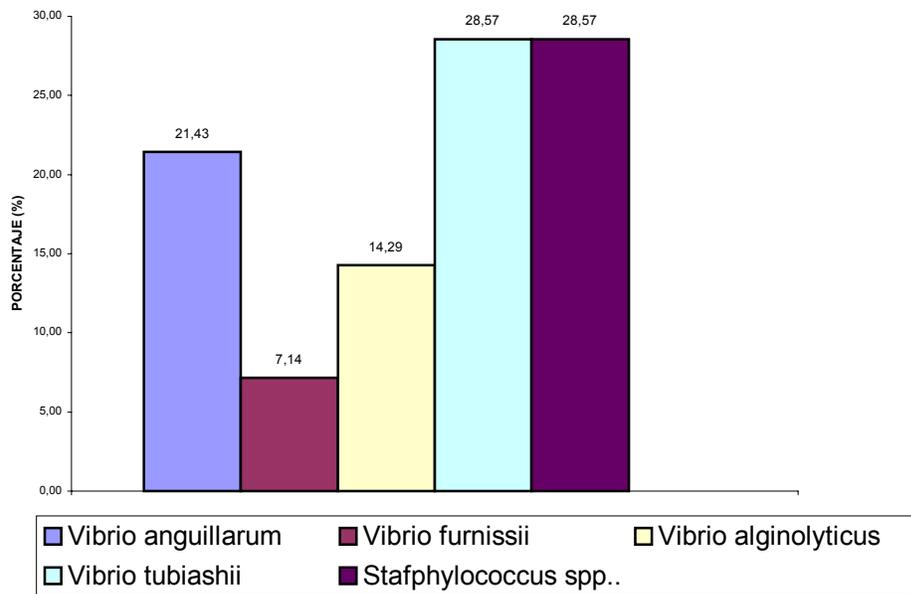


Figura 37. Porcentaje de microorganismos totales en los tanques de larvicultura en el Laboratorio Aqualab.

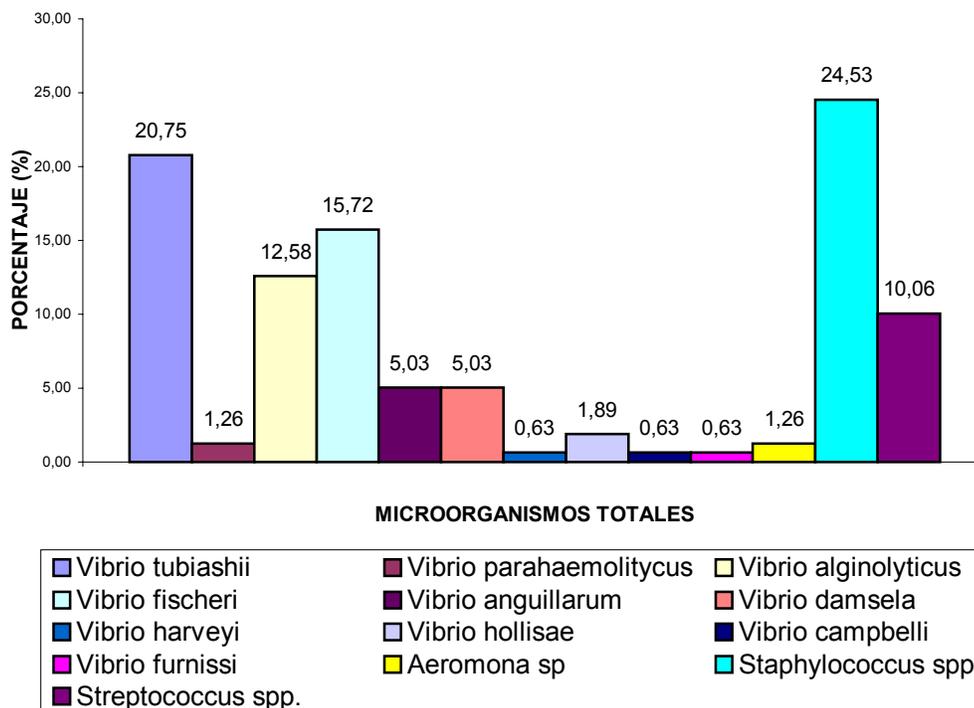
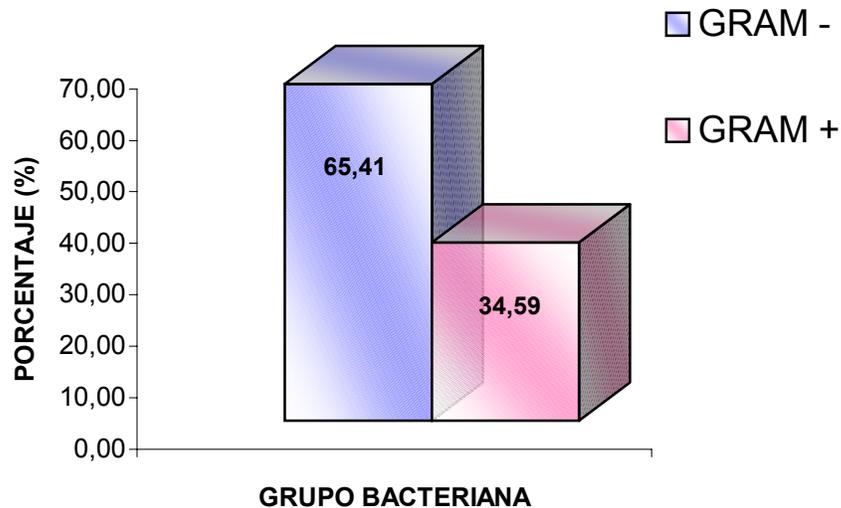


Figura 38. Porcentaje de bacterias Gram negativas y Gram positivas en los tanques de larvicultura en el Laboratorio Aqualab.



Al respecto, Zherdmant⁵⁸ afirma que, en cada caso reportado de infecciones bacteriales en camarón peneido, se han aislados bacilos fermentativos, móviles, gram negativos y oxidasa positivos, siendo la mayoría de las especies aisladas *Vibrio spp.* Entre otros bacilos gram negativos encontrados están los géneros *Pseudomonas spp.* y *Aeromona spp.* que pueden estar ocasionalmente involucrados en enfermedades de síndrome bacterial en camarón, que para esta investigación únicamente fue identificada un solo microorganismo de *Aeromona spp.*

Por otra parte, Intriago⁵⁹ demostró que dentro del ciclo normal, se presenta una gran variedad bacteriana; dentro de las especies analizadas se identificaron bioquímicamente nueve especies, siendo el *Vibrio fischeri* (15.5 %), *Vibrio tubiashii* (15.5 %), *Vibrio anguillarum* (11.5 %) y *Vibrio alginolyticus* (9.8 %), las mas frecuentes en el transcurso de la investigación.

De acuerdo a los datos obtenidos por el autor anteriormente mencionado, podemos decir que tienen una similitud con los datos obtenidos en la investigación

⁵⁸ ZHERDMANT, María Teresa. Caracterización de una cepa de *Vibrio harveyi* considerada agente causal del Síndrome de bolitas en larvas de *Penaeus vannamei*, y estudio de la interacción *in Vitro* con una cepa *Vibrio alginolyticus* utilizada como probiótico. Guayaquil, 1996, 37 p. Trabajo de grado (Ingeniero Acuacultor). Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar.

⁵⁹ INTRIAGO. Walter. Op. Cit., p. 44- 45- 46.

realizada en el laboratorio Aqualab. Sin embargo, el *Vibrio tubiashii* fue la especie con mayor ocurrencia.

Por el contrario, en la investigación de Ne`der⁶⁰ los resultados reportados difieren con los encontrados en esta investigación, ya que el 47.98 % de las bacterias encontradas, corresponde al género *Acinetobacter spp.*, el 37.93 %, correspondió a *Citophaga spp.*, el 25.90 % es *Vibrio algosus* y el 17.68 % correspondió a *Vibrio parahaemolyticus*.

De acuerdo con Berthe⁶⁴ un estudio realizado en Colombia por el Centro Oceanográfico del Pacífico, reporta que las especies encontradas en los laboratorios de la costa Pacífica más comunes son: *Vibrio tubiashii*, *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio spp*, coincidiendo con las especies encontradas en la investigación.

Con respecto a las bacterias gram positivas, los resultados obtenidos muestran al género *Staphylococcus spp*, como el microorganismo que más prevaleció a diferencia del *Streptococcus spp*.

De acuerdo con Carvaca⁶² debido a las elevadas concentraciones de sal que se incorporan al medio selectivo CHAPMAN, permite el crecimiento único de microorganismos halófilos, entre los que se encuentran el género *Staphylococcus spp.*, lo que se confirma por la constante aparición de colonias con tonalidades amarillas, amarillas pálidas y blancas.

Por otra parte Clinton⁶³ afirma que las bacterias gram positivas en el agua de mar, parecen estar limitadas a hábitats protegidos, como son, los sedimentos, donde existe una alta concentración de materia orgánica.

Esta afirmación se demostró, en los ensayos realizados al agua de mar en la zona de bombeo, donde no hubo crecimiento de bacterias gram positivas, ya que la

⁶⁰ NE`DER, María de Lourdes. Determinación de los principales tipos de bacterias que afectan el cultivo de larvas de *Penaeus vannamei*, en sus diferentes estadios larvales. Guayaquil, 1989, p. 70- 71- 72- 73- 74- 75- 76- 77. Trabajo de grado (Ingeniero Acuacultor). Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar.

⁶⁴ BERTHE, Frank et al. Nuevo concepto de la bacteriología de las crías larvarias: Estructura y dinámica de las poblaciones bacterianas. En Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. (1o. : 1992 : Guayaquil). Memorias del I Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. Guayaquil : Escuela Superior Politécnica del Litoral, 1992. 199 p.

⁶² CARVACA, Fernando. Op. Cit., 15 p.

⁶³ CLINTON, Dawes. Botánica Marina. México D.F: Noriega – LIMUSA, 1986. 642 p.

muestra fue tomada en la superficie, cerca de la tubería de succión, donde no hay oleaje fuerte, por lo tanto la sedimentación es menor.

Retomando lo afirmado por Clinton, tanto en el agua de los tanques como en la cisterna, masivo de algas y agua de los nauplios, la presencia del género *Staphylococcus spp.*, se debe a la alta de concentración de materia orgánica, representada en excremento de las larvas y alimento no consumido.

6.2 UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC) EN EL LABORATORIO AQUALAB

Para el conteo de las colonias formadas en el medio Plate Count agar, se tuvo en cuenta la tabla para el recuento de colonias (ver Anexo H).

Cuadro 13. Medio Plate Count para determinar unidades formadoras de colonias (UFC), Tanque 23. Laboratorio Aqualab.

FECHA MUESTREO	MUESTRA	DILUCIÓN	PROMEDIO DE UFC/ml de mesófilos aerobios
4-Oct-04	Antes de la siembra	10^{-1}	50×10^1
4-Oct-04	Después de la siembra	10^{-1}	61×10^1
9-Oct-04	Superficie	10^{-2}	11×10^3
9-Oct-04	Fondo	10^{-2}	34×10^2
15-Oct-04	Superficie Antes de Transferencia	10^{-1}	60×10^1
15-Oct-04	Fondo Antes de Transferencia	10^{-1}	95×10^1
15-Oct-04	Superficie después de transferencia	10^{-1}	69×10^1
15-Oct-04	Fondo después de transferencia	10^{-1}	71×10^1
20-Oct-04	Superficie	10^{-1}	13×10^2
20-Oct-04	Fondo	10^{-1}	89×10^1

Cuadro 14. Medio Plate Count para determinar unidades formadoras de colonias (UFC). Tanque 24. Laboratorio Aqualab.

FECHA MUESTREO	MUESTRA	DILUCIÓN	PROMEDIO DE UFC/ml de mesófilos aerobios
4-Oct-04	Antes de la siembra	10^{-1}	42 x 10¹
4-Oct-04	Después de la siembra	10^{-1}	58 x 10¹
9-Oct-04	Superficie	10^{-2}	17 x 10²
9-Oct-04	Fondo	10^{-2}	21 x 10¹
15-Oct-04	Superficie Antes de transferencia	10^{-1}	45 x 10¹
15-Oct-04	Fondo Antes de transferencia	10^{-1}	98 x 10¹
15-Oct-04	Superficie Después de transferencia	10^{-1}	54 x 10¹
15-Oct-04	Fondo Después de transferencia	10^{-1}	62 x 10¹
20-Oct-04	Superficie	10^{-1}	12 x 10²
20-Oct-04	Fondo	10^{-1}	89 x 10¹

Cuadro 15. Medio Plate Count para determinar unidades formadoras de colonias (UFC). Tanque 29. Laboratorio Aqualab.

FECHA MUESTREO	MUESTRA	DILUCIÓN	PROMEDIO DE UFC/ml de mesófilos aerobios
4-Oct-04	Antes de la siembra	10^{-1}	42 x 10¹
4-Oct-04	Después de la siembra	10^{-1}	53 x 10¹
9-Oct-04	Superficie	10^{-2}	12 x 10²

9-Oct-04	Fondo	10 ⁻¹	57 x 10¹
15-Oct-04	Superficie Antes de transferencia	10 ⁻¹	69 x 10¹
15-Oct-04	Fondo Antes de transferencia	10 ⁻¹	95 x 10¹
15-Oct-04	Superficie Después de transferencia	10 ⁻¹	64 x 10¹
15-Oct-04	Fondo Después de transferencia	10 ⁻¹	78 x 10¹
20-Oct-04	Superficie	10 ⁻¹	87 x 10¹
20-Oct-04	Fondo	10 ⁻¹	10 x 10²

Continuación cuadro 15

Cuadro 16. medio Plate Count para determinar unidades formadoras de colonias (UFC). Tanque 30. Laboratorio Aqualab.

FECHA MUESTREO	MUESTRA	DILUCIÓN	PROMEDIO DE UFC/ml de mesófilos aerobios
4-Oct-04	Antes de la siembra	10 ⁻¹	68 x 10¹
4-Oct-04	Después de la siembra	10 ⁻¹	81 x 10¹
9-Oct-04	Superficie	10 ⁻²	12 x 10²
9-Oct-04	Fondo	10 ⁻¹	45 x 10¹
15-Oct-04	Superficie Antes de transferencia	10 ⁻¹	50 x 10¹
15-Oct-04	Fondo Antes de transferencia	10 ⁻¹	98 x 10¹
15-Oct-04	Superficie Después de transferencia	10 ⁻¹	58 x 10¹
15-Oct-04	Fondo Después de transferencia	10 ⁻¹	79 x 10¹

20-Oct-04	Superficie	10^{-1}	60×10^1
20-Oct-04	Fondo	10^{-1}	10×10^2
24-Oct-04	Superficie	10^{-2}	18×10^2
24-Oct-04	Fondo	10^{-2}	11×10^2

Continuación cuadro 16

En cuanto al comportamiento presentado por las colonias para los tanques evaluados, los contajes totales de (UFC/ml.) fueron similares, presentándose inicialmente valores bajos, para el día uno, ya que el primer muestreo de agua, se hizo antes de la siembra de los nauplios, a un volumen de 9 toneladas, incrementándose levemente en la muestra tomada después de la siembra, a esto se suma, el periodo de secado y desinfección que se somete a los tanques y en general al laboratorio, con el fin de evitar focos de contaminación; estos valores se incrementan notoriamente en el día dos de muestreo, lo que equivale al paso del estadio zoea III al estadio mysis I en la corrida.

Hasta este periodo a los tanques se les incrementa un porcentaje de agua diario hasta completar 13 toneladas, que es el volumen máximo de agua; esto se hace con el fin de disminuir la materia orgánica que se forma en el tanque, producto de los deshechos de las larvas, las cuales se alimentan de forma exógena desde que mudan del estadio nauplio v a zoea I, y por el alimento que diariamente se suministra y no es evacuado del tanque.

Posteriormente se hace recambios diarios de agua (bajando de 3 a 4 toneladas e incrementando la misma cantidad, con agua de mar y dulce e inoculando volúmenes de algas), esto hace que los valores de UFC/ml. disminuyan para el día tres de muestreo, que es cuando se realiza la transferencia de los animales; por último estos valores incrementa moderadamente para los días cuatro y cinco de muestreo, próximos a la cosecha de las larvas, esto se debe a que los animales demandan cantidades mayores de alimento, ya que se encuentran en etapa de desarrollo y a su vez el porcentaje de deshechos es mayor, aumentando así los focos de contaminación en el tanque.

Ne´der⁶⁴ reporta que, los contajes totales de UFC/ml en el agua de los tanques, son inicialmente muy bajos, y presentan un incremento en los días cinco y seis de la corrida, que corresponde al paso de zoea III a mysis I, disminuyendo luego el día siete de la corrida, para empezar nuevamente a incrementarse, a partir de este

⁶⁴ NE´DER, María de Lourdes. Op. Cit., p. 77- 78.

día, significativamente desde el día diez, y presentando un pico el día catorce, una disminución en el día quince y nuevamente un incremento.

De acuerdo con lo reportado por este autor, se puede afirmar que los datos reportados en la investigación concuerdan claramente con los datos del autor mencionado.

Según el estudio realizado en Colombia por Berthe⁶⁵ la evolución de la flora bacteriana total, encontrada en los tanques de larvicultura en la costa Pacífica, la cantidad de bacterias aumenta lenta y regularmente entre los días uno y cuatro de la corrida, aumenta rápidamente entre los días cuatro y cinco de corrida, luego el nivel bacteriano se estabiliza hasta el día trece de corrida. En todos los tanques monitoreados, la flora bacteriana actúa de manera sincrónica. Este reporte presenta una similitud con lo encontrado en los tanques evaluados. (ver Anexo 1 y 2)

6.3 SOBREVIVENCIA LARVAL SEGÚN CANTIDAD DE MICROORGANISMOS EN EL LABORATORIO AQUALAB

En el laboratorio, la sobrevivencia larval, es evaluada en dos periodos de la corrida, el primero se realiza en la transferencia y el segundo en la cosecha. Con respecto a la carga bacteriana, se evaluó los microorganismos encontrados por cada periodo, de acuerdo a como se maneja la sobrevivencia larval. (Ver Anexo P)

Cuadro 17. Sobrevivencia larval según cantidad de microorganismos. Tanque 23

ESPECIES ENCONTRADAS POR PERIODO	PERIODO EVALUADO POR CORRIDA			
	% Siembra a Transferencia	%Transferencia a cosecha	% sobrevivencia larval (S a T)	% sobrevivencia larval (T a C)
<i>Vibrio tubiashii</i>	30	25	79 %	71.9 %
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3,33			
<i>Vibrio alginolyticus</i>	3,33			
<i>Vibrio fischeri</i>	26,67	25		
<i>Vibrio anguillarum</i>	13,33	12,5		
<i>Vibrio damsela</i>		12,5		
<i>Staphylococcus spp.</i>	16,67	12,5		

⁶⁵ BERTHE, Frank et al. Op. Cit., 199 p.

<i>Streptococcus spp.</i>	6,67	12,5		
---------------------------	------	------	--	--

El Cuadro 17, muestra que en el periodo de siembra a transferencia, el porcentaje de sobrevivencia larval fue de 79 %; con respecto a los microorganismos, los más representativos fueron: *V. tubiashii* (30 %), *V. fischeri* (26.67 %) y *V. anguillarum* (13.33 %), para el primer periodo; en la segunda fase de transferencia a cosecha, la sobrevivencia fue del 71.9 % y los microorganismos más representativos fueron *V. tubiashii* y *V. fischeri* con el 25 % cada uno.

En el primer periodo se presentó una mortalidad de 21 % y en el segundo periodo de 28.1 % disminuyendo en un 7.1 % desde la transferencia hasta la cosecha, siendo este un porcentaje bajo dentro del cultivo: Sin embargo, los porcentajes de los microorganismos en los dos periodos no disminuyeron drásticamente, aunque dos especies no reaparecieron, se presentó una nueva especie (*V. damsela*) con un porcentaje considerable (12.5 %), pese a esto la mortalidad no fue significativa.

Cuadro 18. Sobrevivencia larval según cantidad de microorganismos. Tanque 24

ESPECIES ENCONTRADAS POR PERIODO	PERIODO EVALUADO POR CORRIDA			
	% Siembra a Transferencia	%Transferencia a cosecha	% sobrevivencia larval (S a T)	% sobrevivencia larval (T a C)
Vibrio tubiashii	9,09	23,08	77.1 %	70 %
Vibrio alginolyticus	18,18	15,38		
<i>Vibrio fischeri</i>	12,12			
<i>Vibrio anguillarum</i>		7,69		
<i>Vibrio damsela</i>	6,06			
Vibrio vulnificus	21,21			
<i>Aeromona sp</i>	3,03	7,69		
Staphylococcus spp.	21,21	30,77		
<i>Streptococcus spp.</i>	9,09	15,38		

El Cuadro 18, muestra que en el periodo de siembra a transferencia, el porcentaje de sobrevivencia larval fue de 77.1 %; con respecto a los microorganismos, los más representativos fueron: *V. vulnificus* (21.21 %) y *V. alginolyticus* (18.18 %), para el primer periodo; en la segunda fase de transferencia a cosecha, la sobrevivencia fue del 70 % y los microorganismos más representativos fueron *V. tubiashii* (23.08 %) y *V. alginolyticus* con el 15.38 %.

En el primer periodo se presentó una mortalidad de 22.9 % y en el segundo periodo de 30 % disminuyendo en un 7.1 % desde la transferencia hasta la cosecha, siendo este un porcentaje bajo dentro del cultivo: Sin embargo, los porcentajes de los microorganismos en los dos periodos no disminuyeron drásticamente, aunque tres especies no reaparecieron, se presentó una nueva especie (*V. anguillarum*), pese a esto la mortalidad no fue significativa.

Cuadro 19. Supervivencia larval según cantidad de microorganismos. Tanque 29

ESPECIES ENCONTRADAS POR PERIODO	PERIODO EVALUADO POR CORRIDA			
	% Siembra a Transferencia	%Transferencia a cosecha	% supervivencia larval (S a T)	% supervivencia larval (T a C)
Vibrio tubiashii	10,34	60	80.6 %	78.7 %
Vibrio alginolyticus	10,34			
Vibrio fischeri	37,93			
<i>Vibrio harveyi</i>	13,79	20		
<i>Staphylococcus spp.</i>	20,69	20		
<i>Streptococcus spp.</i>	6,90			

El Cuadro 19, muestra que en el periodo de siembra a transferencia, el porcentaje de supervivencia larval fue de 80.6 %; con respecto a los microorganismos, los más representativos fueron: *V. fischeri* (37.93 %), *V. tubiashii* y *V. alginolyticus* con el 10.34 % cada uno, para el primer periodo; en la segunda fase de transferencia a cosecha, la supervivencia fue del 78.7 % y el microorganismo representativo fue *V. tubiashii* (60 %).

En el primer periodo se presentó una mortalidad de 19.4 % y en el segundo periodo de 21.3 % disminuyendo en un 1.9 % desde la transferencia hasta la cosecha, siendo este un porcentaje mínimo dentro del cultivo: Sin embargo, los porcentajes de los microorganismos en los dos periodos incrementaron drásticamente, aunque dos especies no reaparecieron, pese a esto la mortalidad no fue representativa.

Cuadro 20. Supervivencia larval segun cantidad de microorganismos. Tanque 30

ESPECIES ENCONTRADAS POR PERIODO	PERIODO EVALUADO POR CORRIDA			
	% Siembra a Transferencia	%Transferencia a cosecha	% supervivencia larval (S a T)	% supervivencia larval (T a C)
Vibrio tubiashii	12,12	21,43	79.7 %	76.7 %
Vibrio alginolyticus	21,21	14,29		
<i>Vibrio anguillarum</i>	9,09			
<i>Vibrio damsela</i>	3,03	7,14		
Vibrio vulnificus	12,12	17,86		
<i>Vibrio hollisae</i>	3,03	7,14		
<i>Vibrio campbelli</i>	3,03			
<i>Vibrio furnissii</i>	3,03			
Staphylococcus spp.	24,24	25		
<i>Streptococcus spp.</i>	9,09	7,14		

El Cuadro 20, muestra que en el periodo de siembra a transferencia, el porcentaje de supervivencia larval fue de 79.9 %; con respecto a los microorganismos, los mäs representativos fueron: *V. alginolyticus* (21.21 %), *V. tubiashii* y *V. vulnificus* con el 12.12 % cada uno, para el primer periodo; en la segunda fase de transferencia a cosecha, la supervivencia fue del 76.7 % y los microorganismos mäs representativos fueron: *V. tubiashii* (21.43 %), *V. vulnificus* (17.86 %) y *V. alginolyticus* (14.29.)

En el primer periodo se present6 una mortalidad de 20.3 % y en el segundo periodo de 23.3 % disminuyendo en un 3 % desde la transferencia hasta la cosecha, siendo este un porcentaje mınimo dentro del cultivo: Sin embargo, los porcentajes de los microorganismos en los dos periodos incrementaron a excepci6n del *V. alginolyticus* que disminuy6, aunque tres especies no reaparecieron, pese a esto la mortalidad no fue representativa.

6.4 GNERO Y ESPECIES ENCONTRADAS EN EL LABORATORIO JOHN WILLIAM

Los resultados obtenidos para esta variable, se evaluaron inicialmente de acuerdo a la morfologıa de las colonias (ver figura 1) encontradas por cada tanque muestreado: Tanque 7 (ver anexo K) y tanque 21 (ver anexo M).

Para la identificación de la especie bacteriana se realizó pruebas bioquímicas y se interpretó de la misma forma que el Laboratorio Aqualab, de acuerdo a los manuales de Concepto Azul y Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Tanque 7 (ver anexo P), y tanque 21 (ver anexo Q).

Identificadas las especies, se evaluó en porcentaje a cada una, de acuerdo a la frecuencia con que aparecían en cada tanque analizado, en el masivo de algas y en el agua de los nauplios previo a ser sembrados.

Cuadro 21. Porcentaje por microorganismo encontrado en el tanque 7. Laboratorio John William

Microorganismo	Cantidad total encontrada de microorganismos	Porcentaje (%)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	6	13,64
<i>Vibrio tubiashii</i>	7	15,91
<i>Vibrio vulnificus</i>	3	6,82
<i>Vibrio hollisae</i>	7	15,91
<i>Vibrio damsela</i>	7	15,91
<i>Staphylococcus spp</i>	11	25,00
<i>Streptococcus spp</i>	3	6,82
Total de especies	44	100 %

El Cuadro 21, muestra que el género predominante es el *Vibrio* 68.18 % y las especies más frecuentes en este tanque fueron: *Vibrio tubiashii*, *Vibrio hollisae* y *Vibrio damsela*, cada una con el 15.91 % y en segundo lugar están el *Vibrio alginolyticus* con el 13.64 %. Para las bacterias Gram-positivas, los *Staphylococcus spp.* se presentaron el mayor porcentaje (25 %). La interpretación de los datos se puede ver en la Figura 39 .

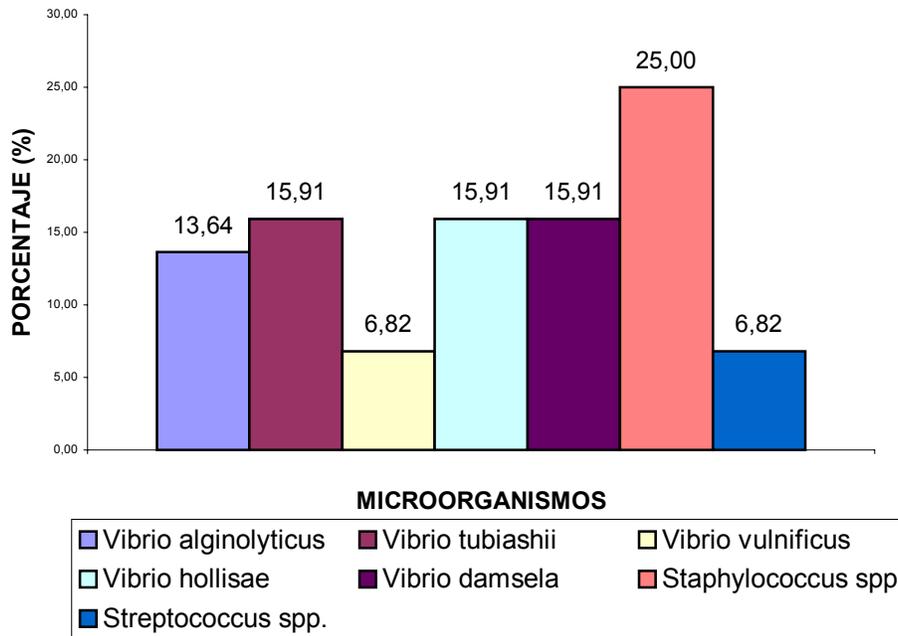
Cuadro 22. Porcentaje por microorganismo encontrado en el tanque 21. Laboratorio John William

Microorganismo	Cantidad total encontrada de microorganismos	Porcentaje (%)
<i>Vibrio tubiashii</i>	9	19,15
<i>Vibrio vulnificus</i>	5	10,64
<i>Vibrio damsela</i>	10	21,28
<i>Vibrio alginolyticus</i>	6	12,77
<i>Vibrio furnissii</i>	2	4,26
<i>Vibrio fischeri</i>	2	4,26
<i>Staphylococcus spp.</i>	11	23,40

<i>Streptococcus spp.</i>	2	4,26
Total de especies	47	100 %

El Cuadro 22, muestra como el género predominante es el *Vibrio* 72.34 % y las especies más frecuentes en este tanque fueron el *Vibrio damsela* (21.28 %), y *Vibrio tubiashii* (19.15 %) y *Vibrio alginolyticus* (12.77 %). Para las bacterias Gram-positivas, los *Staphylococcus spp.* se presentaron el mayor porcentaje (23.40 %). La interpretación de los datos se puede ver en la Figura 40.

Figura 39. Porcentaje de microorganismos en el tanque 7. Laboratorio John William



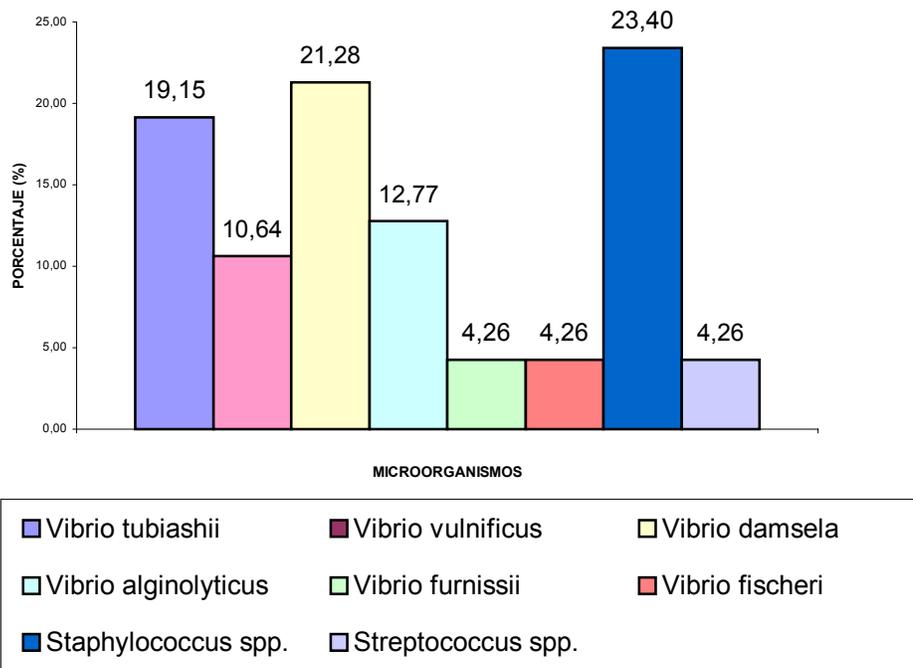
Cuadro 23. Porcentaje por microorganismo encontrado en el agua de los nauplios de los Laboratorios de Maduración Macrobio y Centinela previo a la siembra en el Laboratorio John William.

Microorganismo	Cantidad total encontrada de microorganismos	Porcentaje (%)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	2	20
<i>Vibrio vulnificus</i>	2	20
<i>Vibrio tubiashii</i>	2	20
<i>Vibrio damsela</i>	1	10
<i>Staphylococcus spp.</i>	2	20

<i>Streptococcus spp.</i>	1	10
Total de especies	10	100 %

El Cuadro 23, muestra como el género predominante es el *Vibrio* 70 % y las especies más frecuentes fueron el *Vibrio alginolyticus* *Vibrio vulnificus* y *Vibrio tubiashii*, con el 20 % cada uno. Para las bacterias gram-positivas, los *Staphylococcus spp.* se presentaron el mayor porcentaje (20 %). La interpretación de los datos se puede ver en la Figura 41 .

Figura 40. Porcentaje de microorganismos en el tanque 21. Laboratorio John William.



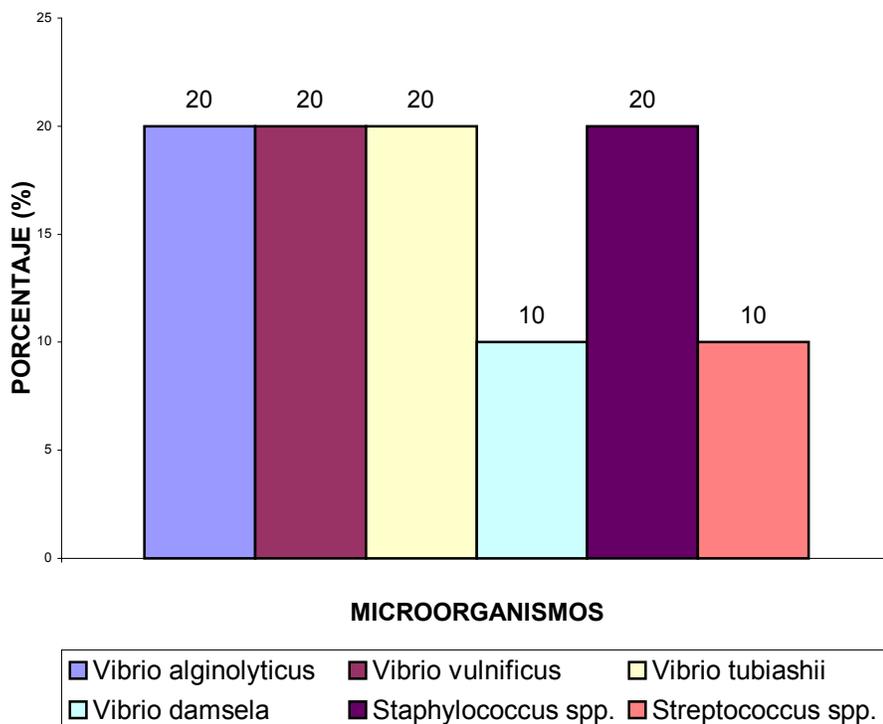
Cuadro 24. Porcentaje por microorganismo encontrado en el agua del masivo de algas en el Laboratorio John William.

Microorganismo	Cantidad total encontrada de microorganismos	Porcentaje (%)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	3	13,64
<i>Vibrio vulnificus</i>	2	9,09
<i>Vibrio damsela</i>	5	22,73
<i>Vibrio tubiashii</i>	3	13,64
<i>Vibrio furnissi</i>	1	4,55

<i>Vibrio anguillarum</i>	1	4,55
<i>Staphylococcus spp.</i>	4	18,18
<i>Streptococcus spp.</i>	3	13,64
Total de especies	22	100 %

El Cuadro 24, muestra como el género predominante es el *Vibrio* 68.18 % y las especies más frecuentes fueron el *Vibrio damsela* con 22.73 % seguido de los *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio tubiashii*, con 13.64 % cada uno. Para las bacterias Gram-positivas, los *Staphylococcus spp.* se presentaron el mayor porcentaje con el 13.64 %. La interpretación de los datos se puede ver en la Figura 42.

Figura 41. Porcentaje de microorganismos encontrados en el agua de los nauplios de los Laboratorios de Maduración Macrobio y Centinela previo a la siembra en el Laboratorio John William.

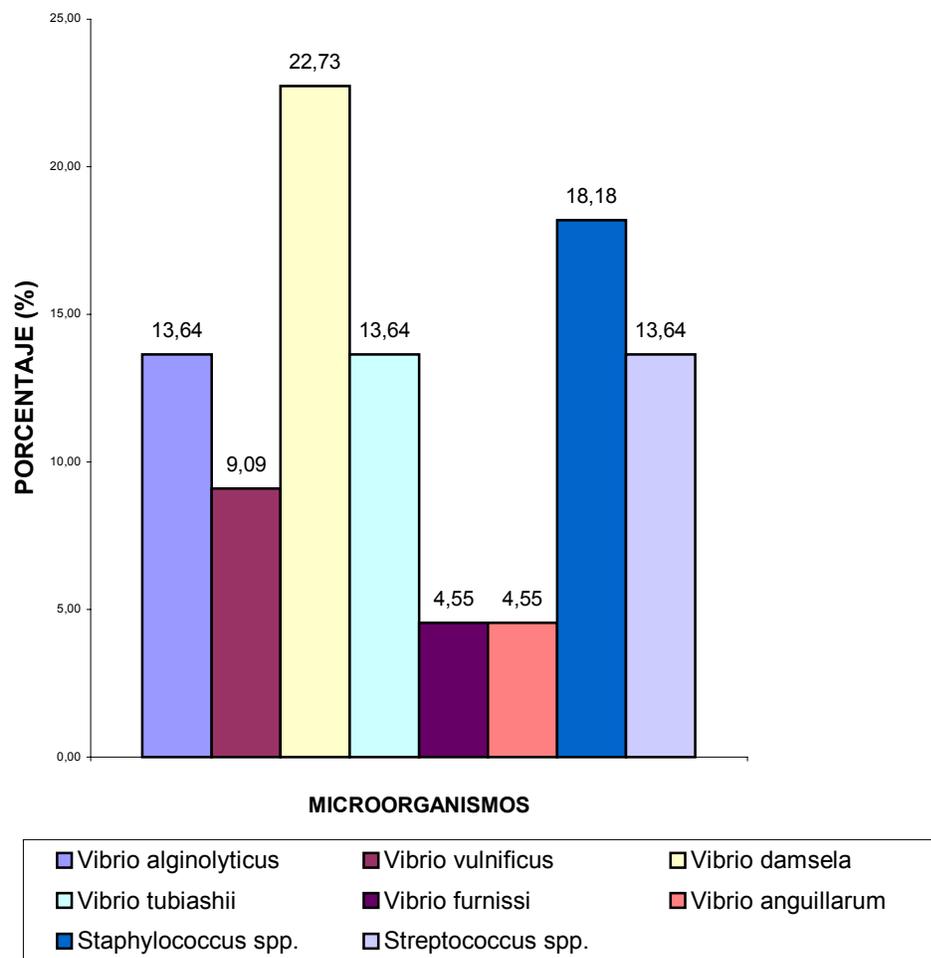


De acuerdo a los resultados obtenidos en los muestreos de los tanques del Laboratorio John William, el *Vibrio damsela* (19.10 %), *Vibrio tubiashii* (17.98 %) y *Vibrio alginolyticus* (13.48 %), son las especies que se presentan con mayor frecuencia en los tanques evaluados, es necesario destacar la presencia del *Vibrio hollisae* (7.87 %), identificado en el tanque 7, la cual se había hecho presente en

baja cantidad en anteriores muestreos, específicamente en el tanque 30 del laboratorio Aqualab. (Ver Figura 43).

Según Soluap⁶⁵ afirma que las bacterias gram negativas, predominan en el ambiente marino y usualmente constituyen la mayoría de las bacterias que normalmente se presentan, en la microflora asociada a los camarones silvestres y de cultivo. En la investigación planteada, se pudo comprobar dicha afirmación. (Ver Figura 44).

Figura 42. Porcentaje por microorganismo encontrado en el agua del masivo de algas previo a la siembra en el Laboratorio John William.



⁶⁵ SOLUAP, Ener. Op. Cit., 162 p.

Según Montaña⁶⁶ las bacterias Gram negativas, son mayoritarias, en los ambientes marinos y regularmente, constituyen la mayor parte de la flora intestinal de los crustáceos. Un gran número de bacterias han sido implicadas como causantes de enfermedad y mortalidad, en peneidos cultivados, especialmente en estadios de larvas, postlarvas y juveniles. Este mismo autor aseguró que entre las bacterias gram negativas que causan enfermedades en crustáceos marinos, predominan los miembros de la familia *Vibrionaceae*, principalmente el *Vibrio spp.*

Tomando la investigación realizada como rutina de laboratorios de larvas de *P. Vannamei*, hecha por Siabichay⁶⁷ identifico bioquímicamente 266 cepas de las cuales el *V. tubiashii*, representaron el 35 %, *V. vulnificus* 21.7 %, el 13.3 % lo constituye el *V. damsela* y el 5 % el *V. hollisae*.

De acuerdo a los datos obtenidos por el autor anteriormente mencionado, el *V. tubiashii*, es la especie más representativa en los tanques muestreados, lo que concuerda con los datos obtenidos en el laboratorio John William. Por otra parte, retomando los datos del mismo autor, el *Vibrio damsela* tiene una representación similar a los datos obtenidos en John William. Con respecto al *Vibrio hollisae*, se encontró un diferencia con el autor, ya que esta especie represento el 15.38 %, manifestándose en los muestreos hechos a uno de los tanques evaluados.

⁶⁶ MONTAÑO, John. Op. Cit., 4 p.

⁶⁷ SIABICHAY, Kléber. Aplicación de nuevas técnicas para el requerimiento bacteriológico en un laboratorio de larvas de camarón. Guayaquil, 1997, p 49 - 50. Trabajo de grado (Ingeniero Acuacultor). Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar.

Figura 43. Porcentaje de microorganismos totales encontrados en los tanques de larvicultura en el Laboratorio John William.

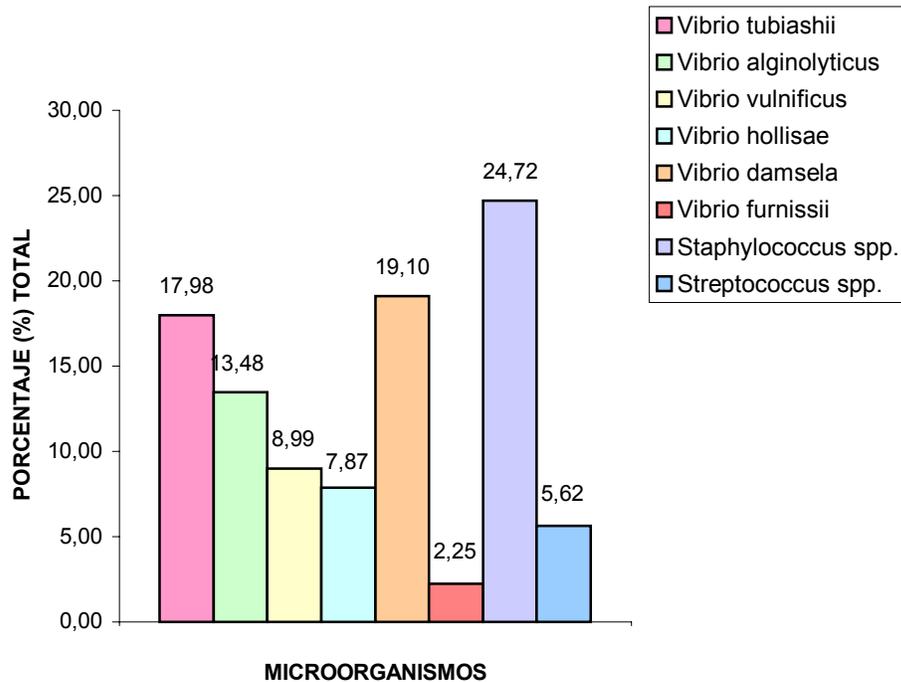
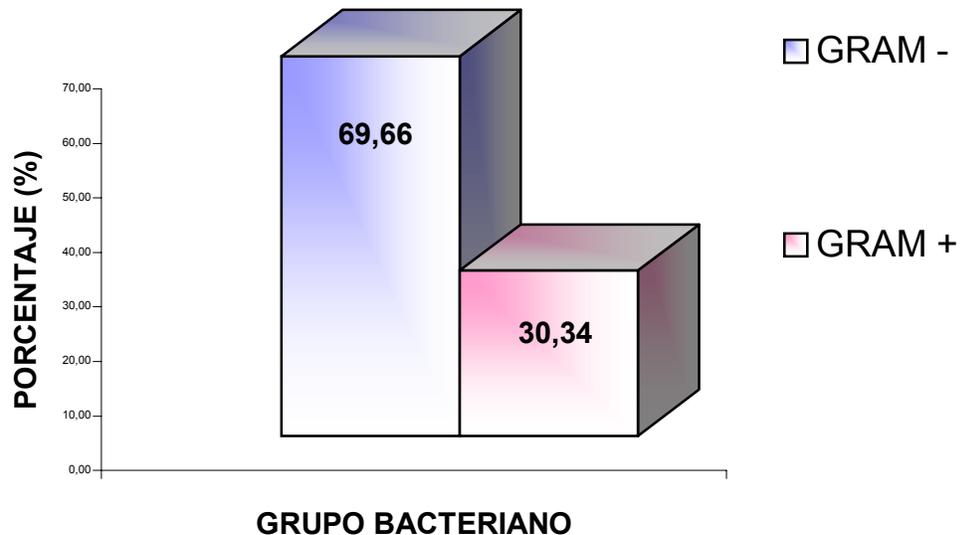


Figura 44. Porcentaje de microorganismos Gram negativos y Gram positivos en los tanques de larvicultura del Laboratorio John William



Con respecto a las bacterias Gram positivas, los resultados obtenidos muestran al género *Staphylococcus spp*, como el microorganismo que más prevaleció a diferencia del *Streptococcus spp*.

De acuerdo a Soluap⁶⁵ las bacterias gram positivas como *Mycobacterium marinum* y ocasionalmente *Micrococcus*, se reportan como agentes etiológicos en camarones marino. La mayoría de estos microorganismos, también forman parte de la microflora normal de las larvas de camarón.

6.5 UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC/ml.) EN EL LABORATORIO JOHN WILLIAM

Para el conteo de las colonias formadas en el medio Plate Count agar, se tuvo en cuenta la tabla para el recuento de colonias (ver Anexo H).

Cuadro 25. Medio Plate Count para determinar unidades formadoras de colonias (UFC). Tanque 7. Laboratorio John William

FECHA MUESTREO	MUESTRA	DILUCIÓN	PROMEDIO DE UFC/ml. de mesófilos aerobios
3-Dic-04	Antes de la siembra	10 ⁻¹	5 x 10 ¹

⁶⁵ SOLUAP, Ener. Op. Cit., 162 p.

8-Dic-04	Superficie	10^{-1}	92 x 10¹
8-Dic-04	Fondo		65 x 10¹
13-Dic-04	Superficie	10^{-1}	40 x 10¹
13-Dic-04	Fondo	10^{-1}	13 x 10²
18-Dic-04	Superficie Antes de transferencia	10^{-2}	51 x 10¹
18-Dic-04	Fondo Antes de transferencia	10^{-2}	84 x 10¹
21-Dic-04	Superficie	10^{-3}	74 x 10¹
21-Dic-04	Fondo	10^{-3}	19 x 10²

Continuación cuadro 25

Cuadro 26. Medio Plate Count para determinar unidades formadoras de colonias (UFC). Tanque 21. Laboratorio John William

FECHA MUESTREO	MUESTRA	DILUCIÓN	PROMEDIO DE UFC/ml de mesófilos aerobios
3-Dic-04	Antes de la siembra	10^{-1}	3 x 10¹
8-Dic-04	Superficie	10^{-1}	22 x 10²
8-Dic-04	Fondo	10^{-1}	41 x 10¹
13-Dic-04	Superficie	10^{-1}	11 x 10¹
13-Dic-04	Fondo	10^{-1}	25 x 10²
18-Dic-04	Superficie antes de transferencia	10^{-2}	14 x 10²
18-Dic-04	Fondo Antes de transferencia	10^{-2}	18 x 10²
23-Dic-04	Superficie	10^{-3}	15 x 10²
23-Dic-04	Fondo	10^{-3}	19 x 10²

Con relación al comportamiento presentado por las colonias para los tanques evaluados, los contajes totales de (UFC/ml.) son similares, presentándose inicialmente valores bajos, para el día uno, incrementando paulatinamente en el día dos, para presentarse un pico máximo y significativo de colonias en el día tres, posteriormente, presenta un descenso en el día cuatro, finalizando con un incremento moderado en día cinco previo a la cosecha.

Con respecto al manejo, los tanques se trabajan a un volumen total de 18 toneladas, iniciando con un volumen de 10 toneladas para la siembra, posteriormente se llena los tanques cada día (2 a 3 toneladas diarias con agua de mar, agua dulce y algas), hasta completar el volumen final (18 toneladas), sin hacer recambios de agua; una vez llega al volumen a trabajar diariamente se hace recambios de agua (3 a 4 toneladas entre agua de mar, dulce y algas), hasta que se realice la cosecha de las larvas. (Ver Anexo 3 y 4)

6.6 SOBREVIVENCIA LARVAL SEGÚN CANTIDAD DE MICROORGANISMOS EN EL LABORATORIO JOHN WILLIAM

En el laboratorio, la sobrevivencia larval, es evaluada en dos periodos de la corrida, el primero se realiza en la transferencia y el segundo en la cosecha. Con respecto a la carga bacteriana, se evaluó los microorganismos encontrados por cada periodo, de acuerdo a como se maneja la sobrevivencia larval. (Ver Anexo U)

Cuadro 27. Sobrevivencia larval según cantidad de microorganismos. Tanque 7

ESPECIES ENCONTRADAS POR PERIODO	PERIODO EVALUADO POR CORRIDA			
	% Siembra a Transferencia	%Transferencia a cosecha	% sobrevivencia larval (S a T)	% sobrevivencia larval (T a C)
Vibrio tubiashii	17,39	15	65 %	57 %
<i>Vibrio alginolyticus</i>	8,70	15		
Vibrio damsela	17,39	15		
<i>Vibrio vulnificus</i>	8,70	5		
Vibrio hollisae	17,39	15		
Staphylococcus spp.	26,09	25		
<i>Streptococcus spp.</i>	4,35	10		

El Cuadro 27, muestra que en el periodo de siembra a transferencia, el porcentaje de sobrevivencia larval fue de 65 %; con respecto a los microorganismos, los más representativos fueron: *V. tubiashii*, *V. damsela* y *V. hollisae* con el 17.39 % cada

uno, para el primer periodo; en la segunda fase de transferencia a cosecha, la sobrevivencia fue del 57 % y los microorganismos representativos fueron *V. tubiashii*, *V. alginolyticus*, *V. damsela* y *V. hollisae* representando el 15 % cada uno.

En el primer periodo se presentó una mortalidad de 35 % y en el segundo periodo de 43 % disminuyendo en un 8 % desde la transferencia hasta la cosecha, siendo este un porcentaje mínimo dentro del cultivo; sin embargo en el primer periodo el porcentaje de mortalidad fue elevado, ya que el primer estadio larval (zoea) es vulnerable a cambios en las condiciones que se puedan presentar en el medio. Los porcentajes de los microorganismos en los dos periodos no disminuyeron, incrementándose en algunas especies como: *V. alginolyticus* y *V. hollisae*. Evaluando los altos porcentajes de mortalidad se puede decir que hay una influencia bacteriana por la ausencia del probiótico.

Cuadro 28. Sobrevivencia larval según cantidad de microorganismos. Tanque 21

ESPECIES ENCONTRADAS POR PERIODO	PERIODO EVALUADO POR CORRIDA			
	% Siembra a Transferencia	%Transferencia a cosecha	% sobrevivencia larval (S a T)	% sobrevivencia larval (T a C)
<i>Vibrio tubiashii</i>	19,05	19,23	62 %	52 %
<i>Vibrio alginolyticus</i>	14,29	11,54		
<i>Vibrio fischeri</i>		7,69		
<i>Vibrio damsela</i>	23,81	19,23		
<i>Vibrio vulnificus</i>	14,29	7,69		
<i>Vibrio furnissii</i>		7,69		
<i>Staphylococcus spp.</i>	23,81	23,08		
<i>Streptococcus spp.</i>	4,76	3,85		

El Cuadro 28, muestra que en el periodo de siembra a transferencia, el porcentaje de sobrevivencia larval fue de 62 %; con respecto a los microorganismos, los más representativos fueron: *V. tubiashii* (19.05 %), y *V. damsela* (19.23 %), para el primer periodo; en la segunda fase de transferencia a cosecha, la sobrevivencia fue del 52 % y los microorganismos representativos fueron *V. tubiashii* (19.23 %), *V. alginolyticus* (11.54 %), *V. damsela* (19.23 %).

En el primer periodo se presentó una mortalidad de 38 % el cual fue elevado, ya que el primer estadio larval (zoea) es vulnerable a cambios en las condiciones que se puedan presentar en el medio, y en el segundo periodo el porcentaje de

mortalidad fue de 48 %, disminuyendo en un 10 % desde la transferencia hasta la cosecha, siendo este un porcentaje mínimo dentro del cultivo. Los porcentajes de los microorganismos en los dos periodos disminuyeron levemente excepto para el *V. alginolyticus*, con un incremento mínimo. Los altos porcentajes de mortalidad se puede decir que se deben a una influencia bacteriana por la ausencia del probiótico.

De acuerdo con Siabichay⁶⁹ los *Vibrios* son los agentes bacterianos más importantes conocidos, se convierten en patógenos oportunistas cuando las condiciones de cultivo favorecen su crecimiento. Tal es el caso de bacterias inocuas, que pueden volverse dañinas, cuando las condiciones del medio favorecen su propagación de forma excesiva.

Según Soluap⁷⁰ mortalidades larvales importantes a nivel de **hatchery**, se encuentran asociadas con *Vibrio* marinos. La vibriosis es una enfermedad, que se reporto primero en Ecuador en 1988, afectando a larvas y postlarvas de camarón. Las cepas de *Vibrio* aisladas en los laboratorios afectados incluyen en su orden de frecuencia de aislamiento: *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio damsela*.

De acuerdo al mismo autor⁷¹, las especies de *Vibrio* asociadas a infecciones de especies marinas son: *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio alginolyticus*. Tienen la propiedad de afectar todos los estadios de desarrollo del camarón, provocando rangos de mortalidades variables que dependen del sitio u órgano infectado, de tal forma que si la infección es localizada en la cutícula, el rango de mortalidad es bajo, mientras que en infecciones internas o sistémicas, las mortalidades son del 100 %, a las 24 horas de aparecer la infección.

⁶⁹ SIABICHAY, Kléber. Op. Cit., 1 p.

⁷⁰ SOLUAP, Ener. Op. Cit., 163 p.

⁷¹ Ibid., 163 p.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 CONCLUSIONES

Para el Laboratorio Aqualab se determinó que las bacterias Gram negativas constituyen el porcentaje más alto (70.4%) frente a las Gram positivas (29.60%).

Para el Laboratorio John William el 69.66% corresponde a bacterias Gram negativas, siendo el más representativo; y el 30.34% lo conforma las bacterias Gram positivas.

Dentro de los microorganismos Gram negativos presenten en el agua de los tanques del Laboratorio Aqualab, el género más frecuente encontrado lo constituye el *Vibrio spp.* (64.15 %) frente a (1.26 %) de *Aeromonas spp.* Las especies de *Vibrio* más representativas fueron *V. tubiashii*. (20.75%), *V. fischeri* (15.72%), *V. alginolyticus* (12.58%).

Con respecto a los microorganismos Gram positivos el género más frecuente encontrado para el Laboratorio Aqualab es el *Staphylococcus spp* (24.53%) frente a *Streptococcus* (10.6%).

En el agua de los tanques del Laboratorio John William el género más representativo es el *Vibrio spp.* (69.6%), y las especies de éste más frecuentemente encontradas fueron: *V. tubiashii* (17.98%), *V. damsela* (19.10%) y *V.alginolyticus* (13.48%),

Para bacterias Gram positivas el mayor porcentaje lo constituye los *Staphylococcus spp.* (24.72%) y un menor porcentaje lo representa el género *Streptococcus spp.* (5.62%).

La biomasa bacteriana (UFC/ml.) presentada en los tanques evaluados en el laboratorio Aqualab, fue similar, presentándose un incremento de crecimiento inicial con valores bajos, siendo el valor más bajos 42×10^1 , para los tanques 24 y 29, incrementándose levemente en la muestra tomada después de la siembra, hasta alcanza su pico más alto en el día dos de muestreo, donde el valor más alto fue 11×10^3 , para el tanque 23, disminuyendo para el día tres e incrementándose moderadamente para los días cuatro y cinco de muestreo próximos al día de cosecha de las larvas.

La misma situación presentaron las colonias del laboratorio John William, diferenciándose en la biomasa (UFC/ml.), donde los valores fueron más altos en relación al Laboratorio Aqualab, siendo el valor más bajo 3×10^1 en el tanque 21, el día uno y el más alto 65×10^1 en el tanque 7, el día dos. El aumento de la biomasa bacteriana coincidió con la ausencia de probiótico en los tanques facilitados para la investigación.

Los porcentajes de sobrevivencia larval en el Laboratorio Aqualab representan un margen normal, según el plan de manejo de la división de laboratorios de la empresa Expalsa, los porcentajes de sobrevivencia larval, deben ser superiores al 60 %, y el laboratorio presentó un porcentaje de 74.33 % en promedio de los cuatro tanques evaluados, cumpliendo con lo determinado por la empresa.

Los porcentajes de sobrevivencia larval, en los tanques evaluados en Laboratorio John William, son menores al porcentaje que maneja la división, en comparación con el Laboratorio Aqualab, estos fueron inferiores, presentándose un porcentaje de 54.5 en promedio para los dos tanques evaluados, lo que coincide con la no incorporación del probiótico a los tanques que fueron permitidos evaluar con esta condición.

Las especies bacterianas, encontradas en los tanques del laboratorio Aqualab, relacionadas con la patogenicidad en larvas de camarón fueron: *Vibrio harveyi* con el 0.63 %, *Vibrio parahaemolyticus* con el 1.26 %, *Vibrio anguillarum* con el 5.03 % y *Vibrio alginolyticus* con el 12.58 %.

En el laboratorio John William, se presentaron las siguientes especies relacionadas con la patogenicidad en larvas: *Vibrio vulnificus* con el 8.99 % y *Vibrio alginolyticus* con el 13.48 %.

7.2 RECOMENDACIONES

En los últimos años el uso de probióticos en Camaronicultura es totalmente amplio, en lo que ha la bacteria se refiere no se conoce si son realmente probióticas, ni las condiciones óptimas para su cultivo y formas de utilización; es por esto que surge la imperiosa necesidad de realizar estudios que demuestren la caracterización de las cepas y el mecanismo de posible acción.

Realizar un seguimiento microbiológico de todo el sistema de producción (masivos de algas, cisternas, agua de mar, agua de los nauplios a sembrar) para determinar las posibles fuentes de contaminación y tener un control de estas antes de su incorporación a los tanques.

Para determinar el tipo de especies es recomendable utilizar los criterios de referencia del Manual de Bergey's (Manual of Systematic Bacteriology) y las tablas usadas por Concepto Azul para una identificación más precisa y confiable de los resultados.

Realizar análisis periódicos de los cultivos y las posibles fuentes de contaminación, ayudan a tener un control de las enfermedades mediante el diagnóstico de las cepas patógenas antes de presentarse los síntomas de la enfermedad.

Incentivar a futuros profesionales a continuar con este tipo de investigaciones y a su vez, en los laboratorios de la Región, promover la realización de controles microbiológicos, ya que las enfermedades de etiología bacteriana son una de las causas de mortalidad en la producción larval y de Camarón en cautiverio.

BIBLIOGRAFÍA

BERTHE, Frank et al. Nuevo concepto de la bacteriología de las crías larvarias: Estructura y dinámica de las poblaciones bacterianas. En Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. (1o. : 1992 : Guayaquil). Memorias del I Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. Guayaquil : Escuela Superior Politécnica del Litoral, 1992. 273 p.

CÁRDENAS, Jovita del Socorro, y GUEVARA, Myrian Lorena. Aislamiento y diferenciación de bacterias marinas degradadoras del petróleo pertenecientes al género *Pseudomonas* en la ensenada de Tumaco – Nariño. San Juan de Pasto: Universidad de Nariño, 1999. 232 p.

CARVACA, Fernando. Manual práctico de bacteriología marina. Guayaquil: Escuela Superior Politécnica del Litoral. Fonapre-Caf, 1990. 78 p.

CLINTON, Dawes. Botánica Marina. México D.F: Noriega – LIMUSA, 1986. 642 p.

COLLINS, C.H. y LYNE, Patricia. M. Métodos Microbiológicos. Zaragoza: ACRIBIA S.A., 1989. 524 p.

CORTE, José. Microbiología. Pagina web. (cited 1º abril., 2004). <http://www.joseacorte.com/microbiología/buscamedios>.

ENCARTA, Atlas dinámico, mapas multimedia. 2002

GULLIAN, Mariel. Diagnostico y control de enfermedades. En Acuicultura. Revista especializada de la camara nacional de acuicultura No 47, p. 8-9. Guayaquil: Edición internacional, Mayo -Junio del 2003.

HAWKER, L.E et al. Elementos de Microbiología General. Introducción a la Microbiología de los microorganismos. Zaragoza: ACRIBIA S.A., 1984. 498 p.

HOLT, John y KRIEG, Noel. Bergey's, Manual of Sistematic Bacteriology. Vol I. Baltimore-USA: Williams & Wilkins, 1984. 964 p.

INTRIAGO, Walter. Problemas de aislamiento y caracterización de bacterias asociadas al síndrome de zoea II y demostración experimental de su patogenicidad. Guayaquil, 1989. 89 p. Trabajo de grado (Ingeniero Acuicultor). Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar.

LÓPEZ, Hilda. Manual microbiología de alimentos. Manizales: Universidad Católica de Manizales, 1997. 270 p.

Mac FADDIN, Jean F. Medio for insolation – cultivation – identification maintenance of medical bacteria. Vol 1. London: William & Wilkins Baltimore, 1985. 301 p.

-----Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. México: Editorial Médica Panamericana. 1991. 301 p.

MANUAL DE CONCEPTO AZUL: Guayaquil. 55 p.

MANUAL DE MEDIOS DE CULTIVO. MERCK: Darmstadt. 2002. 364 p.

MONTAÑO, John. Introducción a las técnicas de biología molecular (Dot Blot, PCR) y bacteriología (carga bacteriana en microplacas) utilizadas para la detección de patógenos que afecta al cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei* en el Ecuador. Guayaquil, 2003. 50 p. Monografía (Biólogo). Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Naturales, escuela de Biología.

MONTEALEGRE, Jaime. Características bioquímicas de las bacterias (web). (Santiago de Chile, Chile), 2002 (cited 3 mayo., 2004). [http://www.agronomia.uchile.cl/webcursos/microbiologiagrual/Guia_Lab_08_\(1\)](http://www.agronomia.uchile.cl/webcursos/microbiologiagrual/Guia_Lab_08_(1)).

MORALES, Ileana. Observaciones sobre el síndrome de descamación del epitelio digestivo “bolitas” en larvas de *Penaeus vannamei* en Ecuador. En : Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. (1o.: 1993 : Guayaquil). Ponencia del I Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. Guayaquil : Escuela Superior Politécnica del Litoral, 1992. 273 p.

NAIMAN, Arnold. et al. Introducción a la estadística. México: McGRAW-HILL, 1987. 402 p.

NE´DER, María de Lourdes. Determinación de los principales tipos de bacterias que afectan el cultivo de larvas de *Penaeus vannamei*, en sus diferentes estadios larvales. Guayaquil, 1989, 93 p. Trabajo de grado (Ingeniero Acuicultor). Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar.

PELCZAR Jr, Michael. J. et al. Microbiología. 2^{da} edición. México: McGRAW-HILL, 1982. 826 p.

RHEINHEIMER, Gerhard. Microbiología de las aguas. 4ª edición. Zaragoza, España: ACRIBIA S.A., 1987. 299 p.

SIABICHAY, Kléber. Aplicación de nuevas técnicas para el requerimiento bacteriológico en un laboratorio de larvas de camarón. Guayaquil, 1997, 64 p. Trabajo de grado (Ingeniero Acuacultor). Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar.

SOLUAP, Ener. Introducción a las patologías de camarones penaeus en cautiverio, Guayaquil: Cabal Ltda., 2000. 244 p.

SOLÍS, A. Miniaturización y simplificación de pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias marinas asociadas al camarón. Guayaquil. Facultad de ingeniería marina y ciencias del mar. Escuela superior politécnica del litoral ESPOL, 1996. 70 p.

VALENZUELA, Emilia María y SILVESTRI, Antonio. Microbiología general. Santafé de Bogotá: Unidad universitaria del sur de Bogotá, 1990. 317 p.

WISTREICH, George y LECHTMAN, Max. Practicas de laboratorio en microbiología. México: LIMUSA, 1989. 252 p.

ZHERDMANT, María Teresa. Caracterización de una cepa de *Vibrio harveyi* considerada agente causal del Síndrome de bolitas en larvas de *Penaeus vannamei*, y estudio de la interacción *in Vitro* con una cepa *Vibrio alginolyticus* utilizada como probiotico. Guayaquil, 1996, 137 p. Trabajo de grado (Ingeniero Acuacultor). Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar.

ANEXOS

Anexo A. Control parámetros del agua por tanque a evaluar. Laboratorio Aqualab

TANQUE: 23

Fecha	Temperatura		Salinidad ‰
	AM	PM	
4 – Oct - 04	31	32.8	34
5 – Oct – 04	33	33.3	34
6 – Oct – 04	33.5	33.5	30
7 – Oct – 04	33.6	34	28
8 – Oct – 04	33.7	33.7	30
9 – Oct – 04	33.9	33.6	30
10 – Oct – 04	33.5	32.6	30
11 – Oct – 04	33.7	34	34
12 – Oct – 04	34	34	34
13 – Oct – 04	33.8	34	34
14 – Oct – 04	33.9	33	34
15 – Oct – 04	32	32.8	34
16 – Oct – 04	32.2	32	34
17 – Oct – 04	Trans	33	34
18 – Oct – 04	32.8	32.2	34
19 – Oct – 04	32	31.8	34
20 – Oct – 04	31.8	31.5	34
21 – Oct – 04	32.5	31.9	32

Anexo B. Control parámetros del agua por tanque a evaluar. Laboratorio Aqualab

TANQUE: 24

Fecha	Temperatura °C		Salinidad ‰
	AM	PM	
4 – Oct - 04	31	33	34
5 – Oct – 04	33.8	33	34
6 – Oct – 04	33.4	34.6	30
7 – Oct – 04	33.8	33.7	28
8 – Oct – 04	33.8	33.5	30
9 – Oct – 04	33.4	32.7	30
10 – Oct – 04	33.7	34	30
11 – Oct – 04	33.9	34	34
12 – Oct – 04	33.8	34	34
13 – Oct – 04	34	32	34
14 – Oct – 04	Trans	31.2	34
15 – Oct – 04	32	32.2	34
16 – Oct – 04	32	32.5	34
17 – Oct – 04	32	31.8	34
18 – Oct – 04	31.8	32	34
19 – Oct – 04	31.5	31	34
20 – Oct – 04	31	30.5	34
21 – Oct – 04	30.5	30.5	32

Anexo C. Control parámetros del agua por tanque a evaluar. Laboratorio Aqualab

TANQUE: 29

Fecha	Temperatura		Salinidad ‰
	AM	PM	
4 – Oct - 04	31.2	32.9	34
5 – Oct – 04	33	33.3	34
6 – Oct – 04	33.2	33.7	30
7 – Oct – 04	33.2	34	28
8 – Oct – 04	33.8	33.4	30
9 – Oct – 04	33	33	30
10 – Oct – 04	33.1	33.1	30
11 – Oct – 04	32.5	33.2	34
12 – Oct – 04	34	33.7	34
13 – Oct – 04	33	33.7	34
14 – Oct – 04	Trans	32.8	34
15 – Oct – 04	32.8	32.5	34
16 – Oct – 04	32.1	31.5	34
17 – Oct – 04	31.3	31.2	34
18 – Oct – 04	31	31.2	34
19 – Oct – 04	31.6	30.5	34
20 – Oct – 04	30.2	30	34
21 – Oct – 04	30.8	30.5	32
22 – Oct – 04	30.5	30.4	30
23 – Oct – 04	31	31	34
24 – Oct – 04	30.3		34

Anexo D. Control parámetros del agua por tanque a evaluar. Laboratorio Aqualab

TANQUE: 30

Fecha	Temperatura		Salinidad ‰
	AM	PM	
4 – Oct – 04	31	33.2	34
5 – Oct – 04	32.8	33.2	34
6 – Oct – 04	32.5	33.1	30
7 – Oct – 04	32	32.1	28
8 – Oct – 04	33	33	30
9 – Oct – 04	33.3	31.7	30
10 – Oct – 04	32	32.8	30
11 – Oct – 04	32.2	33.4	34
12 – Oct – 04	33.6	33.5	34
13 – Oct – 04	33.2	31	34
14 – Oct – 04	Trans	31.2	34
15 – Oct – 04	32.1	31.8	34
16 – Oct – 04	31	31.5	34
17 – Oct – 04	31.8	31.5	34
18 – Oct – 04	31.6	30.5	34
19 – Oct – 04	30.2	29.5	34
20 – Oct – 04	30.5	30.5	34
21 – Oct – 04	29.5	29.5	32
22 – Oct – 04	27.5	27	30
23 – Oct – 04	37.8	27.5	34
24 – Oct – 04	28.2	28.5	34

Anexo E. Control parámetros del agua por tanque a evaluar. Laboratorio John William

TANQUE: 7

Fecha	Temperatura		Salinidad ‰
	AM	PM	
4 – Oct – 04	31	33.2	34
5 – Oct – 04	32.8	33.2	34
6 – Oct – 04	32.5	33.1	30
7 – Oct – 04	32	32.1	28
8 – Oct – 04	33	33	30
9 – Oct – 04	33.3	31.7	30
10 – Oct – 04	32	32.8	30
11 – Oct – 04	32.2	33.4	34
12 – Oct – 04	33.6	33.5	34
13 – Oct – 04	33.2	31	34
14 – Oct – 04	Trans	31.2	34
15 – Oct – 04	32.1	31.8	34
16 – Oct – 04	31	31.5	34
17 – Oct – 04	31.8	31.5	34
18 – Oct – 04	31.6	30.5	34
19 – Oct – 04	30.2	29.5	34
20 – Oct – 04	30.5	30.5	34
21 – Oct – 04	29.5	29.5	32
22 – Oct – 04	27.5	27	30
23 – Oct – 04	37.8	27.5	34
24 – Oct – 04	28.2	28.5	34

Anexo F. Control parámetros del agua por tanque a evaluar. Laboratorio John William

TANQUE: 21

Fecha	Temperatura		Salinidad ‰
	AM	PM	
4 – Oct – 04	31	33.2	34
5 – Oct – 04	32.8	33.2	34
6 – Oct – 04	32.5	33.1	30
7 – Oct – 04	32	32.1	28
8 – Oct – 04	33	33	30
9 – Oct – 04	33.3	31.7	30
10 – Oct – 04	32	32.8	30
11 – Oct – 04	32.2	33.4	34
12 – Oct – 04	33.6	33.5	34
13 – Oct – 04	33.2	31	34
14 – Oct – 04	Trans	31.2	34
15 – Oct – 04	32.1	31.8	34
16 – Oct – 04	31	31.5	34
17 – Oct – 04	31.8	31.5	34
18 – Oct – 04	31.6	30.5	34
19 – Oct – 04	30.2	29.5	34
20 – Oct – 04	30.5	30.5	34
21 – Oct – 04	29.5	29.5	32
22 – Oct – 04	27.5	27	30
23 – Oct – 04	37.8	27.5	34
24 – Oct – 04	28.2	28.5	34

Anexo H . Laboratorio Aqualab

TANQUE 23

CÓDIGO	FECHA	MUESTRA	MEDIO	DESCRIPCIÓN
1	4-Oct-04	TQ 23 Antes de la siembra	TCBS	Circular, convexa, entera, verde, centro más oscuro
2	4-Oct-04	TQ 23 Antes de la siembra	TCBS	Puntiforme, convexa, entera, azul-verdosa
3	4-Oct-04	TQ 23 Antes de la siembra	TCBS	Circular, convexa, entera, verde claro centro más oscuro
4	4-Oct-04	TQ 23 Antes de la siembra	TCBS	Puntiforme, convexa, entera, amarilla
5	4-Oct-04	TQ 23 Antes de la siembra	Agar Marino	Circular, convexa, entera blanca cremosa
6	4-Oct-04	TQ 23 Antes de la siembra	Chapman	No hubo crecimiento
7	4-Oct-04	TQ 23 Después de la siembra	TCBS	No hubo crecimiento
8	4-Oct-04	TQ 23 Después de la siembra	Agar Marino	No hubo crecimiento
9	4-Oct-04	TQ 23 Después de la siembra	Chapman	No hubo crecimiento
10	9-Oct-04	TQ 23 Superficie	TCBS	Puntiforme, convexa. Entera, amarilla
11	9-Oct-04	TQ 23 Superficie	Agar Marino	Circular, convexa, entera, blanca cremosa.
12	9-Oct-04	TQ 23 Superficie	Chapman	Puntiforme, plana, entera rosada
13	9-Oct-04	TQ 23 Superficie	Chapman	Puntiforme, plana, entera, amarilla
14	9-Oct-04	TQ 23	TCBS	Circular, convexa,

		Fondo		entera, amarilla anaranjada centro más oscuro
15	9-Oct-04	TQ 23 Fondo	Agar Marino	Circular, plana, ondulada, blanca
16	9-Oct-04	TQ 23 Fondo	Chapman	Puntiforme, plana, entera, blancas
17	15-Oct-04	TQ 23 Superficie Antes de Transferencia	TCBS	Circular, convexa, entera, verde, centro más oscuro
18	15-Oct-04	TQ 23 Superficie Antes de Transferencia	TCBS	Circular, convexa, entera, amarilla anaranjada centro más oscuro
19	15-Oct-04	TQ 23 Superficie Antes de Transferencia	Agar Marino	Circular, plana, ondulada, blanca
20	15-Oct-04	TQ 23 Superficie Antes de Transferencia	Agar Marino	Filamentosa, plana, erosionada, crema
21	15-Oct-04	TQ 23 Superficie Antes de Transferencia	Chapman	Puntiforme, plana, entera, blancas
22	15-Oct-04	TQ 23 Fondo Antes de Transferencia	TCBS	Circular, convexa, entera, Amarillo anaranjado, centro más oscuro
23	15-Oct-04	TQ 23 Fondo Antes de Transferencia	TCBS	Circular, convexa, entera verdes, centro más oscuro
24	15-Oct-04	TQ 23 Fondo Antes de Transferencia	Agar Marino	Circular, plana, ondulada, blanca
25	15-Oct-04	TQ 23 Fondo Antes de Transferencia	Chapman	Puntiforme, plana, entera, amarilla
26	15-Oct-04	TQ 23 Superficie después de	TCBS	Circular, convexa, entera, verdes, centro más oscuro

		transferencia		
27	15-Oct-04	TQ 23 Superficie después de transferencia	Agar marino	Filamentosa, plana, erosionada, crema
28	15-Oct-04	TQ 23 Superficie después de transferencia	Chapman	Puntiforme, plana, entera, rosada
29	15-Oct-04	TQ 23 Superficie después de transferencia	Chapman	Puntiforme, plana, entera, amarilla
30	15-Oct-04	TQ 23 Fondo después de transferencia	TCBS	Puntiforme, convexa, Entera, amarilla
31	15-Oct-04	TQ 23 Fondo después de transferencia	TCBS	Circular, convexa, entera, Amarillo anaranjado, centro más oscuro
32	15-Oct-04	TQ 23 Fondo después de transferencia	TCBS	Circular, convexa, entera verdes, centro más oscuro
33	15-Oct-04	TQ 23 Fondo después de transferencia	Agar marino	Filamentosa, plana, erosionada, crema
34	15-Oct-04	TQ 23 Fondo después de transferencia	Agar marino	Puntiforme. Plana, entera, blanca cremosa
35	15-Oct-04	TQ 23 Fondo después de transferencia	Chapman	Puntiforme, plana, entera rosada
36	20-Oct-04	TQ 23 Superficie	TCBS	Puntiforme, convexa, entera, amarilla
37	20-Oct-04	TQ 23 Superficie	Agar marino	Circular, convexa, entera, blanca crema
38	20-Oct-04	TQ 23 Superficie	Agar marino	Filamentosa, plana, erosionada, crema

39	20-Oct-04	TQ 23 Superficie	Chapman	Puntiforme, plana, entera, rosada.
40	20-Oct-04	TQ 23 Fondo	TCBS	Circular, convexa, entera, amarillo- anaranjado, centro más oscuro
41	20-Oct-04	TQ 23 Fondo	TCBS	Circular, convexa, entera, verde, centro más oscuro
42	20-Oct-04	TQ 23 Fondo	Agar Marino	Circular, convexa, entera, blanca cremosa
43	20-Oct-04	TQ 23 Fondo	Chapman	Puntiforme, plana, entera, blancas

Continuación Anexo H.

Anexo I . Laboratorio Aqualab

TANQUE 24

CÓDIGO	FECHA	MUESTRA	MEDIO	DESCRIPCIÓN
1	4-Oct-04	TQ 24 Antes de la siembra	TCBS 10 ⁻²	Circular, convexa, entera, verde
2	4-Oct-04	TQ 24 Antes de la siembra	TCBS 10 ⁻²	Circular, convexa, entera, azul verdosa
3	4-Oct-04	TQ 24 Antes de la siembra	Agar Marino 10 ⁻²	Circular, convexa, entera, blanco-crema
4	4-Oct-04	TQ 24 Antes de la siembra	Agar Marino 10 ⁻²	Puntiforme, plana, entera, blanca
5	4-Oct-04	TQ 24 Antes de la siembra	Chapman 10 ⁻¹	Puntiforme, plana, entera, blanca
6	4-Oct-04	TQ 24 Después de la siembra	TCBS 10 ⁻²	Circular, convexa, entera, verde
7	4-Oct-04	TQ 24 Después de la siembra	Agar Marino 10 ⁻²	Puntiforme, plana, entera, blanca
8	4-Oct-04	TQ 24 Después de la siembra	Chapman 10 ⁻¹	Puntiforme, plana, entera, blanca
9	9-Oct-04	TQ 24 Superficie	TCBS 10 ⁻²	Circular, convexa, entera, amarilla
10	9-Oct-04	TQ 24 Superficie	TCBS 10 ⁻²	Irregular, plana, ondulada, verde claro
11	9-Oct-04	TQ 24 Superficie	Agar Marino 10 ⁻²	Circular, convexa, entera, blanca-crema
12	9-Oct-04	TQ 24	Agar	Puntiforme,

		Superficie	Marino 10 ⁻²	plana, entera, blanca
13	9-Oct-04	TQ 24 Superficie	Agar Marino 10 ⁻²	Rizoide, plana, erosionada, blanca
14	9-Oct-04	TQ 24 Superficie	Chapman 10 ⁻¹	Circular, convexa, entera, crema
15	9-Oct-04	TQ 24 Fondo	TCBS 10 ⁻²	Circular, convexa, entera, amarilla
16	9-Oct-04	TQ 24 Fondo	Agar Marino 10 ⁻²	Circular, convexa, entera, blanco-crema
17	9-Oct-04	TQ 24 Fondo	Chapman 10 ⁻²	Puntiforme, plana, entera, blanca
18	15-Oct-04	TQ 24 Superficie Antes de transferencia	TCBS 10 ⁻²	Circular, plana, entera, amarilla
19	15-Oct-04	TQ 24 Superficie Antes de transferencia	TCBS 10 ⁻²	Circular, plana, entera, verde
20	15-Oct-04	TQ 24 Superficie Antes de transferencia	Agar Marino 10 ⁻²	Circular, convexa, entera, blanca-crema
21	15-Oct-04	TQ 24 Superficie Antes de transferencia	Agar Marino 10 ⁻²	Rizoide, plana, erosionada, blanca
22	15-Oct-04	TQ 24 Superficie Antes de transferencia	Chapman 10 ⁻¹	Circular, convexa, entera, amarilla
23	15-Oct-04	TQ 24 Superficie Antes de transferencia	Chapman 10 ⁻¹	Circular, convexa, entera, rosada

24	15-Oct-04	TQ 24 Fondo Antes de transferencia	TCBS 10^{-2}	Circular, convexa, entera, verde
25	15-Oct-04	TQ 24 Fondo Antes de transferencia	TCBS 10^{-2}	Irregular, plana, ondulada, verde claro
26	15-Oct-04	TQ 24 Fondo Antes de transferencia	Agar Marino 10^{-2}	Circular, convexa, entera, blanca
27	15-Oct-04	TQ 24 Fondo Antes de transferencia	Chapman 10^{-1}	Puntiforme, plana, entera, rosada
28	15-Oct-04	TQ 24 Fondo Antes de transferencia	Chapman 10^{-1}	Puntiforme, plana, entera, amarilla
29	15-Oct-04	TQ 30 Superficie Antes de transferencia	TCBS 10^{-2}	Circular, convexa, entera, amarilla
30	15-Oct-04	TQ 24 Superficie Después de transferencia	TCBS 10^{-2}	Circular, convexa, entera, amarilla
31	15-Oct-04	TQ 24 Superficie Después de transferencia	TCBS 10^{-2}	Circular, convexa, entera, verde
32	15-Oct-04	TQ 24 Superficie Después de transferencia	Agar Marino 10^{-2}	No hubo crecimiento
33	15-Oct-04	TQ 24 Superficie Después de transferencia	Chapman 10^{-1}	Puntiforme, plana, entera, amarilla
34	15-Oct-04	TQ 24 Superficie	Chapman 10^{-1}	Puntiforme, plana, entera

		Después de transferencia		rosada
35	15-Oct-04	TQ 24 Fondo Después de transferencia	TCBS 10^{-2}	Circular, convexa, entera, amarilla
36	15-Oct-04	TQ 24 Fondo Después de transferencia	TCBS 10^{-2}	Circular, convexa, entera, verde
37	15-Oct-04	TQ 24 Fondo Después de transferencia	Agar Marino 10^{-2}	No hubo crecimiento
38	15-Oct-04	TQ 24 Fondo Después de transferencia	Chapman 10^{-2}	Circular, convexa, entera, rosada
39	15-Oct-04	TQ 24 Fondo Después de transferencia	Chapman 10^{-2}	Circular, convexa, entera, amarilla
40	20-Oct-04	TQ 24 Superficie	TCBS 10^{-2}	Circular, convexa, entera, amarilla
41	20-Oct-04	TQ 24 Superficie	TCBS 10^{-2}	Circular, convexa, entera, verde claro
42	20-Oct-04	TQ 24 Superficie	Agar Marino 10^{-2}	Puntiforme, plana, entera, blanca
43	20-Oct-04	TQ 24 Superficie	Agar Marino 10^{-2}	Irregular, plana, entera, blanca
44	20-Oct-04	TQ 24 Superficie	Chapman 10^{-1}	Puntiforme, plana, entera, rosada
45	20-Oct-04	TQ 24 Superficie	Chapman 10^{-1}	Puntiforme, plana, entera, amarilla
46	20-Oct-04	TQ 24	TCBS	Circular,

		Fondo	10 ⁻²	convexa, entera, amarilla
47	20-Oct-04	TQ 24 Fondo	TCBS 10 ⁻²	Circular, convexa, entera, verde claro
48	20-Oct-04	TQ 24 Fondo	Agar marino 10 ⁻¹	Puntiforme, plana, entera, blanca
49	20-Oct-04	TQ 24 Fondo	Chapman 10 ⁻¹	Puntiforme, plana, entera, blanca
50	20-Oct-04	TQ 24 Fondo	Chapman 10 ⁻¹	Puntiforme, plana, entera, rosada

Continuación Anexo I.

Anexo J . Laboratorio Aqualab

TANQUE 29

<i>CÓDIGO</i>	FECHA	MUESTRA	MEDIO	DESCRIPCIÓN
1	4-Oct-04	TQ 29 Antes de la siembra	TCBS	Puntiforme, plana, entera, amarilla
2	4-Oct-04	TQ 29 Antes de la siembra	Agar marino	Circular, convexa, entera, blanca crema
3	4-Oct-04	TQ 29 Antes de la siembra	Chapman	No hubo crecimiento
4	4-Oct-04	TQ 29 Después de la siembra	TCBS	No hubo crecimiento
5	4-Oct-04	TQ 29 Después de la siembra	Agar marino	Filamentosa, plana, erosionada, crema
6	4-Oct-04	TQ 29 Después de la siembra	Agar marino	Circular, plana, ondulada blanca
7	4-Oct-04	TQ 29 Después de la siembra	Agar marino	Circular, convexa, entera, blanca crema
8	4-Oct-04	TQ 29 Después de la siembra	Chapman	No hubo crecimiento
9	9-Oct-04	TQ 29 Superficie	TCBS	Circular, convexa, entera, amarilla
10	9-Oct-04	TQ 29 Superficie	TCBS	Circular, convexa, entera, verde claro centro oscuro
11	9-Oct-04	TQ 29 Superficie	Agar Marino	Circular, convexa, entera, blanca crema
12	9-Oct-04	TQ 29	Chapman	Puntiforme,

		Superficie		plana, entera, blancas
13	9-Oct-04	TQ 29 Fondo	TCBS	Puntiforme, plana, entera, amarilla
14	9-Oct-04	TQ 29 Fondo	TCBS	Circular, convexa, entera, verde claro centro oscuro
15	9-Oct-04	TQ 29 Fondo	Agar Marino	Circular, convexa, entera, blanca crema
16	9-Oct-04	TQ 29 Fondo	Chapman	Puntiforme, plana, entera, amarilla
17	9-Oct-04	TQ 29 Fondo	Chapman	Puntiforme, plana, entera, rosada
18	15-Oct-04	TQ 29 superficie Antes de transferencia	TCBS	Circular, convexa, entera verdes, centro más oscuro
19	15-Oct-04	TQ 29 superficie Antes de transferencia	TCBS	Circular, convexa, entera, verde
20	15-Oct-04	TQ 29 superficie Antes de transferencia	Agar marino	Circular, plana, ondulada, blanca
21	15-Oct-04	TQ 29 superficie Antes de transferencia	Chapman	Puntiforme, plana, entera, blancas
22	15-Oct-04	TQ 29 superficie Antes de transferencia	Chapman	Puntiforme, plana, entera, amarilla
23	15-Oct-04	TQ 29 superficie después de transferencia	TCBS	Circular, convexa, entera, verde centro más oscuro

24	15-Oct-04	TQ 29 superficie después de transferencia	TCBS	Circular, convexa, entera, verde claro centro oscuro
25	15-Oct-04	TQ 29 superficie después de transferencia	Agar marino	Circular, convexa, entera, blanca crema
26	15-Oct-04	TQ 29 superficie después de transferencia	Chapman	Puntiforme, plana, entera, rosada
27	15-Oct-04	TQ 29 superficie después de transferencia	Chapman	Puntiforme, plana, entera, amarilla
28	15-Oct-04	TQ 29 Fondo después de transferencia	TCBS	Circular, convexa, entera, verde claro centro más oscuro
29	15-Oct-04	TQ 29 Fondo después de transferencia	TCBS	Circular, convexa, entera, verde centro más oscuro
30	15-Oct-04	TQ 29 Fondo después de transferencia	Agar marino	Circular, convexa, entera, blanca crema
31	15-Oct-04	TQ 29 Fondo después de transferencia	Agar marino	Filamentosa, plana, erosionada, crema
32	15-Oct-04	TQ 29 Fondo después de transferencia	Chapman	Puntiforme, plana, entera, amarilla
33	20-Oct-04	TQ 29 Superficie	TCBS	Circular, convexa, entera, verde, centro más oscuro
34	20-Oct-04	TQ 29	TCBS	Circular,

		Superficie		convexa, entera, verde claro, centro oscuro
35	20-Oct-04	TQ 29 Superficie	Agar marino	Puntiforme, plana, entera, blanca
36	20-Oct-04	TQ 29 Superficie	Chapman	Puntiforme, plana, entera, blanca
37	20-Oct-04	TQ 29 Fondo	TCBS	Circular, convexa, entera, verde centro más oscuro
38	20-Oct-04	TQ 29 Fondo	Agar marino	Puntiforme, plana, entera, blanca
39	20-Oct-04	TQ 29 Fondo	Chapman	No hubo crecimiento.

Continuación Anexo J.

Anexo K . Laboratorio Aqualab

TANQUE 30

CÓDIGO	FECHA	MUESTRA	MEDIO	DESCRIPCIÓN
1	4-Oct-04	TQ 30 Antes de la siembra	TCBS 10 ⁻²	Circular, convexa, entera, amarilla
2	4-Oct-04	TQ 30 Antes de la siembra	TCBS 10 ⁻²	Circular, convexa entera, verde
3	4-Oct-04	TQ 30 Antes de la siembra	Agar Marino 10 ⁻²	Circular, plana, entera, blanco-crema
4	4-Oct-04	TQ 30 Antes de la siembra	Chapman 10 ⁻¹	Puntiforme, plana, entera, blanca
5	4-Oct-04	TQ 30 Después de la siembra	TCBS 10 ⁻²	Circular, convexa, entera, amarilla
6	4-Oct-04	TQ 30 Después de la siembra	Agar Marino 10 ⁻²	Circular, plana, entera, blanca-crema
7	4-Oct-04	TQ 30 Después de la siembra	Chapman 10 ⁻¹	No hubo crecimiento
8	9-Oct-04	TQ 30 Superficie	TCBS 10 ⁻²	Irregular, plana, filamentosa, amarilla-verdosa
9	9-Oct-04	TQ 30 Superficie	Agar Marino 10 ⁻²	Puntiforme, plana, entera, blanca
10	9-Oct-04	TQ 30 Superficie	Agar Marino 10 ⁻²	Circular, convexa, entera, crema
11	9-Oct-04	TQ 30 Superficie	Agar Marino 10 ⁻²	Circular, convexa, entera, blanco-crema
12	9-Oct-04	TQ 30	Chapman	Puntiforme,

		Superficie	10^{-1}	plana, entera, rosada
13	9-Oct-04	TQ 30 Superficie	Chapman 10^{-1}	Puntiforme, plana, entera, amarilla
14	9-Oct-04	TQ 30 Fondo	TCBS 10^{-2}	Circular, convexa entera, amarilla
15	9-Oct-04	TQ 30 Fondo	Agar Marino 10^{-2}	Puntiforme, plana, entera, blanca
16	9-Oct-04	TQ 30 Fondo	Chapman 10^{-1}	Puntiforme, plana, entera, rosada
17	15-Oct-04	TQ 30 Superficie Antes de transferencia	TCBS 10^{-2}	Circular, convexa, entera, amarilla
18	15-Oct-04	TQ 30 Superficie Antes de transferencia	TCBS 10^{-2}	Circular, plana, entera, verde centro oscuro
19	15-Oct-04	TQ 30 Superficie Antes de transferencia	Agar Marina 10^{-2}	Puntiforme, plana, entera, blanca
20	15-Oct-04	TQ 30 Superficie Antes de transferencia	Agar Marino 10^{-2}	Filamentosa, plana, erosionada, blanca
21	15-Oct-04	TQ 30 Superficie Antes de transferencia	Chapman 10^{-1}	Puntiforme, plana, entera, rosada
22	15-Oct-04	TQ 30 Superficie Antes de transferencia	Chapman 10^{-1}	Puntiforme, plana, entera, amarilla
23	15-Oct-04	TQ 30 Fondo Antes de transferencia	TCBS 10^{-2}	Circular, convexa, entera, amarilla

24	15-Oct-04	TQ 30 Fondo Antes de transferencia	TCBS 10^{-2}	Circular, convexa, entera, verde
25	15-Oct-04	TQ 30 Fondo Antes de transferencia	Agar Marino 10^{-2}	Circular, convexa, entera, blanca
26	15-Oct-04	TQ 30 Fondo Antes de transferencia	Chapman 10^{-1}	Circular, convexa, entera, rosada
27	15-Oct-04	TQ 30 Fondo Antes de transferencia	Chapman 10^{-1}	Circular, convexa, entera, amarilla
28	15-Oct-04	TQ 30 Superficie Después de transferencia	TCBS 10^{-2}	Circular, convexa, entera, amarilla
29	15-Oct-04	TQ 30 Superficie Después de transferencia	TCBS 10^{-2}	Irregular, plana, filamentosa, amarillo- verdosa
30	15-Oct-04	TQ 30 Superficie Después de transferencia	Agar Marino 10^{-2}	Circular, plana, entera, blanca
31	15-Oct-04	TQ 30 Superficie Después de transferencia	Chapman 10^{-1}	Circular, convexa, entera, amarilla
32	15-Oct-04	TQ 30 Superficie Después de transferencia	Chapman 10^{-1}	Circular, convexa, entera, rosada
33	15-Oct-04	TQ 30 Fondo Después de transferencia	TCBS 10^{-2}	Circular, convexa, entera, amarilla
34	15-Oct-04	TQ 30 Fondo	TCBS 10^{-2}	Irregular, plana, filamentosa,

		Después de transferencia		amarilla-verdosa
35	15-Oct-04	TQ 30 Fondo Después de transferencia	Agar Marino 10^{-2}	No hubo crecimiento
36	15-Oct-04	TQ 30 Fondo Después de transferencia	Chapman 10^{-1}	Puntiforme, plana, entera, blanca
37	20-Oct-04	TQ 30 Superficie	TCBS 10^{-2}	Circular, convexa. entera, amarilla
38	20-Oct-04	TQ 30 Superficie	TCBS 10^{-2}	Circular, convexa, entera, verde claro
39	20-Oct-04	TQ 30 Superficie	Agar Marino 10^{-2}	Circular convexa, entera, blanca
40	20-Oct-04	TQ 30 Superficie	Agar Marino 10^{-2}	Puntiforme, plana, entera, blanca
41	20-Oct-04	TQ 30 Superficie	Agar Marino 10^{-2}	Filamentosa, plana, erosionada, blanca
42	20-Oct-04	TQ 30 Superficie	Chapman 10^{-1}	Puntiforme, plana, entera, rosada
43	20-Oct-04	TQ 30 Superficie	Chapman 10^{-1}	Puntiforme, plana, entera, blanca
44	20-Oct-04	TQ 30 Fondo	TCBS 10^{-2}	Circular, convexa, entera, amarilla
45	20-Oct-04	TQ 30 Fondo	TCBS 10^{-2}	Circular, entera, convexa, verde claro
46	20-Oct-04	TQ 30 Fondo	TCBS 10^{-2}	Irregular, plana, ondulada, verde claro
47	20-Oct-04	TQ 30	Agar Marino	Puntiforme,

		Fondo	10^{-2}	plana, entera, blanco
48	20-Oct-04	TQ 30 Fondo	Chapman 10^{-1}	Puntiforme, plana, entera, blanca
49	20-Oct-04	TQ 30 Fondo	Chapman 10^{-1}	Puntiforme, plana, entera, rosada
50	20-Oct-04	TQ 30 Fondo	Chapman 10^{-1}	Puntiforme, plana, entera amarilla
51	24-Oct-04	TQ 30 Superficie	TCBS 10^{-2}	Circular, convexa, entera, amarilla
52	24-Oct-04	TQ 30 Superficie	TCBS 10^{-2}	Circular, convexa, entera, verde centro oscuro
53	24-Oct-04	TQ 30 Superficie	Agar Marino 10^{-2}	Circular, convexa, entera, blanca-crema
54	24-Oct-04	TQ 30 Superficie	Agar Marino 10^{-2}	Circular, convexa, entera, crema
55	24-Oct-04	TQ 30 Superficie	Chapman 10^{-2}	Puntiforme, plana, entera, amarilla
56	24-Oct-04	TQ 30 Superficie	Chapman 10^{-2}	Circular, plana, entera, rosada
57	24-Oct-04	TQ 30 Fondo	TCBS 10^{-2}	Circular, convexa, entera, amarilla
58	24-Oct-04	TQ 30 Fondo	TCBS 10^{-2}	Circular, convexa, entera, verde
59	24-Oct-04	TQ 30 Fondo	Agar Marino 10^{-2}	Circular, convexa, entera, blanca-crema
60	24-Oct-04	TQ 30 Fondo	Agar Marino 10^{-2}	Circular, convexa,

				entera, crema
61	24-Oct-04	TQ 30 Fondo	Agar Marino 10^{-2}	Puntiforme, plana, entera, blanca
62	24-Oct-04	TQ 30 Fondo	Agar Marino 10^{-2}	Puntiforme, plana, entera, blanca-crema
63	24-Oct-04	TQ 30 Fondo	Chapman 10^{-2}	Circular, convexa, entera, amarilla
64	24-Oct-04	TQ 30 Fondo	Chapman 10^{-2}	Circular, convexa, entera, rosada

Continuación Anexo K.

Anexo Q . Laboratorio John William

TANQUE 7

CÓDIGO	FECHA	MUESTRA	MEDIO	DESCRIPCIÓN
1	3-Dic-04	TQ 7 Antes de la siembra	TCBS sin dilución	Circular, convexa, entera, Amarilla
2	3-Dic-04	TQ 7 Antes de la siembra	Agar Marino Sin dilución	Puntiforme, plana, entera, blanca
3	3-Dic-04	TQ 7 Antes de la siembra	Chapman Sin dilución	Puntiforme, plana, entera, blanca
4	8-Dic-04	TQ 7 Superficie	TCBS 10^{-1}	Circular, convexa, entera, verde (centro más oscuro)
5	8-Dic-04	TQ 7 Superficie	TCBS 10^{-1}	Circular, convexa, entera, verde
6	8-Dic-04	TQ 7 Superficie	TCBS 10^{-1}	Circular, convexa, entera, verde claro
7	8-Dic-04	TQ 7 Superficie	Agar Marino Sin dilución	Circular, convexa, entera, crema
8	8-Dic-04	TQ 7 Superficie	Agar Marino Sin dilución	Circular, plana, entera, blanca
9	8-Dic-04	TQ 7 Superficie	Chapman 10^{-1}	Circular, convexa, entera, rosada
10	8-Dic-04	TQ 7 Fondo	TCBS	Circular, convexa, entera, verde
11	8-Dic-04	TQ 7 Fondo	TCBS	Circular, convexa, entera, verde claro
12	8-Dic-04	TQ 7 Fondo	Agar Marino	Circular, convexa, entera, crema
13	8-Dic-04	TQ 7	Agar	Circular, plana,

		Fondo	Marino	entera, blanca
14	8-Dic-04	TQ 7 Fondo	Chapman	Circular, convexa, entera, rosada
15	13-Dic-04	TQ 7 Superficie Antes de transferencia	TCBS Sin dilución	Circular, convexa, entera, amarilla
16	13-Dic-04	TQ 7 Superficie Antes de transferencia	Agar Marino Sin dilución	Circular, plana, entera, blanca
17	13-Dic-04	TQ 7 Superficie Antes de transferencia	Agar Marino Sin dilución	Circular, convexa, entera, crema
18	13-Dic-04	TQ 7 Superficie Antes de transferencia	Chapman Sin dilución	Circular, convexa, entera, crema
19	13-Dic-04	TQ 7 Superficie Antes de transferencia	Chapman Sin dilución	Circular, convexa, entera, blanco
20	13-Dic-04	TQ 7 Fondo Antes de transferencia	TCBS Sin dilución	Circular, convexa, entera, amarilla
21	13-Dic-04	TQ 7 Fondo Antes de transferencia	Agar Marino Sin dilución	Circular, convexa, entera, crema
22	13-Dic-04	TQ 7 Fondo Antes de transferencia	Agar Marino Sin dilución	Circular, plana, entera, blanca
23	13-Dic-04	TQ 7 Fondo Antes de transferencia	Chapman Sin dilución	Circular, convexa, entera, blanca
24	13-Dic-04	TQ 7 Fondo	Chapman Sin dilución	Circular, convexa, entera, rosada

		Antes de transferencia		
25	18-Dic-04	TQ 7 Superficie	TCBS sin dilución	Circular, convexa, entera, amarilla
26	18-Dic-04	TQ 7 Superficie	Agar Marino Sin dilución	Puntiforme, plana, entera, blanca
27	18-Dic-04	TQ 7 Superficie	Agar Marino Sin dilución	Circular, plana, entera, blanca
28	18-Dic-04	TQ 7 Superficie	Chapman Sin dilución	Circular, convexa, entera, crema
29	18-Dic-04	TQ 7 Superficie	Chapman Sin dilución	Circular, convexa, entera, blanca
30	18-Dic-04	TQ 7 Fondo	TCBS	Circular, convexa, entera, verde claro
31	18-Dic-04	TQ 7 Fondo	TCBS	Circular, convexa, entera, verde
32	18-Dic-04	TQ 7 Fondo	Agar Marino	Circular, convexa, entera, crema
33	18-Dic-04	TQ 7 Fondo	Chapman	Puntiforme, plana, entera, blanca
34	21-Dic-04	TQ 7 Superficie	TCBS 10^{-1}	Circular, convexa, entera, amarilla
35	21-Dic-04	TQ 7 Superficie	Agar Marino 10^{-1}	Circular, plana, entera, blanca
36	21-Dic-04	TQ 7 Superficie	Agar Marino 10^{-1}	Puntiforme, plana, entera, blanca
37	21-Dic-04	TQ 7 Superficie	Agar Marino 10^{-1}	Circular, convexa, entera, crema
38	21-Dic-04	TQ 7 Superficie	Chapman 10^{-1}	Puntiforme, plana, entera, blanca
39	21-Dic-04	TQ 7 Superficie	Chapman 10^{-1}	Circular, convexa, entera, crema
40	21-Dic-04	TQ 7 Fondo	TCBS	Circular, convexa, entera, amarilla
41	21-Dic-04	TQ 7 Fondo	Agar Marino	Circular, convexa, entera, crema
42	21-Dic-04	TQ 7	Agar	Circular, plana,

		Fondo	Marino	entera, blanca
43	21-Dic-04	TQ 7 Fondo	Chapman 10 ⁻¹	Circular, convexa, entera, blanca
44	21-Dic-04	TQ 7 Fondo	Chapman 10 ⁻¹	Circular, convexa, entera, rosada

Continuación Anexo Q.

Anexo R . Laboratorio John William

TANQUE 21

CÓDIGO	FECHA	MUESTRA	MEDIO	DESCRIPCIÓN
1	3-Dic-04	TQ 21 Antes de la siembra	TCBS Sin dilución	No hubo crecimiento
2	3-Dic-04	TQ 21 Antes de la siembra	Agar Marino Sin dilución	Puntiforme, plana, entera, blanca
3	3-Dic-04	TQ 21 Antes de la siembra	Chapman Sin dilución	Puntiforme, plana, entera, blanca
4	8-Dic-04	TQ 21 Superficie	TCBS Sin dilución	Circular, convexa, entera, verde
5	8-Dic-04	TQ 21 Superficie	Agar Marino Sin dilución	Circular, convexa, entera, crema
6	8-Dic-04	TQ 21 Superficie	Agar Marino Sin dilución	Circular, plana, entera, blanca
7	8-Dic-04	TQ 21 Superficie	Agar Marino Sin dilución	Puntiforme, plana, entera. Blanca
8	8-Dic-04	TQ 21 Superficie	Chapman 10^{-1}	Circular, convexa, entera, rosada
9	8-Dic-04	TQ 21 Fondo	TCBS	Circular, convexa, entera, amarilla
10	8-Dic-04	TQ 21 Fondo	TCBS	Circular, convexa, entera, verde
11	8-Dic-04	TQ 21 Fondo	Agar Marino	Circular, convexa, entera, crema
12	8-Dic-04	TQ 21 Fondo	Agar Marino	Circular, plana, entera, blanca
13	8-Dic-04	TQ 21 Fondo	Chapman 10^{-1}	Circular, convexa, entera, rosada
14	13-Dic-04	TQ 21 Superficie	TCBS Sin dilución	Circular, convexa, entera, amarilla

		antes de transferencia		
15	13-Dic-04	TQ 21 Superficie antes de transferencia	Agar Marino Sin dilución	Circular, plana, entera, blanca
16	13-Dic-04	TQ 21 Superficie antes de transferencia	Agar Marino Sin dilución	Puntiforme, plana, entera, blanca
17	13-Dic-04	TQ 21 Superficie antes de transferencia	Chapman Sin dilución	Circular, convexa, entera, crema
18	13-Dic-04	TQ 21 Superficie antes de transferencia	Chapman Sin dilución	Circular, convexa, entera, blanca
19	13-Dic-04	TQ 21 Fondo antes de transferencia	TCBS	Circular, convexa, entera, verde
20	13-Dic-04	TQ 21 Fondo antes de transferencia	TCBS	Circular, convexa, entera, Amarilla
21	13-Dic-04	TQ 21 Fondo antes de transferencia	Agar Marino	Puntiforme, plana, entera, blanca
22	13-Dic-04	TQ 21 Fondo antes de transferencia	Chapman 10 ⁻¹	Puntiforme, plana, entera, blanca
23	18-Dic-04	TQ 21 Superficie	TCBS Sin dilución	Circular, convexa, entera, verde (centro más oscuro)
24	18-Dic-04	TQ 21 Superficie	TCBS Sin dilución	Circular, convexa, entera, verde claro(centro más oscuro)
25	18-Dic-04	TQ 21	TCBS	Circular, convexa,

		Superficie	Sin dilución	entera, amarilla
26	18-Dic-04	TQ 21 Superficie	Agar Marino Sin dilución	circular, convexa entera, blanca- crema
27	18-Dic-04	TQ 21 Superficie	Agar Marino Sin dilución	Circular, plana, entera, blanca
28	18-Dic-04	TQ 21 Superficie	Chapman Sin dilución	Circular, convexa, entera, amarilla
29	18-Dic-04	TQ 21 Superficie	Chapman Sin dilución	Circular, convexa, entera, blanca
30	18-Dic-04	TQ 21 Fondo	TCBS	Puntiforme, plana, entera, blanca
31	18-Dic-04	TQ 21 Fondo	TCBS	Circular, convexa, entera, verde (centro más oscuro)
32	18-Dic-04	TQ 21 Fondo	Agar Marino	Puntiforme, plana, entera, blanca
33	18-Dic-04	TQ 21 Fondo	Agar Marino	Circular, convexa, entera, crema
34	18-Dic-04	TQ 21 Fondo	Chapman 10^{-1}	Puntiforme, plana, entera, blanca
35	23-Dic-04	TQ 21 Superficie	TCBS 10^{-1}	Circular, convexa, entera, verde claro
36	23-Dic-04	TQ 21 Superficie	TCBS 10^{-1}	Circular, convexa, entera, verde
37	23-Dic-04	TQ 21 Superficie	TCBS 10^{-1}	Circular, convexa, entera, amarilla
38	23-Dic-04	TQ 21 Superficie	Agar Marino 10^{-1}	Puntiforme, plana, entera, blanca
39	23-Dic-04	TQ 21 Superficie	Agar Marino 10^{-1}	Circular, plana, entera, blanca
40	23-Dic-04	TQ 21 Superficie	Chapman 10^{-1}	Puntiforme, plana, entera, blanca
41	23-Dic-04	TQ 21 Superficie	Chapman 10^{-1}	Circular, convexa, entera, crema
42	23-Dic-04	TQ 21 Fondo	TCBS	Circular, convexa, entera, verde

43	23-Dic-04	TQ 21 Fondo	TCBS	Circular, convexa, entera, verde claro
44	23-Dic-04	TQ 21 Fondo	Agar Marino	Circular, convexa, entera, crema
45	23-Dic-04	TQ 21 Fondo	Agar Marino	Circular, plana, entera, blanca
46	23-Dic-04	TQ 21 Fondo	Chapman 10 ⁻¹	Circular, convexa, entera, blanca
47	23-Dic-04	TQ 21 Fondo	Chapman 10 ⁻¹	Circular, convexa, entera, rosada

Continuación Anexo R.

Anexo Z. Laboratorio John William

AGUA DE NAUPLIO v. MADURACIÓN LABORATORIOS MACROBIO Y CENTINELA

CÓDIGO	FECHA	MUESTRA	MEDIO	DESCRIPCIÓN
1	3-Dic-04	Nauplio V Macrobio	TCBS sin dilución	Circular, convexa, entera, amarilla
2	3-Dic-04	Nauplio V Macrobio	TCBS Sin dilución	Circular, convexa, entera, verde
3	3-Dic-04	Nauplio V Macrobio	Agar Marino Sin dilución	Puntiforme, plana, entera, blanca
4	3-Dic-04	Nauplio V Macrobio	Agar Marino Sin dilución	Circular, plana, entera, blanca
5	3-Dic-04	Nauplio V Macrobio	Chapman Sin dilución	Circular, convexa, entera, crema
6	3-Dic-04	Nauplio V Centinela	TCBS 10 ⁻¹	Circular, convexa, entera, amarilla
7	3-Dic-04	Nauplio V Macrobio	TCBS Sin dilución	Circular, convexa, entera, verde
8	3-Dic-04	Nauplio V Centinela	Agar Marino Sin dilución	Puntiforme, plana, entera, blanca
9	3-Dic-04	Nauplio V Centinela	Chapman 10 ⁻¹	Puntiforme, plana, entera, blanca
10	3-Dic-04	Nauplio V Centinela	Chapman 10 ⁻¹	Circular, convexa, entera, crema

Anexo 1. Laboratorio John William

MASIVO DE ALGAS

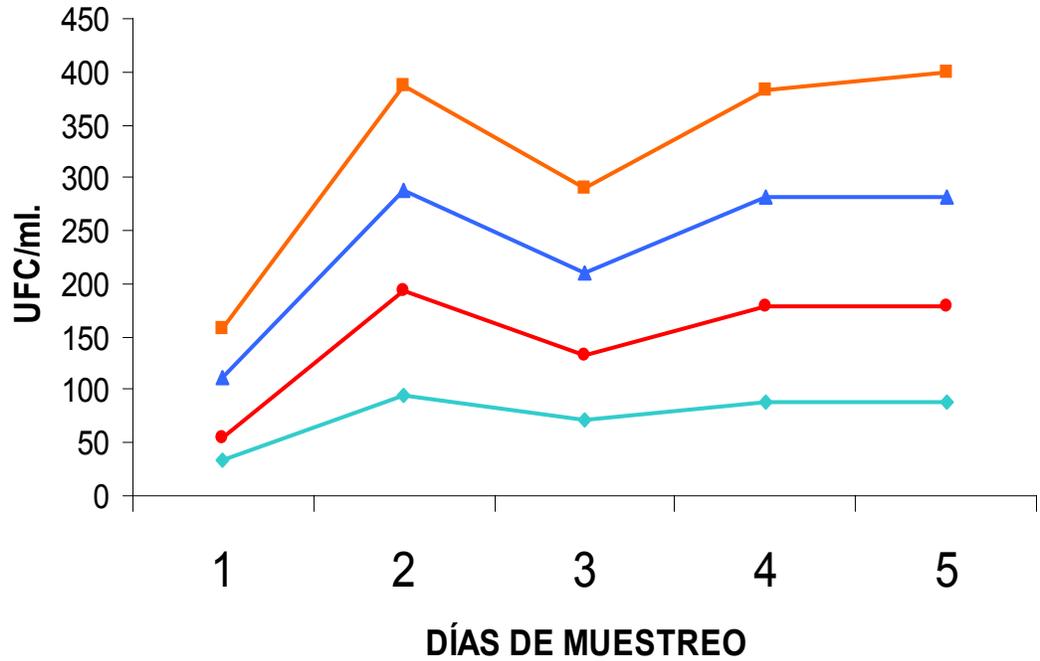
CÓDIGO	FECHA	MUESTRA	MEDIO	DESCRIPCIÓN
1	3-Dic-04	Algas	TCBS Sin dilución	Circular, convexa, entera, amarilla
2	3-Dic-04	Algas	TCBS Sin dilución	Circular, convexa, entera, verde
3	3-Dic-04	Algas	Agar Marino Sin dilución	Circular, plana, entera, blanca
4	3-Dic-04	Algas	Agar Marino Sin dilución	Circular, convexa, entera, crema
5	3-Dic-04	Algas	Agar Marino Sin dilución	Puntiforme, plana, entera, blanca
6	3-Dic-04	Algas	Chapman 10 ⁻¹	Circular, convexa, entera, rosada
7	3-Dic-04	Algas	Chapman 10 ⁻¹	Puntiforme, plana, entera, blanca
8	3-Dic-04	Algas	Chapman 10 ⁻¹	Circular, convexa, entera, crema
9	8-Dic-04	Algas	TCBS	Circular, convexa, entera, amarilla
10	8-Dic-04	Algas	TCBS	Circular, convexa, entera, verde
11	8-Dic-04	Algas	Agar Marino	Circular, convexa, entera, crema
12	8-Dic-04	Algas	Chapman	Circular, convexa, entera, crema
13	13-Dic-04	Algas	TCBS	Circular, convexa, entera, amarilla
14	13-Dic-04	Algas	Agar	Puntiforme,

			Marino	plana, entera, blanca
15	13-Dic-04	Algas	Agar Marino	Circular, plana, entera, blanca
16	13-Dic-04	Algas	Chapman	Circular, convexa, entera, crema
17	18-Dic-04	Algas	TCBS	Circular, convexa, entera, verde centro oscuro
18	18-Dic-04	Algas	Agar Marino	Circular, plana, entera, blanca
19	18-Dic-04	Algas	Chapman 10 ⁻¹	Circular, convexa, entera, rosada
20	23-Dic-04	Algas	TCBS	Circular convexa, entera, amarilla anaranjada
21	23-Dic-04	Algas	Agar Marino	Puntiforme, plana, entera, blanca
22	23-Dic-04	Algas	Chapman 10 ⁻¹	Circular, convexa, entera, blanca

Continuación Anexo 1.

Anexo 2. Laboratorio Aqualab

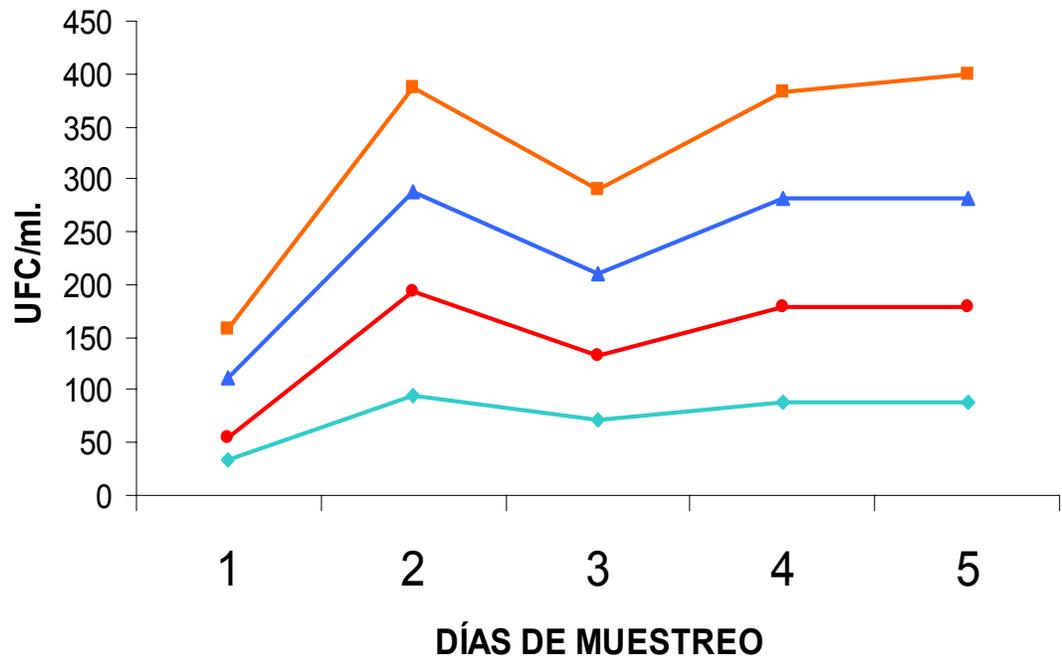
UFC/ml. por tanque, muestras de la superficie



■	Tanque 23: $50 \times 10^1 - 11 \times 10^3 - 60 \times 10^1 - 69 \times 10^1 - 13 \times 10^2$
■	Tanque 24: $42 \times 10^1 - 17 \times 10^2 - 45 \times 10^1 - 54 \times 10^1 - 12 \times 10^2$
■	Tanque 29: $42 \times 10^1 - 12 \times 10^2 - 69 \times 10^1 - 64 \times 10^1 - 87 \times 10^1$
■	Tanque 30: $68 \times 10^1 - 12 \times 10^2 - 50 \times 10^1 - 58 \times 10^1 - 60 \times 10^1 - 91 \times$

Anexo 3. Laboratorio Aqualab

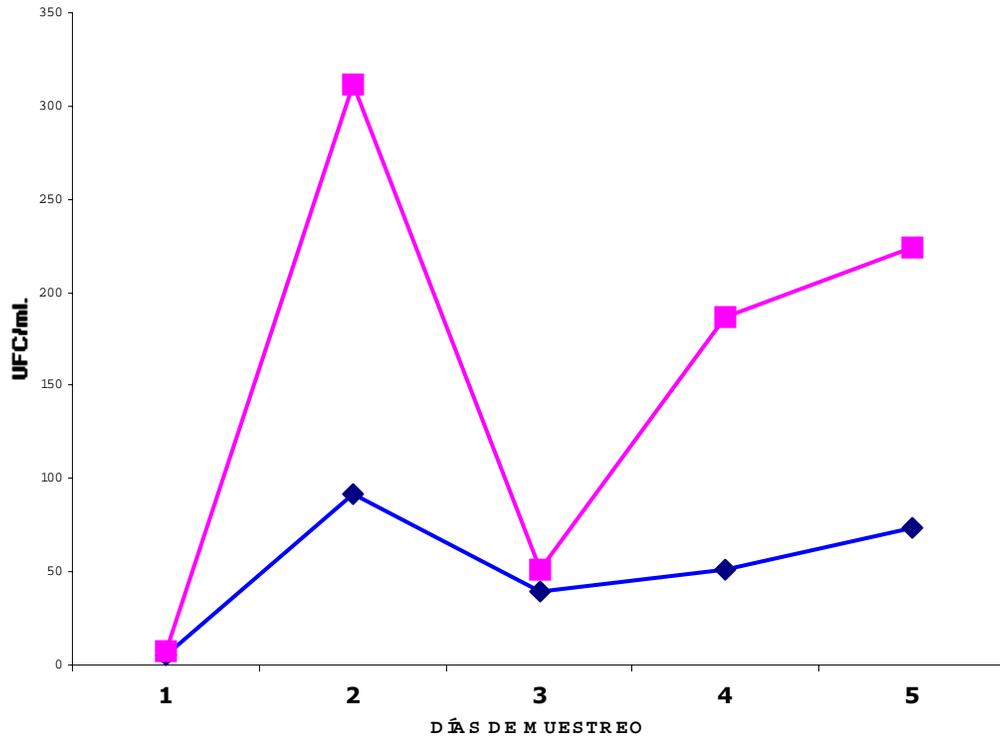
UFC/ml. por tanque, muestras del fondo



■	Tanque 23: $34 \times 10^2 - 95 \times 10^1 - 71 \times 10^1 - 89 \times 10^1$
■	Tanque 24: $21 \times 10^1 - 98 \times 10^1 - 62 \times 10^1 - 89 \times 10^1$
■	Tanque 29: $57 \times 10^1 - 95 \times 10^1 - 78 \times 10^1 - 10 \times 10^2$
■	Tanque 30: $45 \times 10^1 - 98 \times 10^1 - 79 \times 10^1 - 10 \times 10^1 - 11 \times 10^2$

Anexo 4. Laboratorio John William

UFC/ml. por tanque, muestras de la superficie

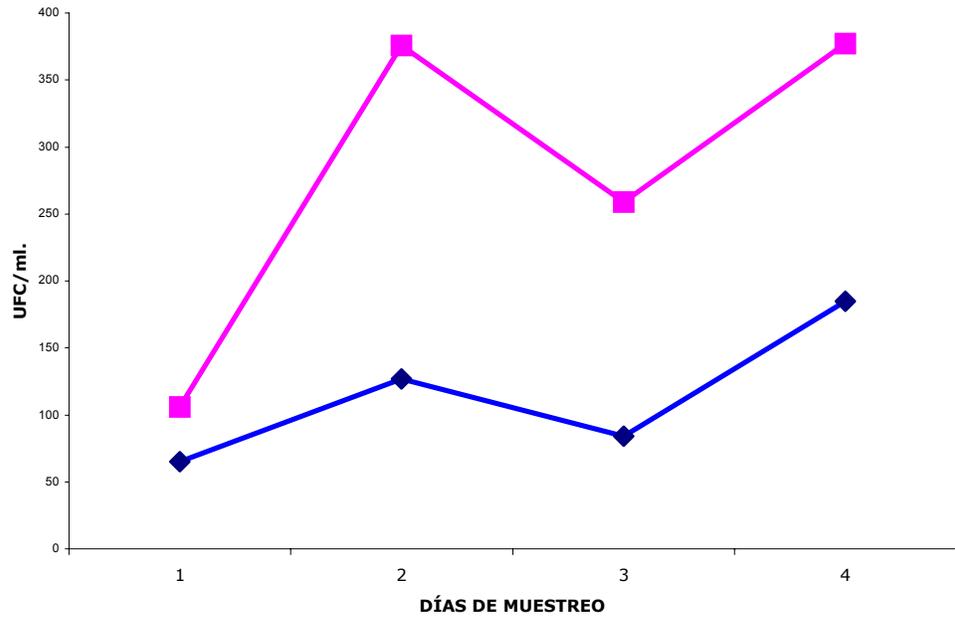


■ Tanque 7: $5 \times 10^1 - 92 \times 10^1 - 40 \times 10^1 - 51 \times 10^1 - 74 \times 10^1$

■ Tanque 21: $3 \times 10^1 - 22 \times 10^2 - 11 \times 10^1 - 14 \times 10^2 - 15 \times 10^2$

Anexo 5. Laboratorio John William

UFC/ml. por tanque, muestras del fondo



■ Tanque 7: $65 \times 10^1 - 13 \times 10^2 - 84 \times 10^1 - 19 \times 10^2$

■ Tanque 21: $41 \times 10^1 - 25 \times 10^2 - 84 \times 10^1 - 19 \times 10^2$