

Evaluación de la carga de bacterias heterótrofas y vibrios en un sistema de cultivo integrado camarón-molusco-macroalga

Evaluation of the heterotrophic bacteria and vibrio load in an integrated shrimp-mollusc-macroalgae culture system

Anselmo Miranda-Baeza¹, César Orozco-Medina², Martha Elisa Rivas-Vega¹ y Antonio Luna-González³

¹Universidad Estatal de Sonora, Periférico Sur 810, Navojoa, Sonora, 85875. México

²Instituto Tecnológico de Guaymas, Km 4 carretera al Varadero Nacional S/N, sector Las Playitas, Guaymas, Sonora, 85480. México

³Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa, Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, Col. Centro, Guasave, Sinaloa, 81000. México
e-mail: orozcomedinacesar@gmail.com

Miranda-Baeza A., C. Orozco-Medina, M. E. Rivas-Vega y A. Luna-González. 2015. Evaluación de la carga de bacterias heterótrofas y vibrios en un sistema de cultivo integrado camarón-molusco-macroalga. *Hidrobiológica* 25 (2): 311-314.

RESUMEN

Se evaluó la carga de bacterias heterótrofas y *Vibrio* spp. en un cultivo integrado con *Litopenaeus vannamei* Boone 1931, *Mytella guyanensis* Lamarck 1819 y *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss, llevado a cabo durante 45 días. La concentración de bacterias heterótrofas fue estadísticamente similar al inicio y final de los cultivos integrados y no integrados (control); con un intervalo de 10^6 a 10^7 UFC/mL. Sin embargo, las cuentas totales de *Vibrio* spp. fueron significativamente más altas en los cultivos no integrados, al final de los mismos con 8.8×10^4 UFC/mL. Los sistemas de cultivo integrados presentaron la capacidad de mantener niveles bajos de carga bacteriana heterótrofa sin detrimento en la supervivencia de *L. vannamei*, además de reducir los niveles de *vibrio*.

Palabras clave: Bacterias heterótrofas, *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio*.

ABSTRACT

The load of heterotrophic bacteria and *Vibrio* spp. were evaluated in an integrated culture system of *Litopenaeus vannamei* Boone 1931, *Mytella guyanensis* Lamarck 1819 y *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss, lasting for 45 days. The concentrations of heterotrophic bacteria were statistically similar at the beginning and at the end of the integrated culture and non-integrated culture (control), within a range from 10^6 to 10^7 CFU/mL; however, at the end, the total counts of vibrios in non-integrated culture were significantly higher than in an integrated culture, up to 8.8×10^4 UFC/mL. The integrated culture systems showed the capability to maintain low levels of heterotrophic bacteria without detriment of the shrimp survival, reducing additionally the load of *Vibrio* spp.

Key words: Heterotrophic bacteria, *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio*.

En los sistemas de producción acuícola con recirculación, las bacterias heterótrofas tienen funciones relevantes en el reciclaje del carbono y el nitrógeno (presentes en la materia orgánica) en la biodisponibilidad de nutrientes, el mejoramiento de la calidad del agua, el control de enfermedades y la nutrición de los organismos cultivados (Beardsley *et al.*, 2011). Los sistemas integrados con recirculación de agua, a diferencia de los sistemas monocultivo, presentan estrategias multi-tróficas que favorecen una mayor eficiencia en el aprovechamiento de los compuestos orgánicos e inorgánicos que circulan dentro del sistema (MacDonald *et al.*, 2011). En éste estudio, el cultivo de camarón en sistema integrado, se utilizó como bio-remediadores, el molusco mitílido *Mytella guyanensis*, localizada en costas del pacifico mexicano (Keen, 1958), especie que presenta alta tasa de filtración de materia orgánica (Martínez-Córdova & Martínez-Porchas, 2006); así como también, la macroalga *Gracilaria vermiculophylla*, por su eficiente capacidad en la remoción de compuestos nitrogenados y orto-fosfatos (Abreu *et al.*, 2011). El incremento descontrolado de microorganismos, incentivado por la presencia de materia orgánica en los sistemas de cultivo, puede contribuir al estrés y afectar a los organismos cultivados (Drennan II *et al.*, 2006). Por otro lado, las bacterias del género *Vibrio* son comunes en los ambientes acuícolas y algunas especies han sido consideradas responsables del desarrollo de enfermedades infecciosas del camarón (Regunathan & Wesley, 2004). En el presente estudio se cuantificó la concentración de bacterias heterótrofas cultivables y las pertenecientes al género *Vibrio* del agua de un sistema de cultivo integrado de camarón-molusco-macroalgas, con el fin de conocer la concentración que alcanzan estos grupos bacterianos en el sistema.

Los camarones empleados para el experimento ($150/m^3$, con un peso de 7.9 ± 0.1 g) se cultivaron durante 45 días en tinas con 200 L de agua de mar filtrada ($100 \mu m$), estas tinas estuvieron conectadas en circulación a módulos de 10 L con un cultivo de mejillón *Mytella guyanensis* (0.8 organismos/L, con peso de 110 ± 2.8 g),

y éstos a su vez conectadas a módulos de 20 L con un cultivo de la macroalga *Gracilaria vermiculophylla* (40 g/L), los tres cultivos constituyen la Unidad Experimental de un sistema de cultivo integrado. Los cultivos de camarón sin módulos adicionales fueron evaluados como tratamiento control. Las condiciones físicas y químicas de todos los cultivos fueron: recirculación del agua a 100 L/h, salinidad de 36.64 ± 1.19, temperatura de 28.95 ± 2.49 °C y concentraciones de oxígeno disuelto de 5.1 ± 0.25 mg/L. En ambos sistemas integrados y no integrados, los camarones se alimentaron en proporción a su peso con alimento comercial (Purina^{MR}, 40 % de proteína).

El análisis de carga bacteriana se realizó con dos muestras y cuatro réplicas tomadas de la columna de agua de tres unidades experimentales (UE) de los sistemas integrados: SI1, SI2 y SI3 además de dos unidades de sistemas no integrados o de control (NI1 y NI2). Las muestras se colectaron en tubos previamente estériles y fueron diluidas en agua marina estéril. Diluciones hasta 10⁻⁷ fueron sembradas por dispersión en placas Petri con agar marino 2216 (DIFCO^{MR}) para la recuperación de bacterias marinas heterótrofas y en agar tiosulfato-citrato-bilisacarosa (TCBS) (DIFCO^{MR}) con 1.5 % de NaCl, selectivo para bacterias presuntivas del género *Vibrio*; todos los cultivos fueron incubados a 30 °C durante 24 h. Las colonias bacterianas desarrolladas en agar marino 2216 y TCBS fueron contadas y los datos analizados estadísticamente por comparación de distribución no paramétrico de Kruskal-Wallis con el programa Estadística^{MR} Versión 5.1 (StatSoft, Inc.). Las colonias desarrolladas en medio TCBS fueron contadas diferencialmente de tal forma que se consideró su color y fueron reportadas las colonias amarillas (fermentadoras de sacarosa como *V. cholerae*), separadas de las verdes (no fermentadoras de sacarosa) que incluyen a *V. parahaemolyticus* (Kobayashi *et al.*, 1963), entre otras especies patógenas. Aunque, éstas características fenotípicas son insuficientes para la identificación a nivel de especie (Ansaruzzaman *et al.*, 1995; Hara-Kudo *et al.*, 2001).

Las UE en SI y NI, iniciaron con concentraciones de bacterias heterótrofas estadísticamente similares (con valor de probabilidad $P \geq 0.05$), en concentraciones entre 10⁶ y 10⁷ UFC/mL, sin embargo, a los 45 días de cultivo, en los sistemas NI se observaron cargas significativamente mayores de bacterias heterótrofas (Tabla 1). Al inicio de los cultivos se observaron solo colonias amarillas de *Vibrio* spp. y las concentraciones bacterianas fueron significativamente más altas (10⁴ UFC/mL) en los NI (Tabla 1). Al final del tiempo de cultivo la UE del NI2 presentó la mayor concentración de colonias de *Vibrio* totales ($P \leq 0.05$) con 8.8 × 10⁴ UFC/mL. No obstante, no se observaron diferencias significativas en las UFC de *Vibrio* con colonias verdes entre los SI y NI (Tabla 1). La concentración alta de *Vibrio* en sistemas de cultivo acuícolas, generalmente se relaciona con problemas de mortalidad de los organismos cultivados (Regunathan & Wesley, 2004), y puede estar asociada a las operaciones de manejo en los tanques de cultivo (López-Torres & Lizárraga-Partida, 2001).

Las características fenotípicas de colonias bacterianas en medios de cultivo selectivo, son consideradas comúnmente para evaluar la presencia de patógenos, en los laboratorios de granjas camaronícolas, así como en la investigación como método de detección específica (Hara-Kudo *et al.*, 2001), aunque hay otros métodos más precisos. No obstante, de entre los tratamientos evaluados, la presencia del número mayor de colonias verdes no estuvo relacionada con los resultados de supervivencia ni del peso final de los camarones ya que éstos fueron estadísticamente similares (Miranda-Baeza *et al.*, 2011). Con el siste-

ma de cultivo integrado desarrollado en el presente estudio, fue posible mantener estable la carga bacteriana a niveles observados comúnmente en cultivos con sistemas extensivos de camarón, de 10⁵ a 10⁶ UFC/mL (Abraham & Sasmal, 2009); además de presentar una carga menor de *Vibrio* spp., comparado con cultivos no integrados de *L. vannamei*. Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que los cultivos integrados, pueden tener beneficios en el control de bacterias del tipo vibrio en los sistemas con recirculación del agua.

REFERENCIAS

- ABRAHAM, T. J. & D. SASMAL. 2009. Influence of salinity and management practices on the shrimp (*Penaeus monodon*) production and bacterial counts of modified extensive brackish water ponds. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Science* 9: 91-98.
- ABREU, M. H., R. PEREIRA, C. YARISH, A. H. BUSCHMANN & I. SOUSA-PINTO. 2011. IMTA with *Gracilaria vermiculophylla*: Productivity and nutrient removal performance of the seaweed in a land-based pilot scale system. *Aquaculture* 312 (1-4): 77-87.
- ANSARUZZAMAN, M., M. RAHMAN, A. K. M. G. KIBRIYA, N. A. BHUIYAN, M. S. ISLAM & M. J. ALBERT. 1995. Isolation of sucrose late-fermenting and non-fermenting variants of *Vibrio cholerae* O139 Bengal: implications for diagnosis of cholera. *Journal of Clinical Microbiology* 33 (5): 1339-1340.
- BEARDSLEY, C., S. MOSS, F. MALFATTI & F. AZAM. 2011. Quantitative role of shrimp fecal bacteria in organic matter fluxes in a recirculating shrimp aquaculture system. *FEMS Microbiology Ecology* 77 (1): 134-145.
- DRENNAN II, D. G., K.C. HOSLER, M. FRANCIS, D. WEAVER, E. ANESHANSLEY, G. BECKMAN, C. H. JOHNSON & C. M. CRISTINA. 2006. Standardized evaluation and rating of biofilters II. Manufacturer's and user's perspective. *Aquacultural Engineering* 34 (3): 403-416.
- HARA-KUDO, Y., T. NISHINA, H. NAKAGAWA, H. KONUMA, J. HASEGAWA & S. KUMAGAI. 2001. Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (12): 5819-5823.
- KEEN, A. M. 1958. *Sea shells of Tropical West America: Marine Mollusks from Baja California to Peru*. 2th ed. Stanford University Press, Stanford California, 63 p.
- KOBAYASHI, T., S. ENOMOTO, R. SAKAZAKI, & S. KUWAHARA. 1963. A new selective medium for pathogenic vibrios, TCBS (modified Nakanishi's agar). *Japanese Journal of Bacteriology* 18: 387-392.
- LÓPEZ-TORRES, M. A. & M. L. LIZÁRRAGA-PARTIDA. 2001. Bacteria isolated on TCBS media associated with hatched *Artemia* cysts of commercial brands. *Aquaculture* 194: 11-20.
- MACDONALD, B. A., S. M. C. ROBINSON & K. A. BARRINGTON. 2011. Feeding activity of mussels (*Mytilus edulis*) held in the field at an integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) site (*Salmo salar*) and exposed to fish food in the laboratory. *Aquaculture* 314 (4): 244-251.
- MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L.R. & M. MARTÍNEZ-PORCHAS. 2006. Polyculture of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, giant oyster, *Crassostrea gigas*, and black clam, *Chione fluctifraga* in ponds in Sonora, Mexico. *Aquaculture* 258 (1): 321-326.

Tabla 1. Cuentas medianas de UFC/mL de bacterias heterótrofas cultivables y de *Vibrio* spp. cuantificadas en cultivos de camarón con recirculación cerrada durante 45 días. Los sistemas de cultivo evaluados fueron, un Sistema Integrado (SI) con 3 réplicas (SI1, SI2 Y SI3); Cultivo de camarón con módulos de cultivo del mejillón *Mytella guyanensis* y la macroalga *Gracilaria vermiculophylla*; y un Sistema No Integrado con 2 réplicas (NI1 y NI2); Cultivo de camarón sin módulos de cultivo adicionales.

Sistema	Inicial			Final			Vibrio		
	Heterótrofas	<i>Vibrio</i> totales	<i>Vibrio</i> Amarillas	Heterótrofas	<i>Vibrio</i> totales	<i>Vibrio</i> Amarillas	<i>Vibrio</i> totales	<i>Vibrio</i> Amarillas	<i>Vibrio</i> Verdes
SI1	6.00×10^6 (3.2×10^7) ^a	7.15×10^3 (1.6×10^3) ^b	5.75×10^3 (2.1×10^3) ^b	2.02×10^6 (1.6×10^6) ^a	5.20×10^3 (3.3×10^3) ^{ab}	5.15×10^3 (3.4×10^3) ^a	5.00×10^1 (7.5×10^1) ^a		
SI2	2.60×10^6 (6.7×10^6) ^a	4.00×10^2 (3.3×10^2) ^a	4.00×10^2 (3.3×10^2) ^a	2.00×10^6 (1.7×10^6) ^a	4.15×10^3 (1.4×10^3) ^{ab}	2.85×10^3 (1.7×10^3) ^a	3.00×10^2 (6.8×10^2) ^a		
SI3	1.32×10^7 (1.1×10^7) ^a	1.28×10^4 (1.3×10^4) ^b	1.28×10^4 (1.3×10^4) ^b	3.45×10^6 (2.7×10^6) ^a	3.00×10^4 (2.5×10^4) ^b	3.00×10^4 (2.5×10^4) ^{ab}	0.00	0.00	(0.0) ^a
NI1	1.60×10^7 (3.5×10^7) ^a	5.30×10^4 (1.9×10^4) ^c	5.30×10^4 (1.9×10^4) ^c	6.85×10^6 (2.8×10^6) ^{ab}	1.24×10^4 (4.9×10^3) ^b	8.00×10^3 (4.1×10^3) ^{ab}	1.55×10^2 (2.1×10^3) ^a		
NI2	3.06×10^7 (1.1×10^8) ^a	4.20×10^4 (9.9×10^4) ^c	4.20×10^4 (9.9×10^4) ^c	1.95×10^7 (1.4×10^7) ^b	8.80×10^4 (2.9×10^4) ^c	3.99×10^5 (2.9×10^5) ^c	2.50×10^3 (3.3×10^3) ^a		

Letras diferentes indican diferencia significativa (con valor de probabilidad de error tipo I, $p \leq 0.05$; donde $a < b < c$) entre las réplicas de ambos sistemas de cultivo, dentro de cada grupo bacteriano. Análisis de distribución de Kruskal-Wallis, $n=4$. Valores entre paréntesis es la desviación absoluta de la mediana.

MIRANDA-BAEZA, A., M. E. RIVAS-VEGA, J. LIZÁRRAGA-ARMENTA, L. R. MARTÍNEZ-CÓRDOVA, J. A. LÓPEZ-ELÍAS, S. E. AYALA-YOCUPICIO, I. SANDOVAL-MUY & A. SÁNCHEZ-ROMERO. 2011. Acuicultura multitrófica, una opción para el uso integral de los recursos naturales. *En*: Cruz-Suarez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M. G., Villarreal-Cavazos, D., Gambo-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds.). Avances en nutrición Acuícola XI. Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23 - 25 de Noviembre, 2011. San Nicolás de los Garza, Nuevo León. México.

Universidad Autónoma de Nuevo León. ISBN en trámite. Monterrey, Nuevo León, México, pp. 117-142.

REGUNATHAN, C. & S. G. WESLEY. 2004. Control the *Vibrio* spp. in shrimp hatcheries using the green algae *Tetraselmis suecica*. *Asian Fisheries Science* 17 (2): 147-158.

Recibido: 12 de julio 2014.

Aceptado: 25 de agosto de 2015.