

## **Microbiological dynamics of a *Litopenaeus vannamei* hatchery in Ecuador.**

Intriago, P<sup>2,3</sup>., Espinoza, J<sup>1</sup>., Medina, A<sup>1</sup>., Altamirano, L<sup>1</sup>., Enriquez, X<sup>1</sup>., Sanchez, A<sup>1</sup>., Navarrete, A<sup>1</sup>., Alvarez, E<sup>1</sup> and Forestieri, J<sup>1</sup>. 2018.

<sup>1</sup>Empagran. S.A. Empacadora Grupo Gran Mar S.A. Semacua División laboratorios. La Diablica, Anconcito-Península de Santa Elena- Ecuador.

<sup>2</sup>Empagran. S.A. Empacadora Grupo Gran Mar S.A. ABA División Balanceado. Km 14 y medio vía ala Costa. Guayaquil, Guayas- - Ecuador.

<sup>3</sup> South Florida Farming Corp. 13811 Old Sheridan St. Southwest Ranches, FL 33330. USA.

## Importancia del estudio de bacterias y virus (VLP) en acuicultura.

1. Relación entre biomasa bacteriana, materia orgánica y DBO. %de patógenos.
2. Los virus acuáticos son las entidades biológicas más abundantes en el planeta; reciclaje de nutrientes, transferencias de genes, regulan la abundancia de bacterias, y determinan la estructura de las comunidades microbianas. Dependiendo del ecosistema su concentración fluctúa entre  $10^4$  a  $10^8$  VLP/mL, con un promedio de  $10^7$  VLP/mL.
3. Pueden existir como libres (líclicos) o profagos (lisogénicos).
4. En animales sanos, solo una fracción minoritaria de los profagos están activados y se encuentran como fagos libres. En disbiosis (flora desbalanceada), los fagos líclicos libres y se encuentran correlacionados con el brote de enfermedad, salud = un balance entre fagos líclicos y lisogénicos.
5. Al mismo tiempo existe evidencia que los fagos afectan sus huéspedes bacterianos infectando las especies más adaptadas, “kill the winner”, así manteniendo una diversidad taxonómica.
6. Si esta teoría es correcta también afectaría la suplementación de probióticos. El uso de probióticos SFF Probiotic Eq Plus se probó y demostró sus cualidades de “competencia exclusiva”, inhibir o desplazar patógenos.

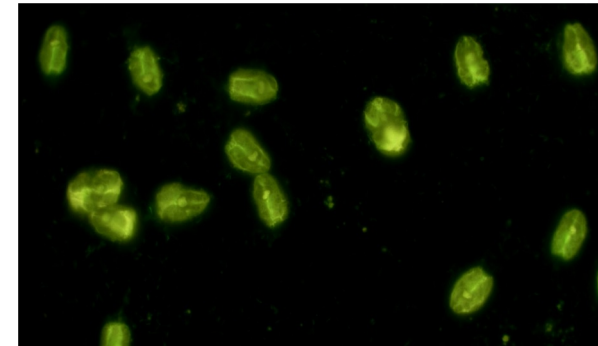
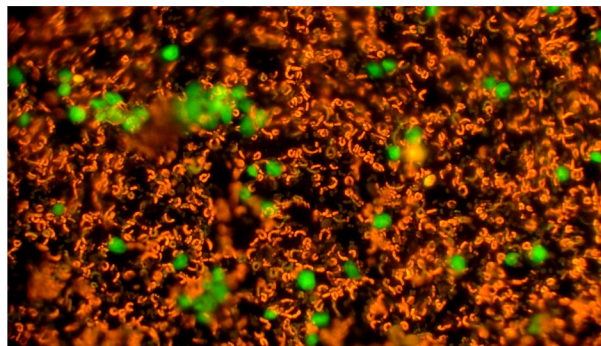
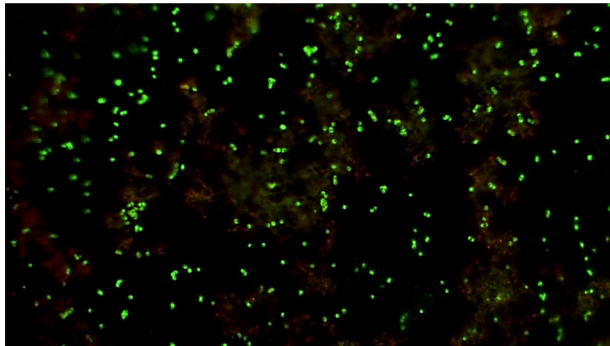
## **Métodos para cuantificación y detección microbiana**

1. **Cultivo** : Usando placas de agar (Medio de cultivo + condiciones de cultivo "temperatura, aeróbico, o anaeróbico, tipo de siembra, entre otros").



2. **Molecular**: Métodos moleculares o basados en los ácidos nucleicos funcionan en base a la detección del material genético ADN o ARN del microorganismo.

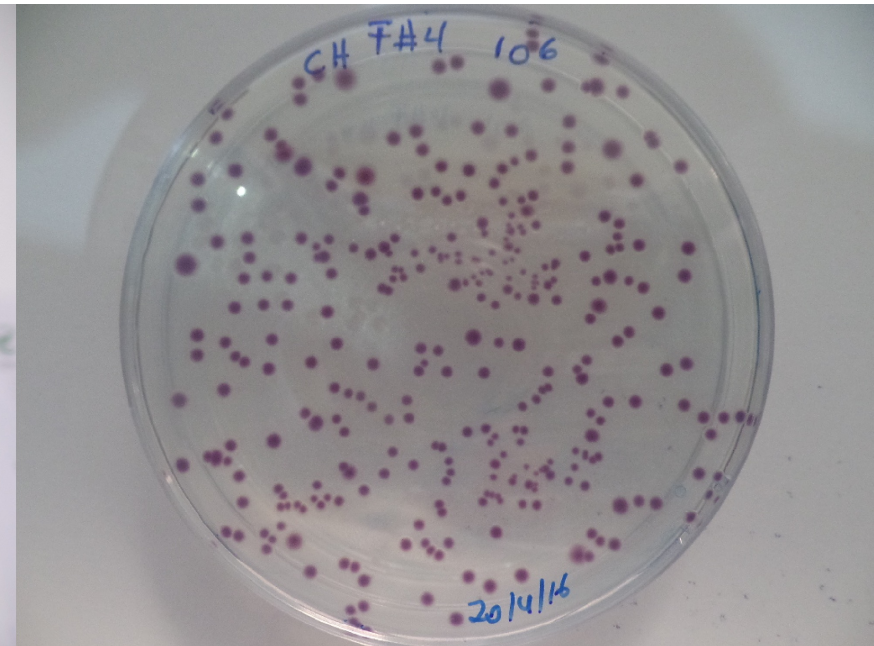
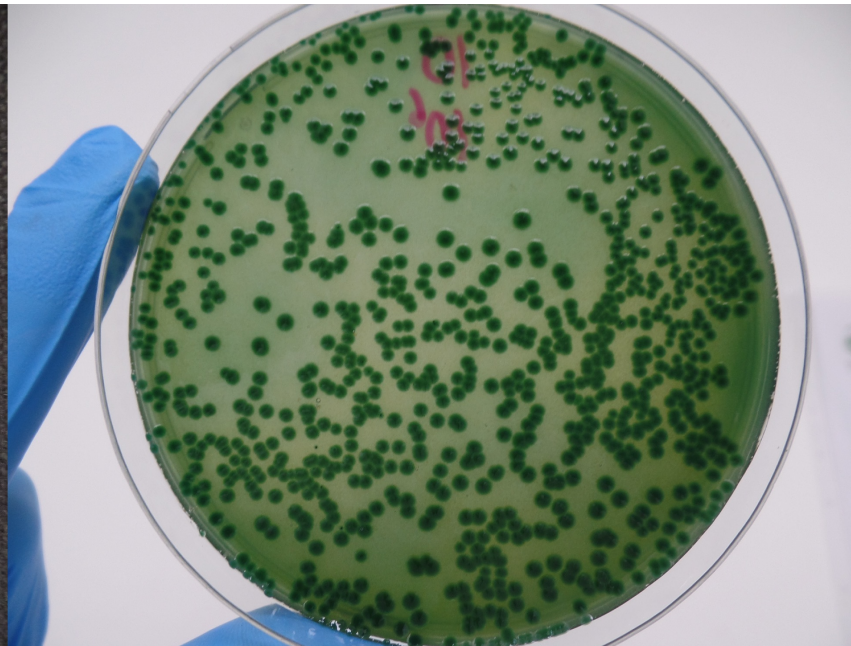
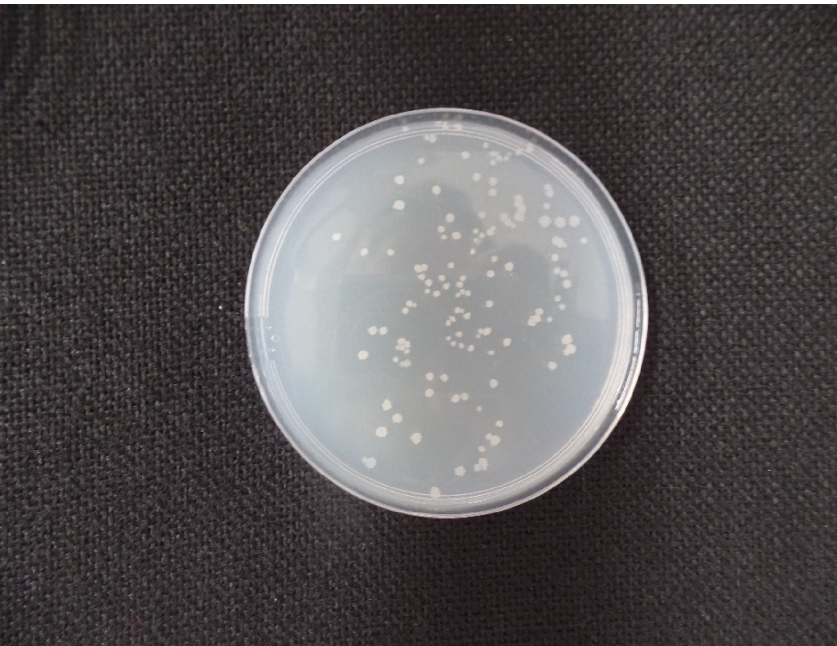
3. **Microscópico**. Este método se conoce también como conteo directo por que involucra el uso de microscopia de epifluorescencia.



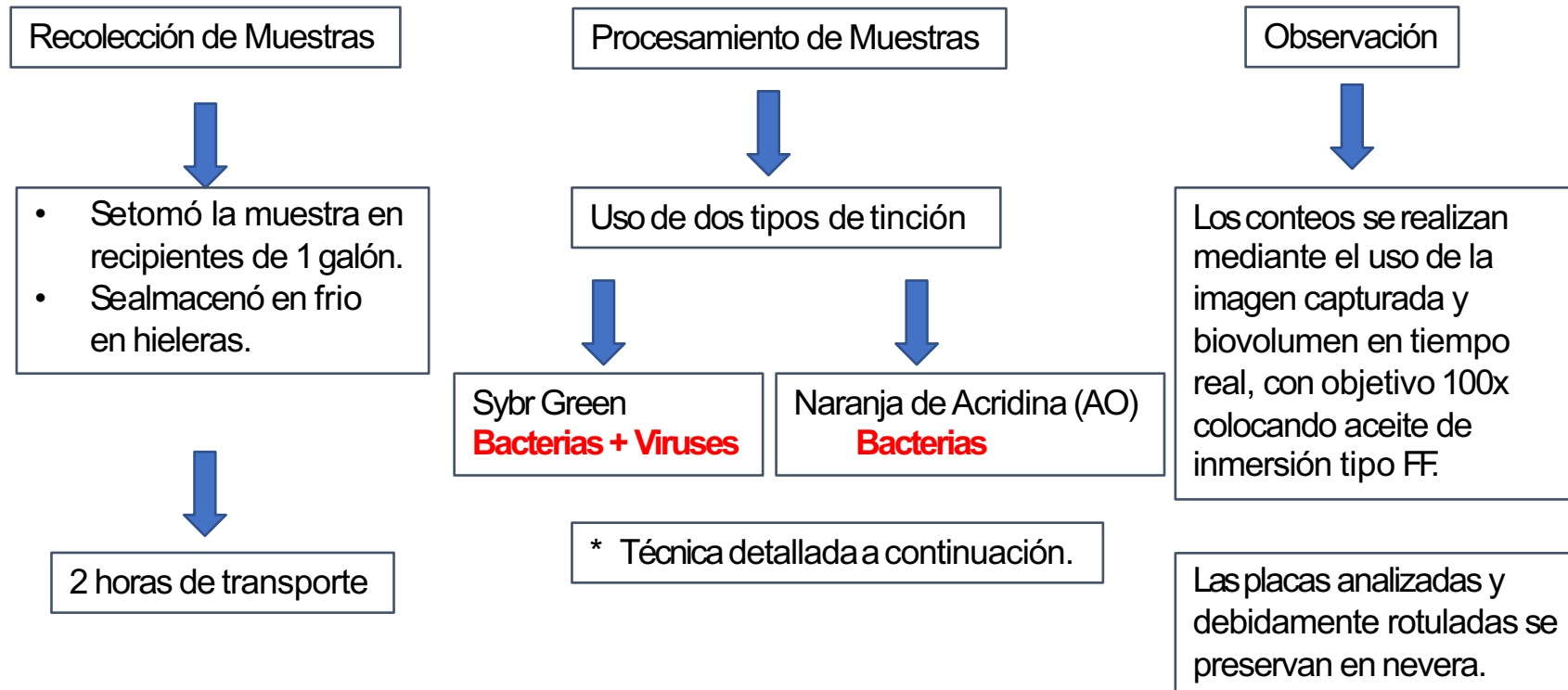
4. **Citometría de flujo "Flow cytometry"**: Es una tecnología donde una variedad de mediciones se pueden hacer en partículas, bacterias y objetos en suspensión en un líquido.

# Placas de Cultivo

## TSA, TCBSy Chromagar



# Epifluorescencia

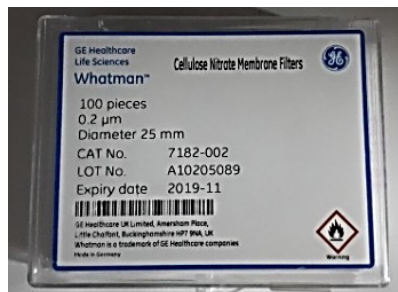




Microscopio de Epifluorescencia  
Marca Bioimager /BUM500FL.



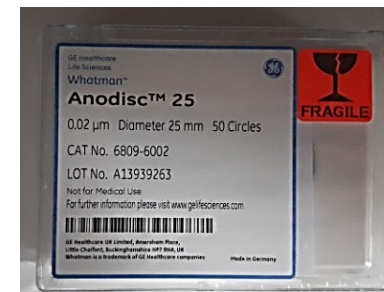
Cámara Bioimager BRC-6012 (RGB).



Filtro Nitrato de celulosa  
0.2 µm/25 mm

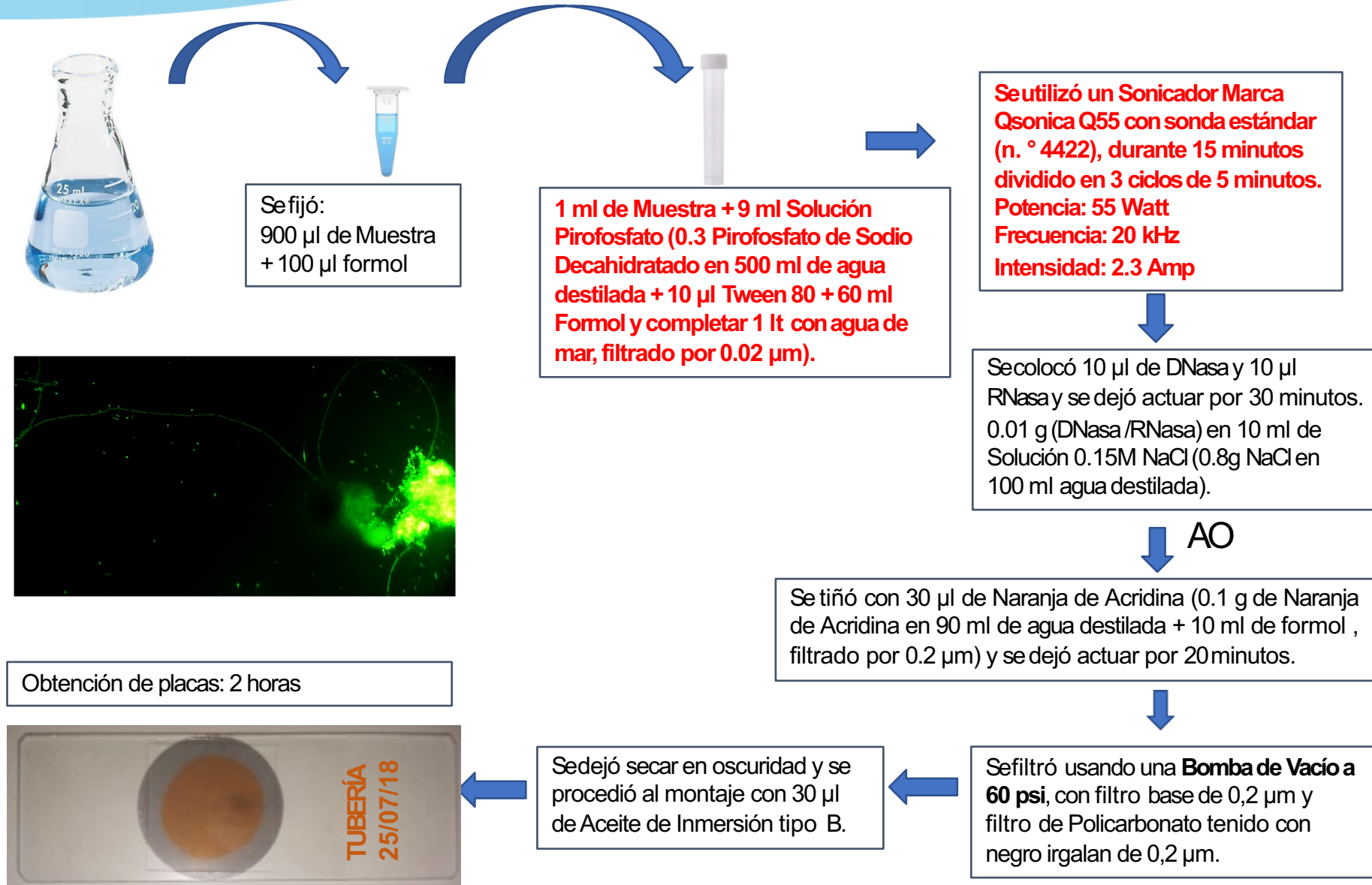


Filtro de Policarbonato  
0.2 µm/25 mm

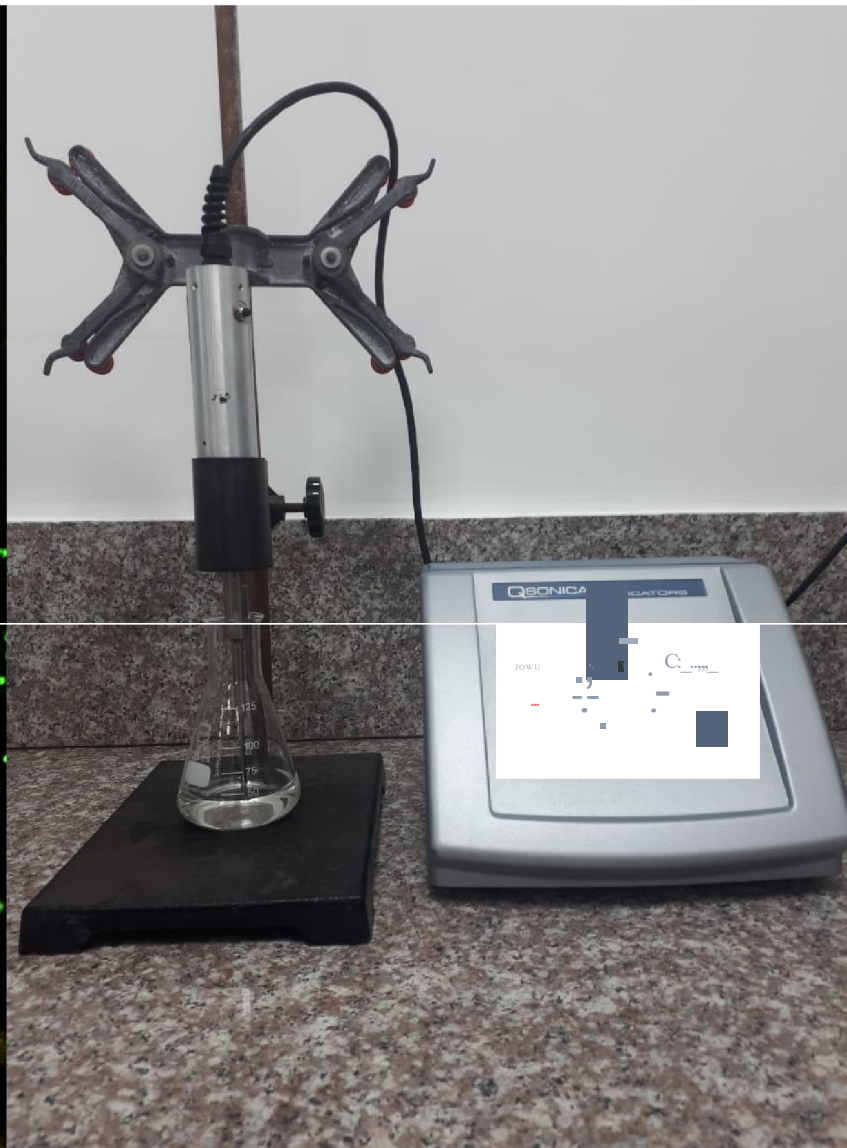
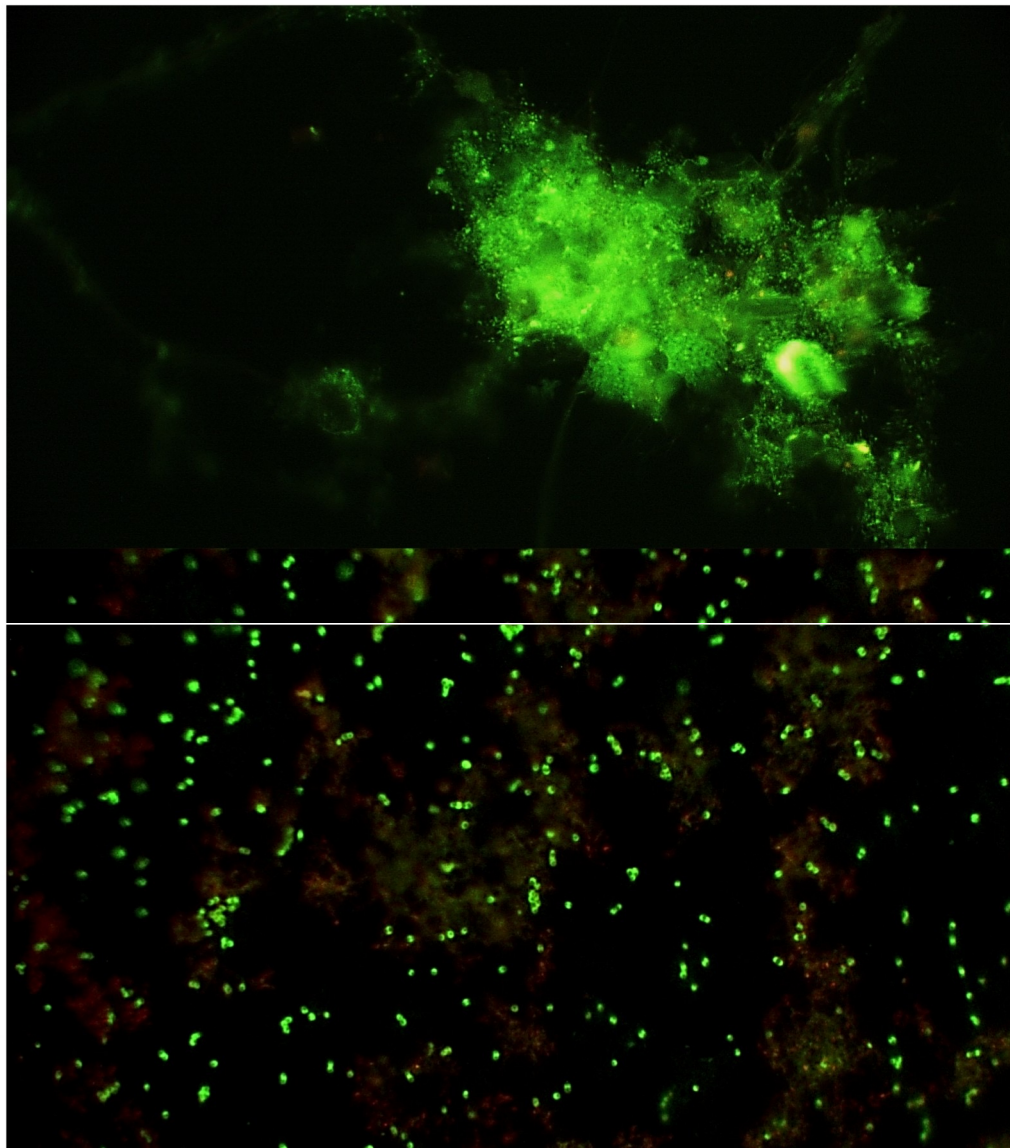


Filtro de Fibra de Vidrio  
0.02 µm/25 mm

Hobbie et al., 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. App. Environm. Micr. 33: 1225-1228.

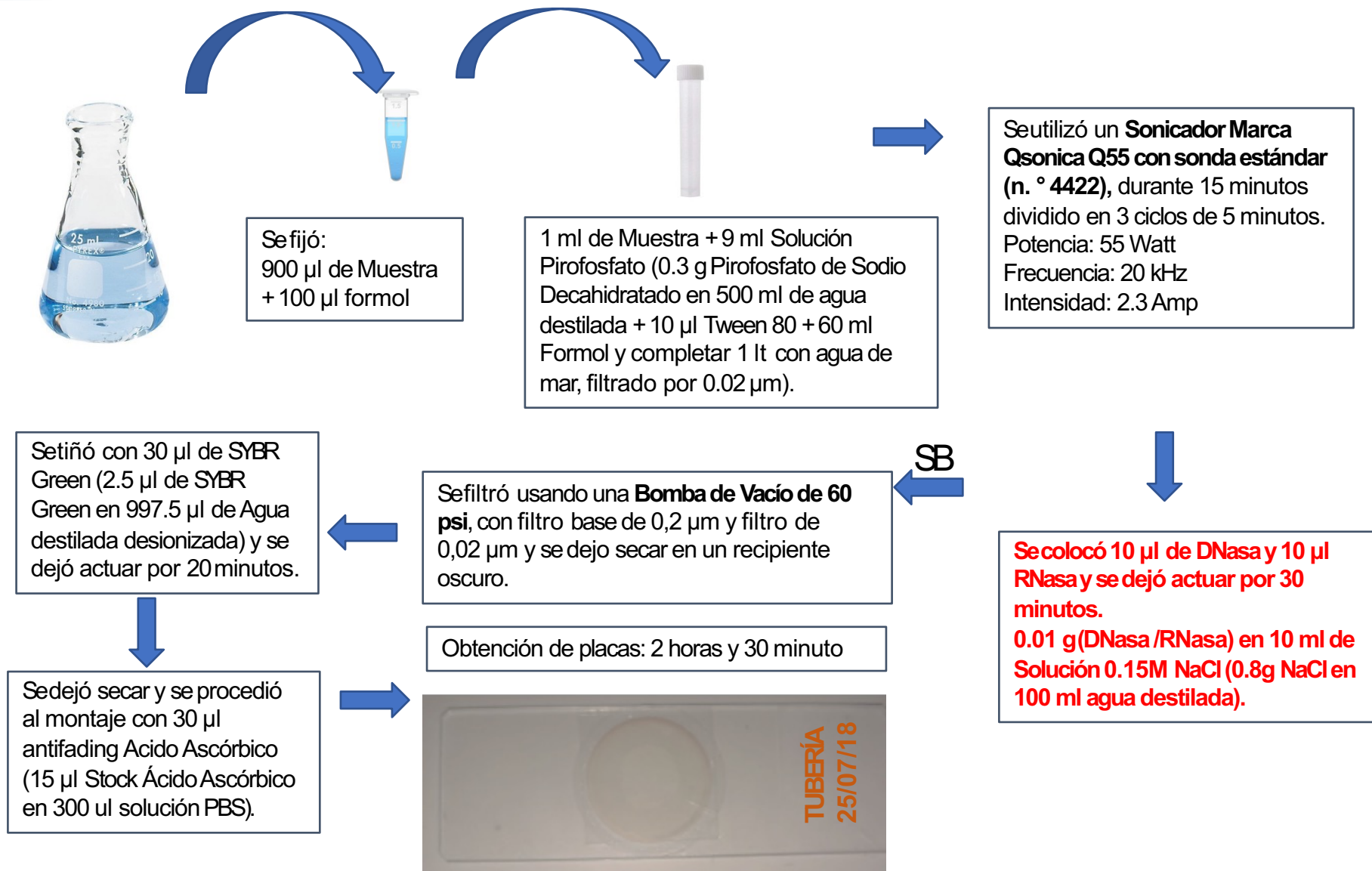


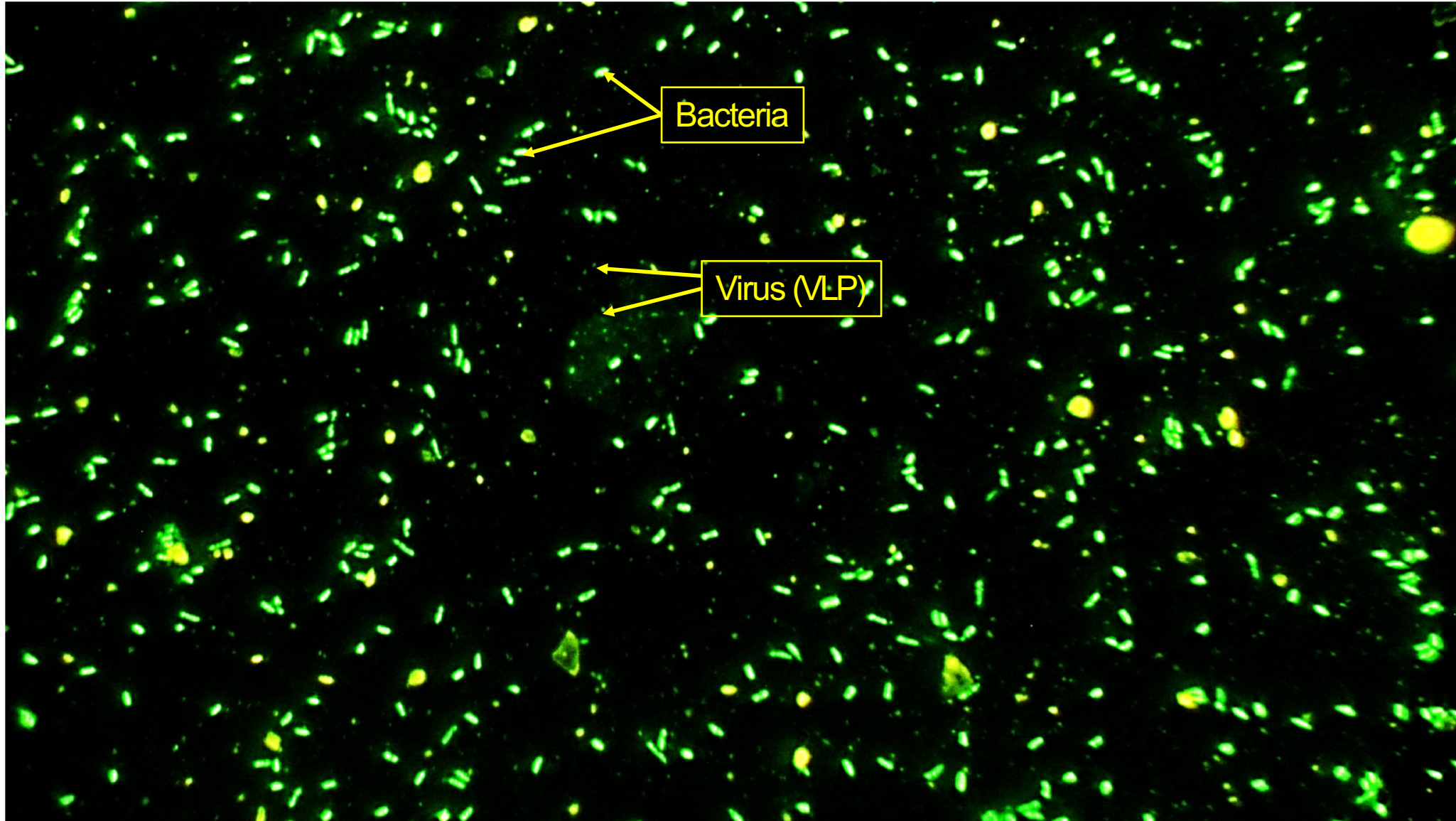




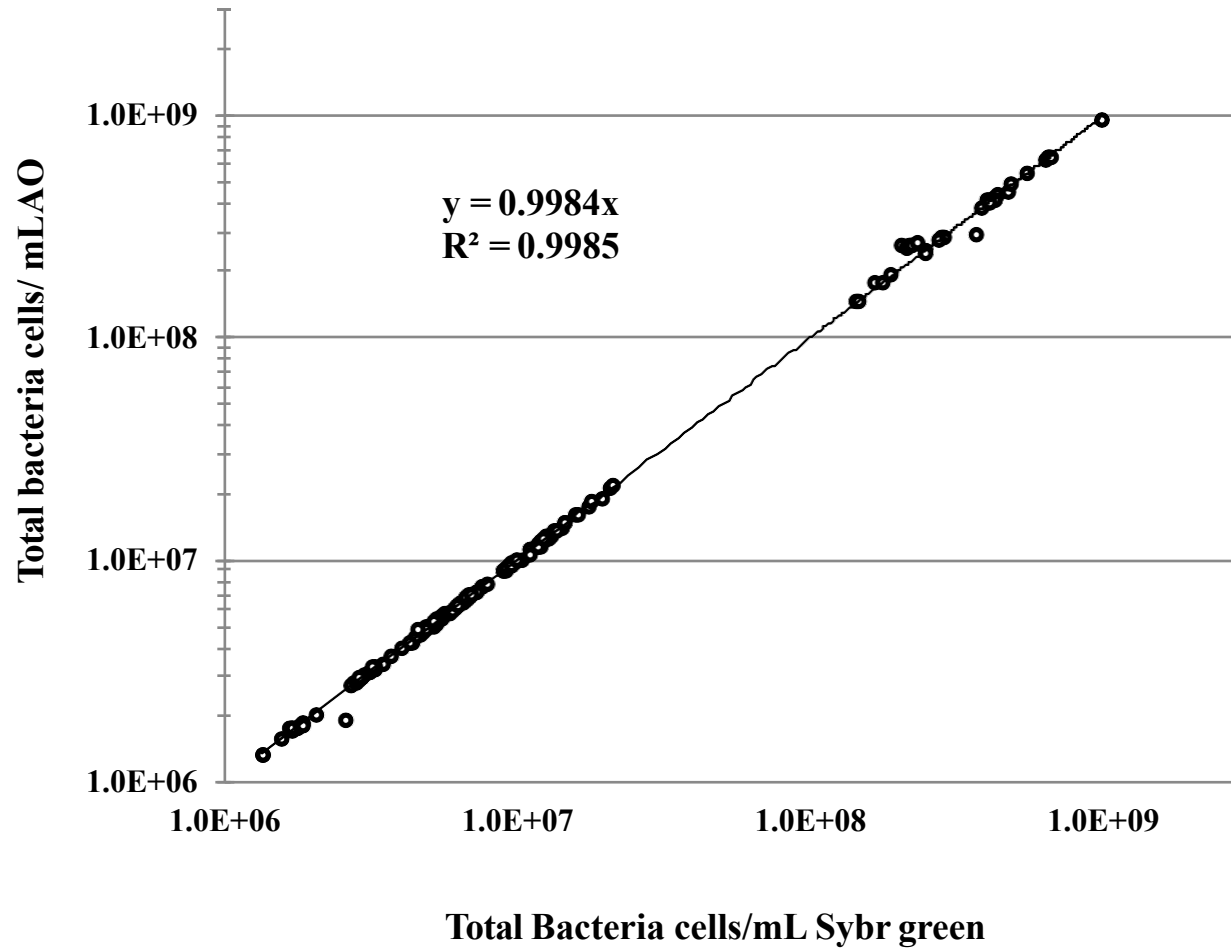
## Epifluorescencia (Sybr Green) bacterias + Viruses

Noble and Fuhrman. 1998. Use of Sybr green I for rapid epifluorescence count of marine viruses and Bacteria. Aquat. Micro. Ecol. 14:113-118.

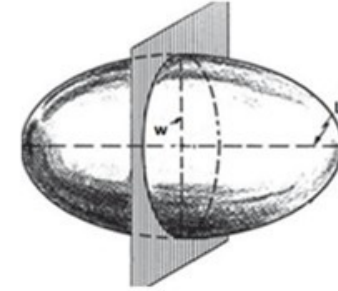




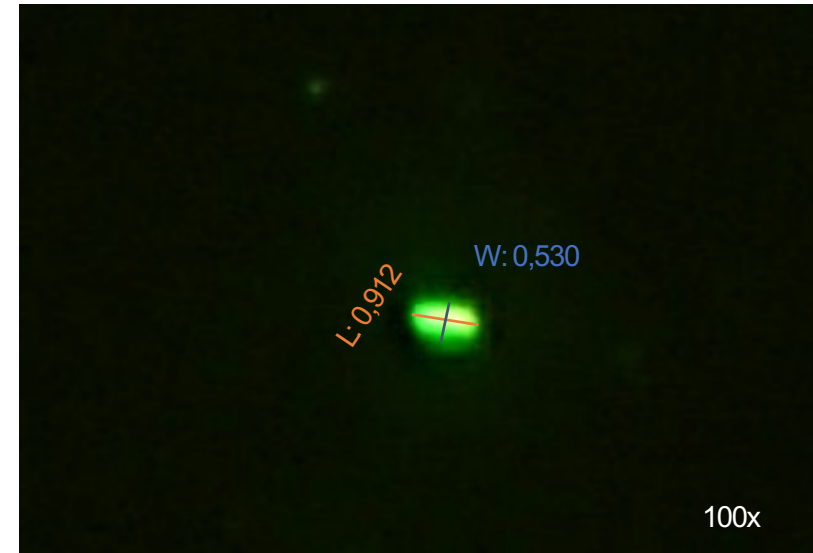
Relationship between total bacteria counts using Sybr Green vs Acridine Orange (AO).



A



$$\Psi = \frac{\pi}{4} * W^2 * (L - W/3)$$



## Zona de estudio Fuente de agua

Mar Bravo - Semacua

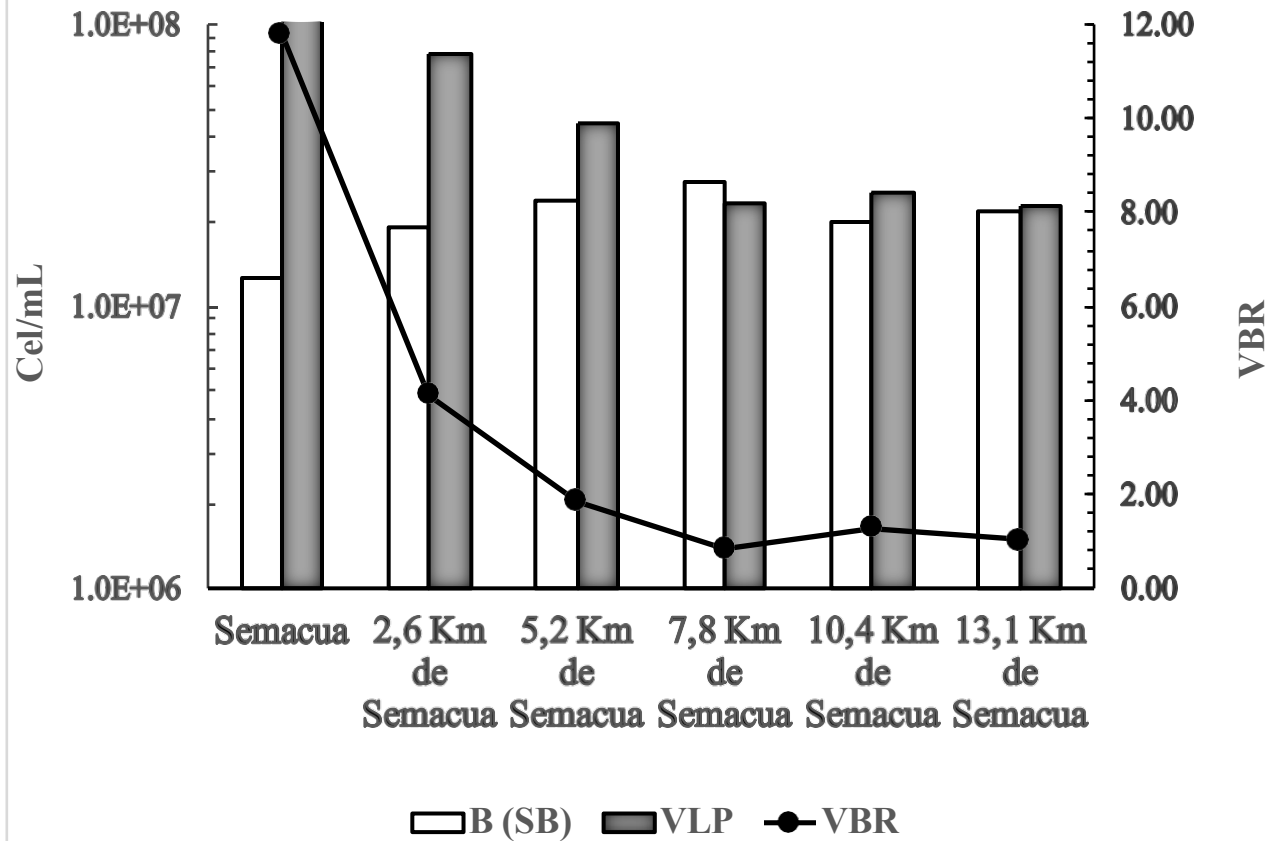


	PARÁMETROS				NUTRIENTES					MICROBIOLOGÍA		
	Salinidad	Temperatura	Oxígeno	Saturación	mg/L NNO2	mg/L NNO3	mg/L N-NH4	mg/L PPO4	mg/L Si-SiO3	AGUA		
										TSA	TCBS	Chroma
Punto 1	34.36	23.3	7.18	102.2	0.001	0.006	0.007	0.005	0.130	1.10E+03	2.00E+01	0.00E+00
Punto 2	36.56	23.3	7.35	104.7	0.000	0.003	0.008	0.001	0.081	1.30E+03	0.00E+00	0.00E+00
Punto 3	34.73	23.3	7.26	103.6	0.000	0.003	0.010	0.011	0.029	2.70E+03	1.00E+01	0.00E+00
Punto 4	36.92	23.1	7.15	102	0.000	0.003	0.014	0.005	0.060	3.90E+03	1.00E+01	0.00E+00
Punto 5	37.29	23.4	6.88	97.9	0.001	0.001	0.009	0.008	0.006	1.80E+03	0.00E+00	0.00E+00
Punto 6	37.51	23.4	6.95	98.3	0.002	0.002	0.005	0.005	0.023	2.30E+03	1.00E+01	0.00E+00

	Salinidad (Ppt)	Alcalinidad (mg/l)	Calcio (mg/l)	Magnesio (mg/l)	Cloruros (mg/l)	Potasio (mg/l)	Sulfato (mg/l)	CL/K	CL/SO4
Punto 1	34.36	147.27	390.18	1304.32	19020.90	335.73	2025.00	56.66	9.39
Punto 2	36.56	156.72	408.72	1426.94	20235.00	356.26	2233.33	56.80	9.06
Punto 3	34.73	152.35	353.02	1259.72	19220.90	346.00	2337.50	55.55	8.22
Punto 4	36.92	162.73	390.18	1449.24	20437.35	366.53	2025.00	55.76	10.09
Punto 5	37.29	157.65	397.61	1455.93	20639.70	346.00	2129.17	59.65	9.69
Punto 6	37.51	165.07	408.76	1404.65	20761.11	366.53	2233.33	56.64	9.30



**TOTAL BACTERIA AND VLP FROM DIFFERENT SEAWATER SOURCES**



## **Microbiología del laboratorio de larvas**

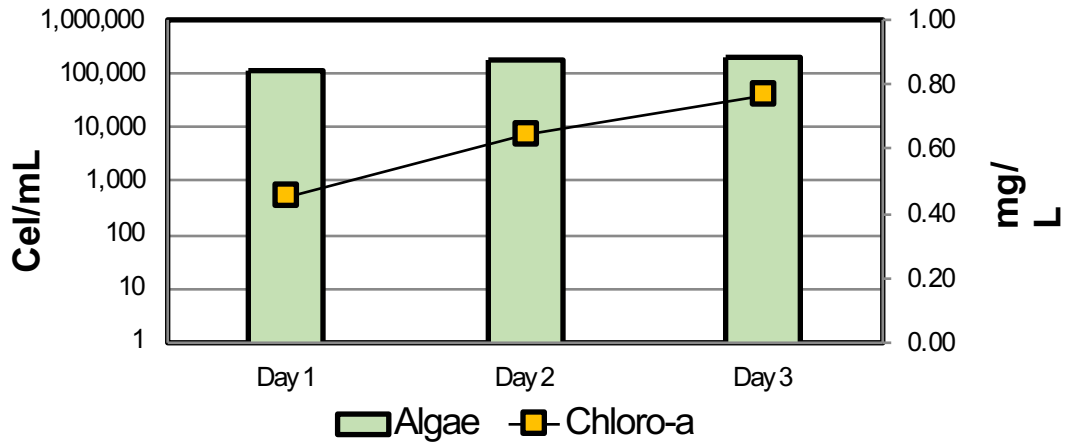
**Análisis en:**

- 1. Algas (masivos)**
- 2. Reservorio y Maduración (recirculación), 5 x 7 días.**
- 3. Eclósion**
- 4. Sistema de recirculación (substrato), 5 x 18 días.**
- 5. Larvicultura**
- 6. Animales**

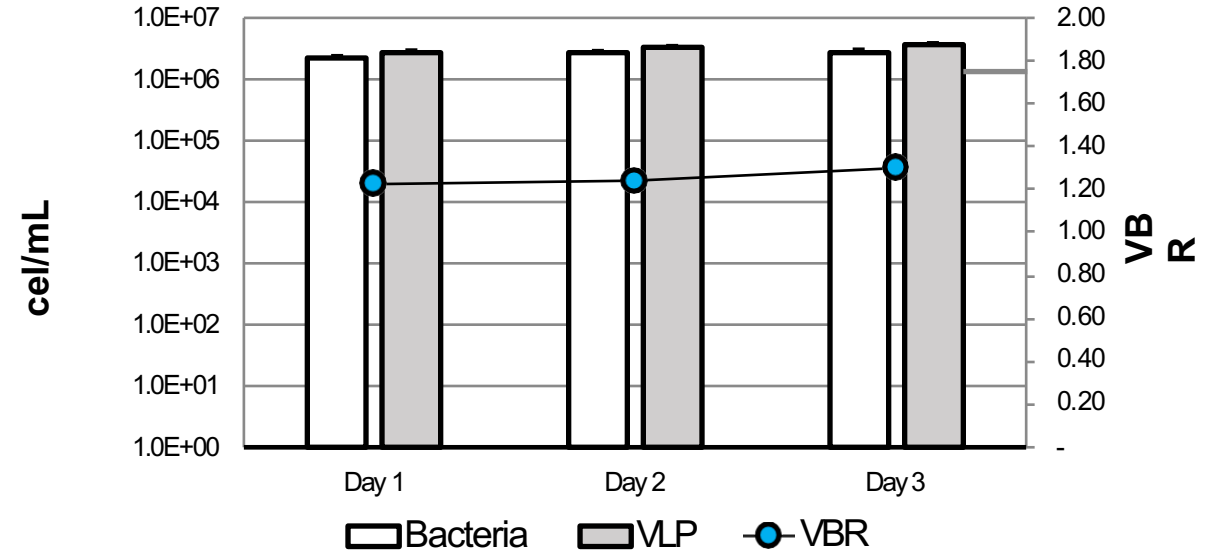


## 1. Algas Masivos

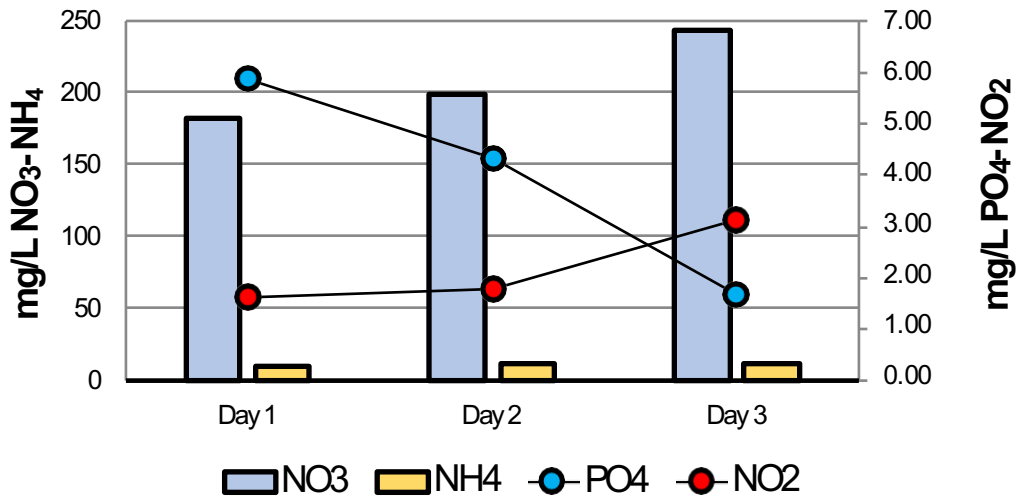
Algae cells and Chlorophyll- a in algal culture



Bacteria, VLP and VBR in algal massive culture

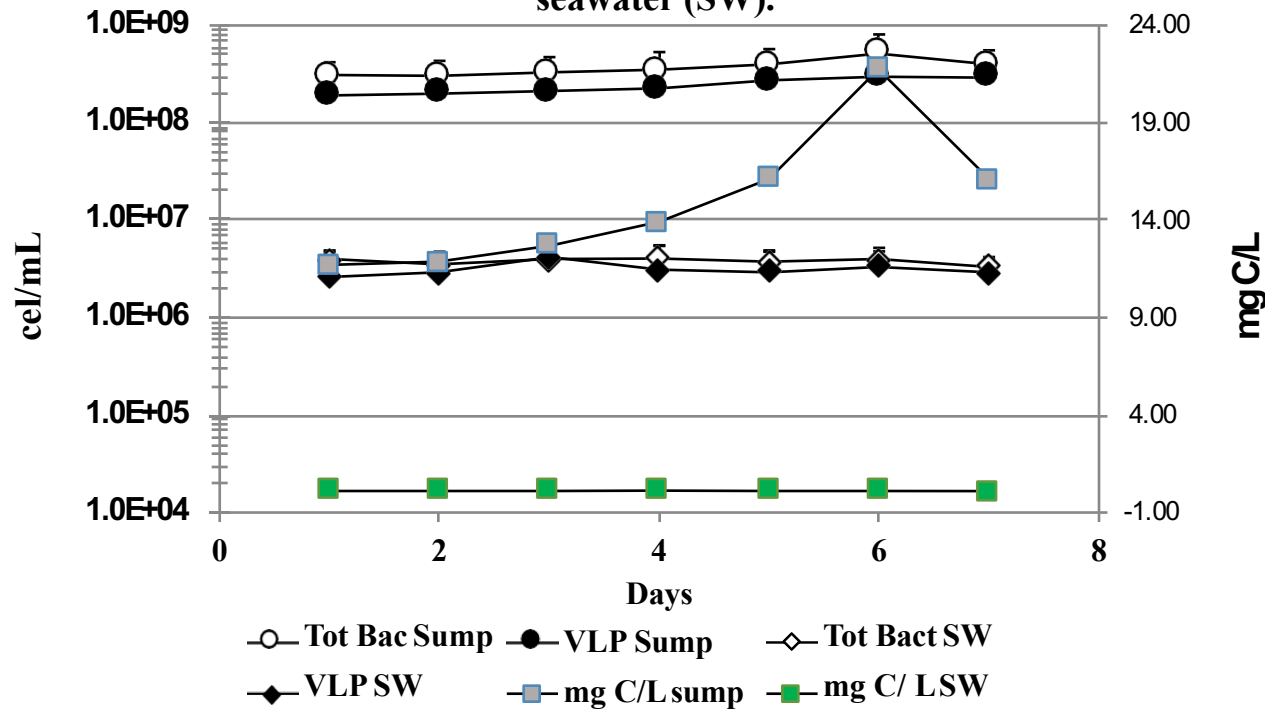


Nutrients in algal large culture

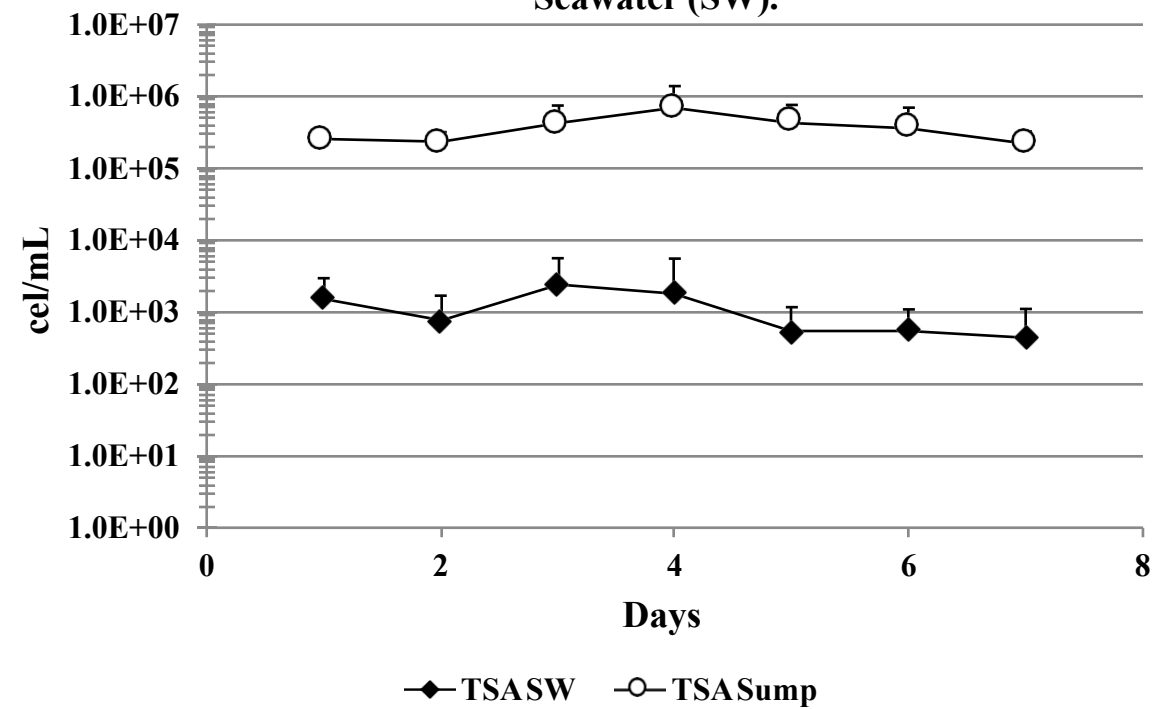


## 2). Reservorio y Maduración (recirculación).

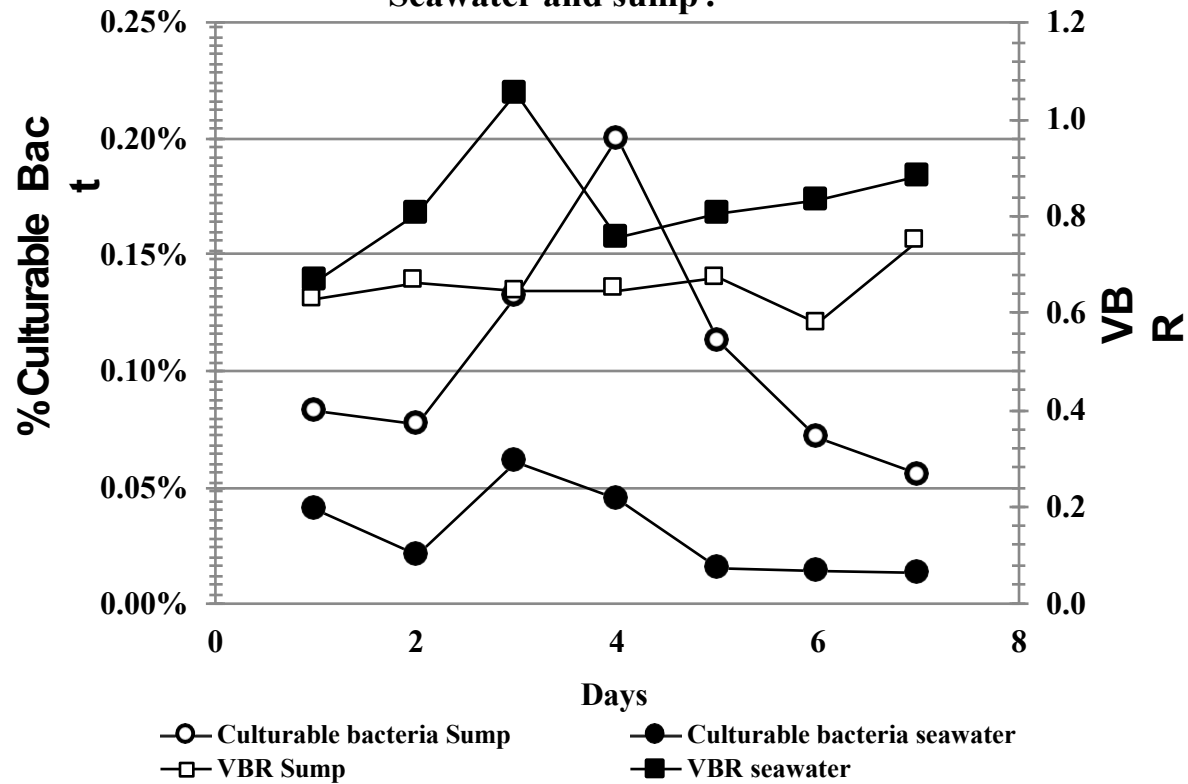
Concentration of Total bacteria and VLP in sump, and seawater (SW).



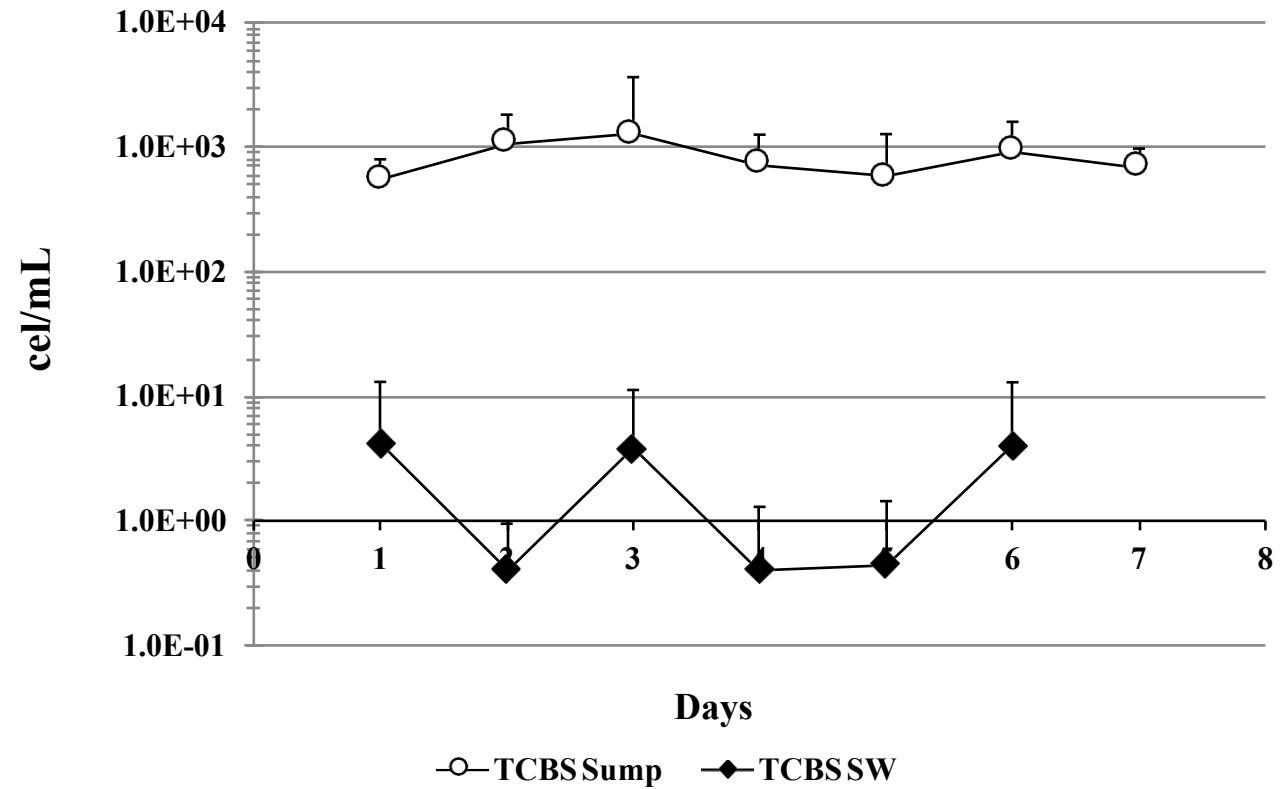
Concentration of Culturable Bacteria in Sump, and Seawater (SW).



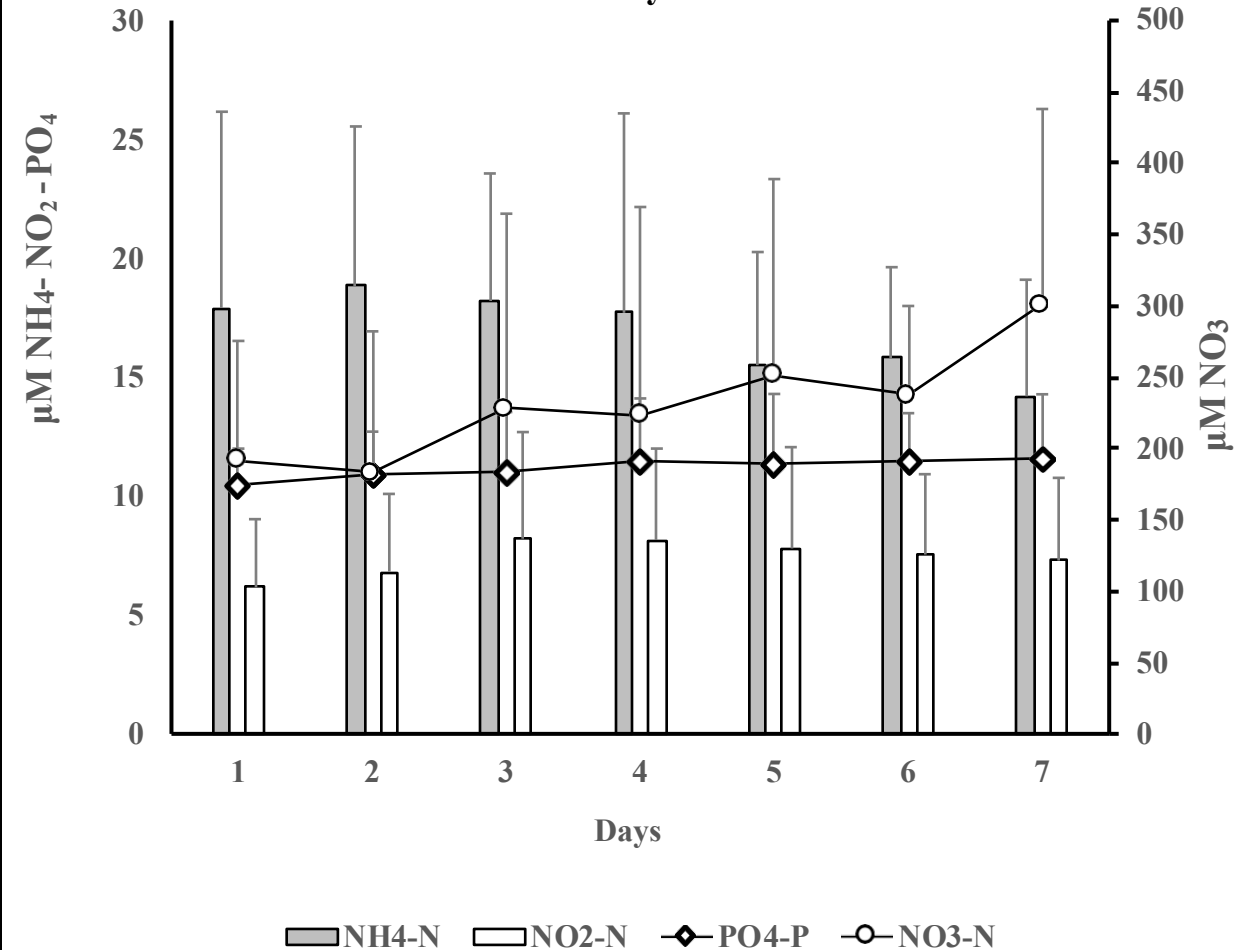
Percentage of culturable bacteria and VBR Ratio in Seawater and sump .



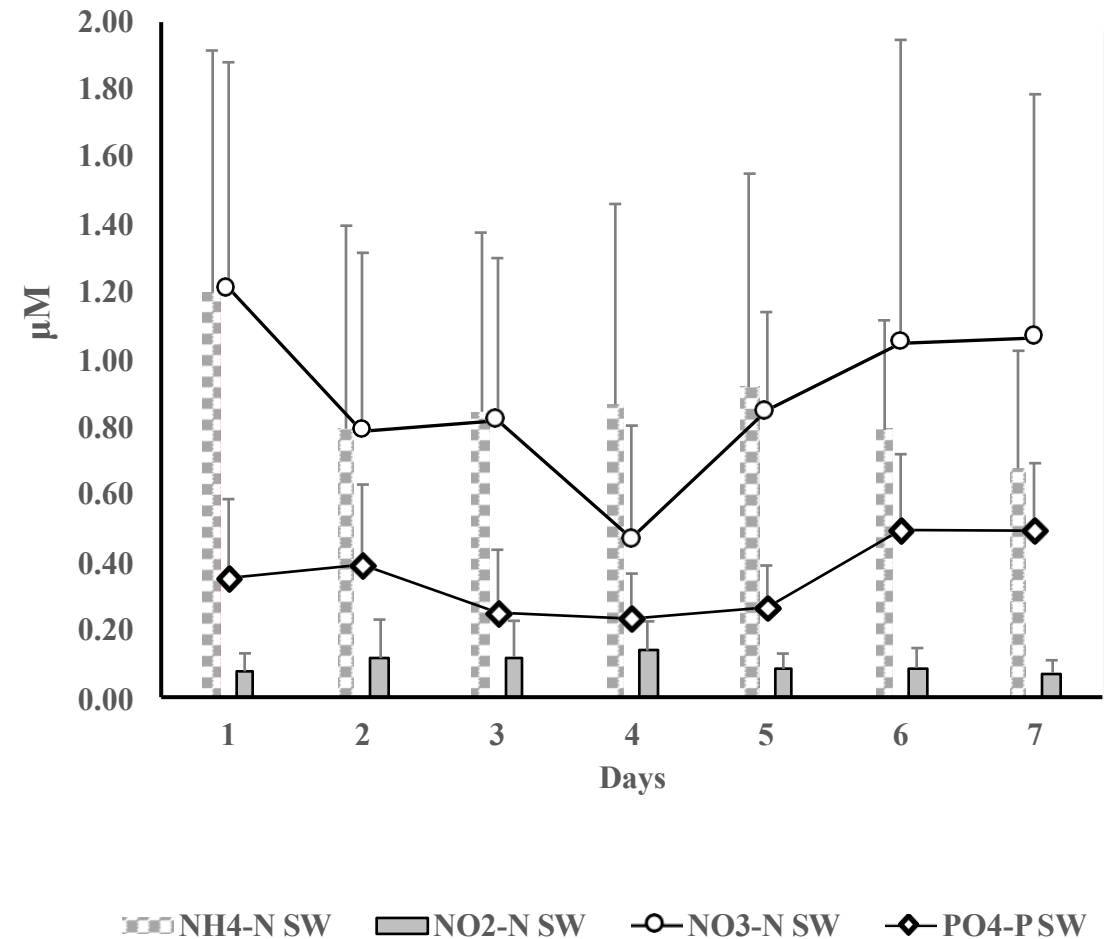
Concentration of Culturable Vibrio like , Sump and Seawater (SW).



**Inorganic Nutrients ( $\mu\text{M}$ ) during 7 days in the Recirculation system.**

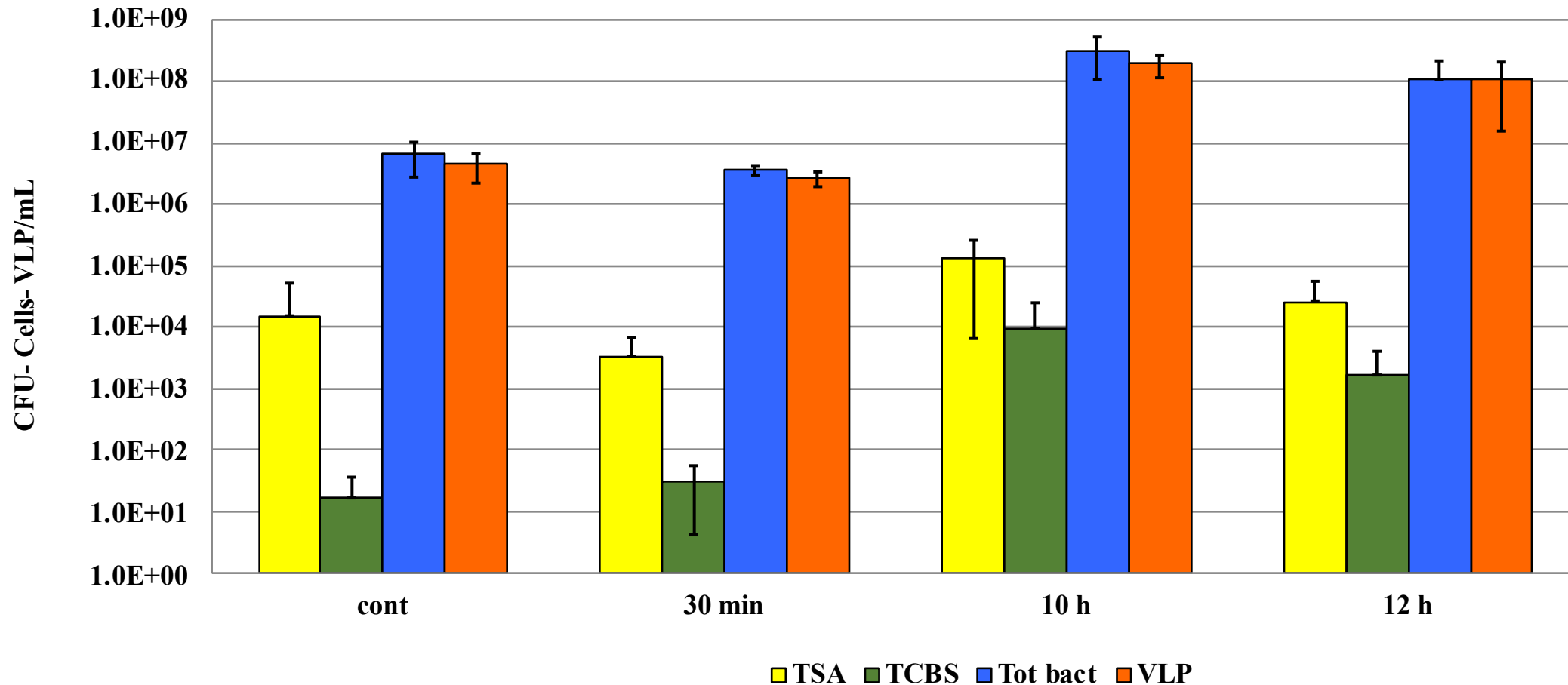


**Inorganic Nutrients ( $\mu\text{M}$ ) during 7 days in the Sea Water reservoir.**

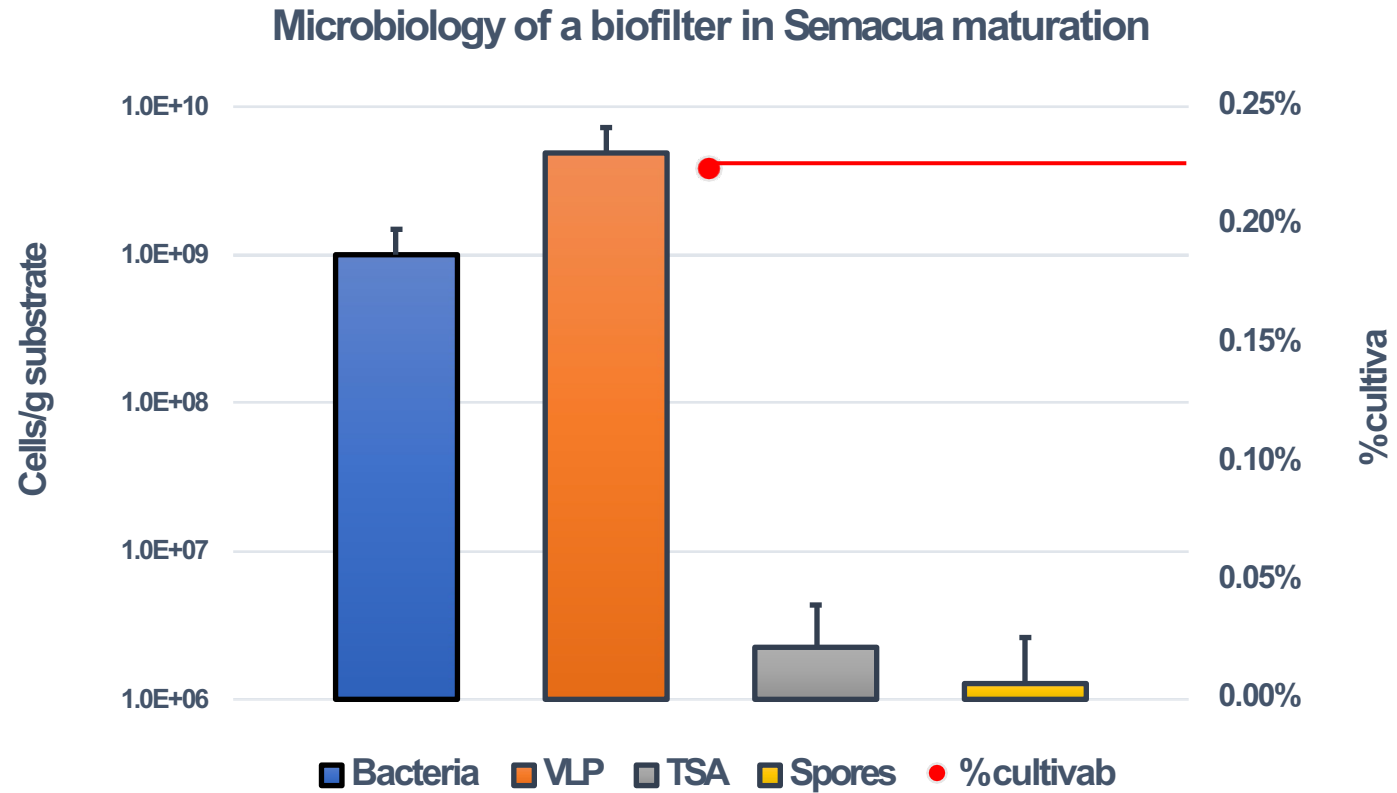


### 3. Ecllosion

## Concentration of Bacteria in *L.vannamei* water hatching tank.



#### 4. Substrato recirculación



## 5. Larvicultura

Plate count/Total Bacteria ,VLP and bacterial carbon during the larvae cultured using Probiotic SFF Probiotic Eq Plus

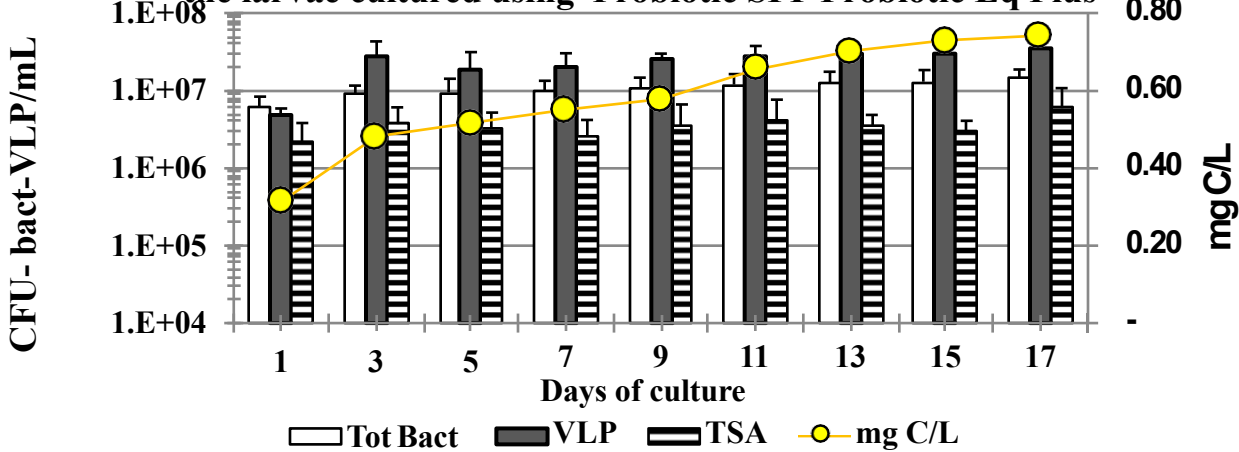
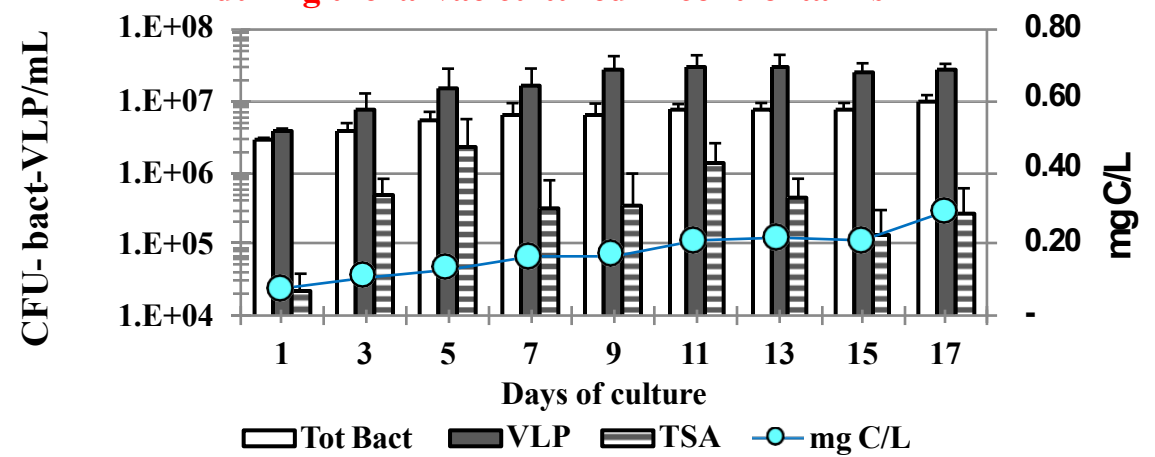
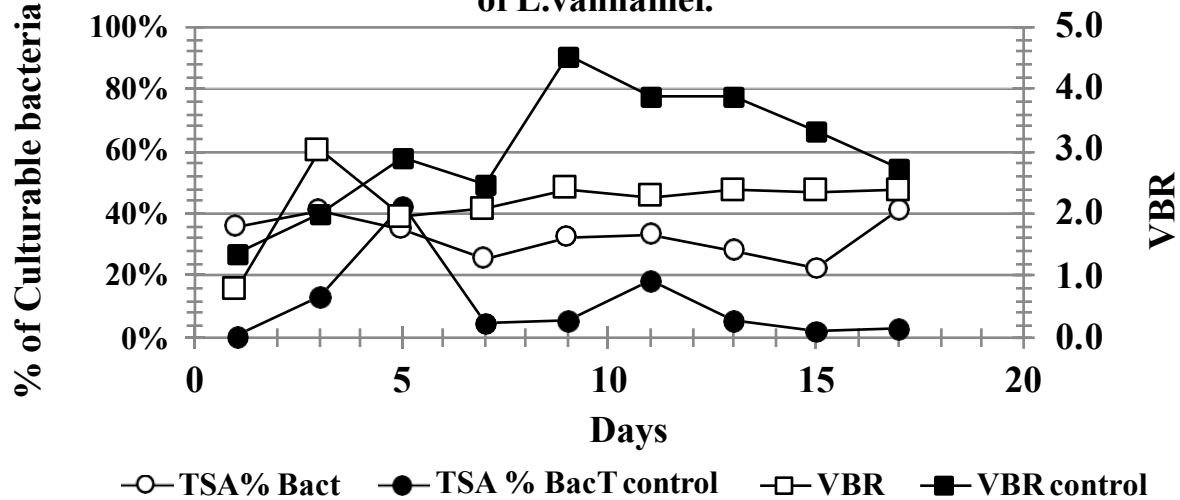


Plate count/Total Bacteria, VLP and bacterial carbon during the larvae cultured in control tanks



% of culturable bacteria and VBR in larvae culture tanks of L.vannamei.



BOD (respiration) of Tanks Control vs Probiotics at different stages

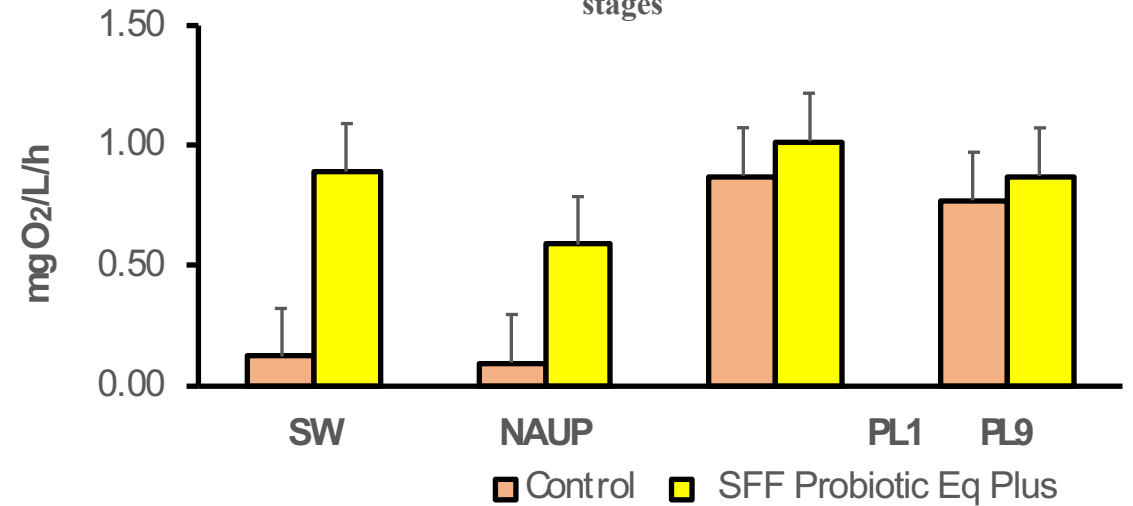


Plate count of TSA, TCBS and Chromagar in larvae water tank fed with spores of SFF Probiotic Eq Plus

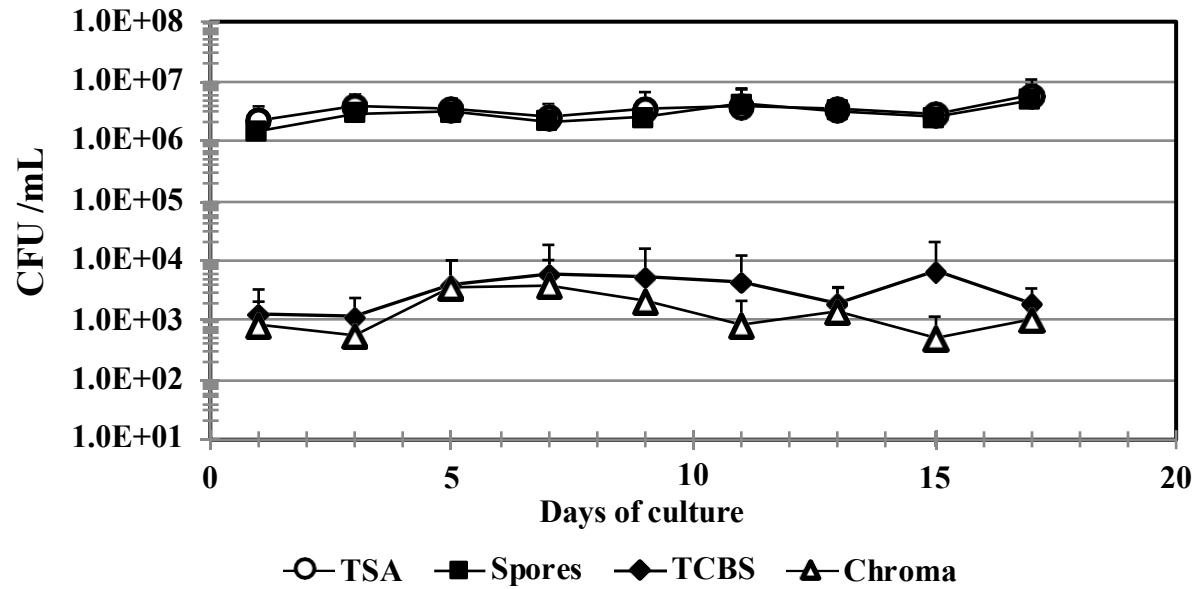
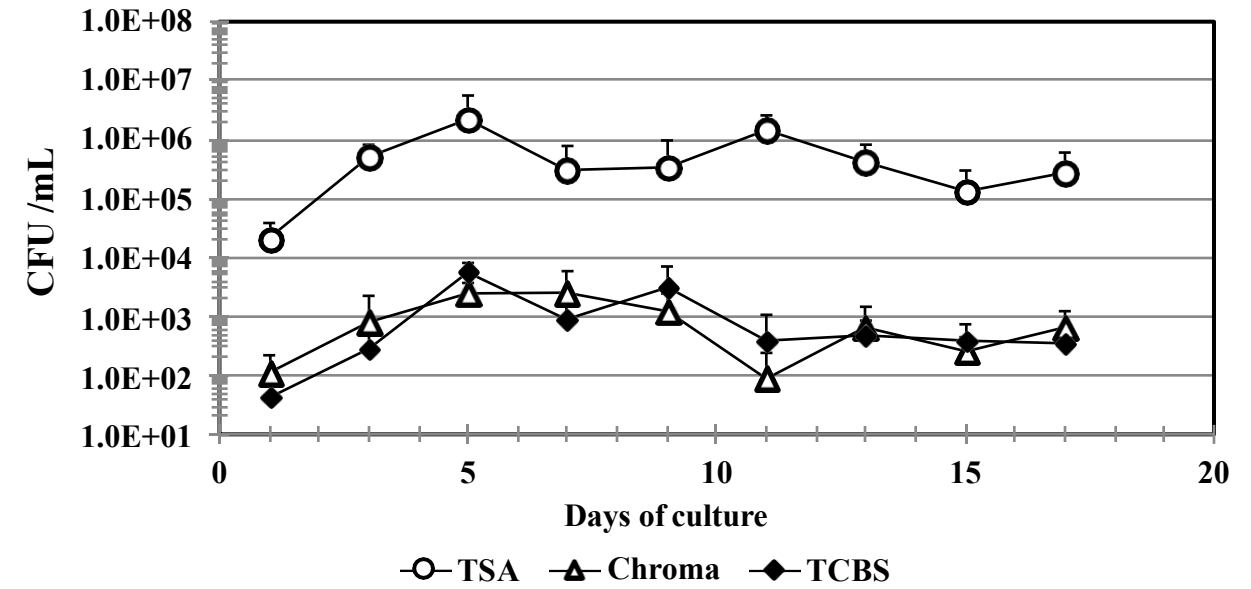


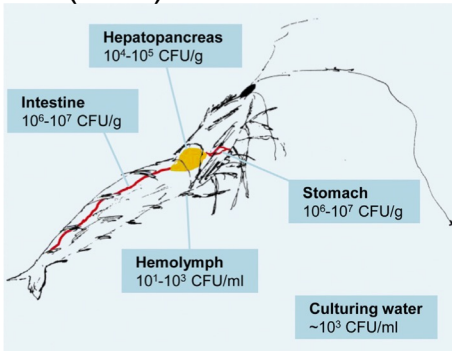
Plate count of TSA, TCBS and Chromagar in larvae water control tank





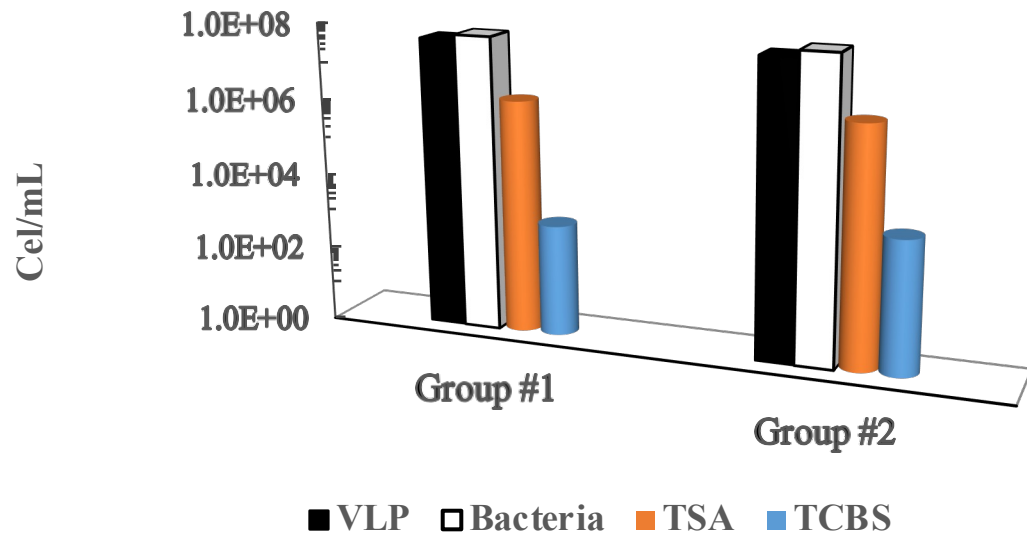
## 6. Animals

X.-W. Wang, J.-X. Wang / Molecular Immunology  
68 (2015) 404–411



### Microbiomo intestinal

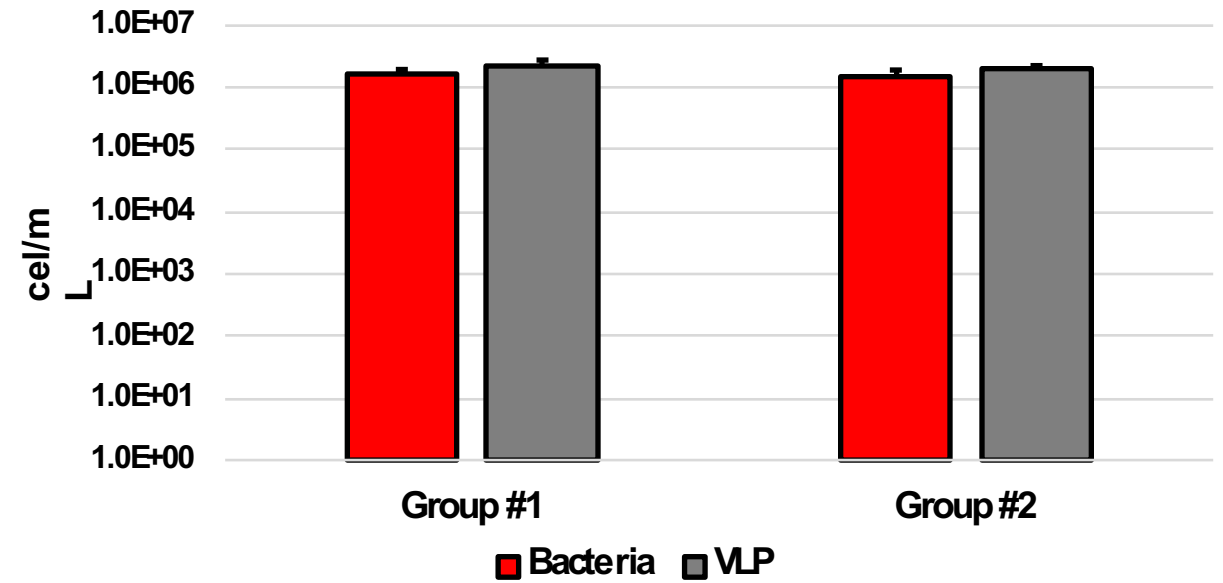
Total Bacteria, VLP, Culturable bacteria and presumptive Vibrios per gram of tail in *L.vannamei*



Zhang X, Sun Z, Zhang X, Zhang M, Li S. 2018. Hemolymph microbiomes of three aquatic invertebrates as revealed by a new cell extraction method. *Appl. Environ Microbiol* 84:e02824-17. The average hemolymph microbial abundance in *L.vannamei* was  $1.3 \times 10^5$  cel/mL (epifluorescent microscopy) vs  $5.1 \times 10^3$  UFC/mL using plate count.

### Microbiomo hemolinf

Bacteria and VLP concentration in hemolymph of *L.vannamei*



## Conclusiones

1. Los resultados de los conteos en placas hechos en las diferentes áreas del laboratorio muestran que solo entre el 0.01 y 0.25% de la población bacteriana y entre el 20 al 50% cuando se usan probióticos “viables”.

**TABLE 1. Culturability determined as a percentage of culturable bacteria in comparison with total cell counts**

Habitat	Culturability (%) <sup>a</sup>	Reference(s)
Seawater	0.001–0.1	48, 81, 82
Freshwater	0.25	75
Mesotrophic lake	0.1–1	150
Unpolluted estuarine waters	0.1–3	48
Activated sludge	1–15	160, 161
Sediments	0.25	75
Soil	0.3	153

<sup>a</sup> Culturable bacteria are measured as CFU.

Amann RI, Ludwig W, Schleifer K-H.. Phylogenetic identification of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev 59: 143-169.

## Conclusiones

2. El bajo porcentaje de bacterias cultivables no implica que la población no cultivable no sean viables o virulentas. Los Nauplios van con una alta carga microbiana a tanques de larvas.
3. La fuente de agua que se use o las algas como fuente de alimento en etapas iniciales todas contienen concentraciones  $> 10^5$  cel/mL de bacterias y VLP., y su carga microbiana puede ser fuente de inoculum.
3. El determinar la dinámica de bacterias y VLP en las diferentes fases de cultivos nos enseñan los máximos de carga del sistema y corroborar el uso de: Ejemplo., uso de probióticos (dinámica de mortalidad), persistencia, consumo, uso de fagos como probióticos.
4. El teórico radio VBR 10:1, no se presenta en los estudios que hemos realizado. Estamos por determinar el % de fagos lisogénicos vs líticos y comparar este radio en diferentes sistemas, y su asociación con patologías.
5. La aplicación de esporas (SFF Probiotic Eq Plus) demuestra que se mantiene en el agua y los *Vibrios* disminuyen cumpliéndose el dogma de que los probióticos ejercen “competencia exclusiva” ocupan el espacio que podrían ocupar otras especies como los patógenos.



**GRACIAS !**