



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS AISLADOS
DE SISTEMA DE MANGLE CON CAPACIDADES
BIORREMEDIADORAS E INMUNOESTIMULANTES
EN EL CULTIVO DE CAMARÓN BLANCO DEL
PACÍFICO *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931)

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Acuicultura)

P r e s e n t a

Ana Caroli Ibarra Serrano

La Paz, Baja California Sur, febrero 2018.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 20 del Mes de febrero del 2018, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Evaluación de microorganismos aislados de sistema de mangle con capacidades biorremediadoras e inmunoestimulantes en el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)"

Presentada por el alumno:

Ana Caroli Ibarra Serrano

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN ACUICULTURA.

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



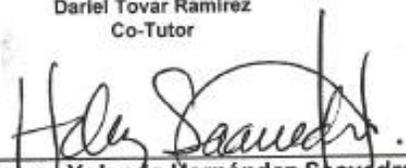
Eduardo Quiróz Guzmán
Co-Director



Ángel Isidro Campa Córdova
Co-Director



Daríel Tovar Ramírez
Co-Tutor



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova (CIBNOR)
Co-Director

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán (CIBNOR)
Co-Director

Dr. Dariel Tovar Ramirez (CIBNOR)
Tutor

Comité Revisor de Tesis

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán

Dr. Dariel Tovar Ramirez

Jurado de Examen de Grado

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán

Dr. Dariel Tovar Ramirez

Suplente

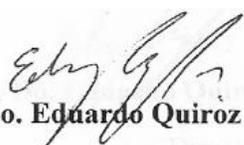
Dr. José Manuel Mazón Suástegui

Resumen

El camarón blanco del pacífico *Litopenaeus vannamei* es una especie de cultivo que ha dominado la producción global, los volúmenes de producción en los últimos años a pesar del incremento en la oferta y la demanda de este producto, ha sido limitada por enfermedades causadas por virus y bacterias. Además esta actividad tiene un efecto negativo en zonas aledañas al cultivo con la descarga de los efluentes sin tratar, causando alteraciones al ciclo natural del medio, creando condiciones de proliferación de microorganismos no deseados y un deterioro en la calidad del agua. Una estrategia de control para este propósito es la utilización microorganismos benéficos (probióticos) los que pueden actuar directa y/o indirectamente sobre el crecimiento y el estado de salud de los organismos cultivados, favoreciendo la asimilación de nutrientes, reforzando el sistema inmune, inhibiendo el crecimiento de patógenos y mejorando la calidad del agua. El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar microorganismos con capacidad biorremediadora del manglar en la Bahía de La Paz, Baja California Sur y evaluar su efecto benéfico en el cultivo de *L. vannamei*. Se evaluó el efecto de 7 microorganismos: 6 bacterias (*Bacillus oceanisediminis*, *Rhizobium halotolerans*, *Macrocooccus caseolyticus*, *Bacillus sp. Pseudomona baleárica*, *Phenylobacterium koreense*) y 1 levadura (*Candida cretensis*) aisladas de un mangle sano; sobre la calidad del agua de cultivo referida a compuestos nitrogenados y la estimulación del sistema inmune. Se realizó una caracterización de cada una de las cepas, se hicieron pruebas de antagonismo, hemólisis y se identificaron molecularmente. Se llevó a cabo 1 bioensayo *In vitro* y 2 *In vivo*. En el primero, se probaron las capacidades de los microorganismos para reducir el contenido de los iones NH_4^+ y NO_2^- en agua de mar filtrada, de este experimento se seleccionaron 3 tratamientos (*Bacillus oceanisediminis*, *Candida cretensis* y la mezcla de los 7 microorganismos), con el mismo propósito se realizó el segundo bioensayo, se evaluaron los 3 tratamientos y 1 control, con juveniles 4.2 gr de *L. vannamei* y adicionalmente se determinó NO_3^- . Para el tercer bioensayo con duración de 21 días, los 3 tratamientos y 2 controles (control y otro control utilizando un alimento suplementado con MacroGard), con 20 camarones de peso promedio 4.1gr, por triplicado, se determinaron los mismos metabolitos y se evaluaron los efectos inmunoestimulantes de las cepas, con actividad enzimática (SOD y GST). En resumen, los resultados mostraron a *Bacillus oceanisediminis* como una bacteria nitrificante eficiente y a *Candida cretensis* con capacidad reductora de la concentración del ión NH_4^+ en agua de mar y como potencial inmunoestimulante para *L. vannamei*.

Palabras clave: *Candida cretensis*, *Bacillus oceanisediminis*, biorremediación


Vo. Bo. Ángel Isidro Campa Córdova
Co-Director

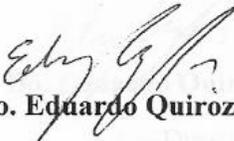

Vo. Bo. Eduardo Quiroz Guzmán
Co-Director

Abstract

The white shrimp of the pacific *Litopenaeus vannamei* is a farming species that has dominated the global production of shrimps, the volumes of production in recent years despite the increase of supply and demand of this product, has been limited by diseases caused by viruses and bacteria. In addition, this activity has a negative effect in areas surrounding the farm with the discharge of untreated effluents, causing alterations to the natural cycle of the environment, creating conditions of proliferation of unwanted microorganisms and deterioration in water quality. A control strategy for this purpose is the use of beneficial microorganisms (probiotics) that can act directly and / or indirectly on the growth and health status of cultured organisms, favoring the assimilation of nutrients, strengthening the immune system, inhibiting the growth of pathogens and improving water quality. The objective of this work was to isolate and characterize microorganisms with bioremediating capacity of the mangrove in the Bay of La Paz, Baja California Sur and to evaluate its beneficial effect in the cultivation of *L. vannamei*. The effect on the quality of water related to nitrogen compounds and the stimulation of the immune system of 7 microorganisms was evaluated: 6 bacteria (*Bacillus oceanisediminis*, *Rhizobium halotolerans*, *Macrococcus caseolyticus*, *Bacillus* sp. *Pseudomona baleárica*, *Phenylobacterium koreense*) and 1 yeast (*Candida cretensis*), isolated from a healthy mangrove system. A characterization of each of the strains was performed, tests of antagonism, hemolysis and molecularly identified were made. 1 *In vitro* and 2 *In vivo* bioassay was carried out. In the first, the capacities of the microorganisms to reduce NH_4^+ and NO_2^- were tested, from this experiment 3 treatments were selected (*Bacillus oceanisediminis*, *Candida cretensis* and a Mixture of all 7 microorganism), with the same purpose the second bioassay was carried out, the 3 treatments and 1 control with juveniles 4.2 gr of *L. vannamei* were evaluated. NO_3^- was also determined. For the third bioassay with a duration of 21 days, the 3 treatments and 2 controls (Control and another control using a supplemented food with MacroGard) and 20 shrimps per unit, the same metabolites were determined and with the enzymatic activity (SOD, GST) the effects in the immune system by the strains were evaluated. In summary, the results showed *Bacillus oceanisediminis* as an efficient nitrifying bacterium and *Candida cretensis* as a bioremediator yeast, decreasing the concentration of NH_4^+ and probiotic, increasing the immune response of *L. vannamei*.

Key words: *Candida cretensis*, *Bacillus oceanisediminis*, biorremediación


Vo. Bo. Ángel Isidro Campa Córdova
Co-Director


Vo. Bo. Eduardo Quiroz Guzmán
Co-Director

Dedicatoria

A mi familia.

Agradecimientos

CONACYT Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca de maestría: 590854

Al Centro de Investigaciones Biológicas de Noroestes S.C. (CIBNOR) por la oportunidad y apoyo durante todo el tiempo que llevó la realización de este trabajo de investigación.

Mi comité Dr. Ángel Isidro Campa Córdova, Dr. Eduardo Quiroz Guzmán, Dr. Dariel Tovar Ramírez

Antonio, al que me mantuvo constante en esta aventura, gracias.

Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico por apoyarme, brindarme su amistad y compartir sus conocimientos Norma A. Ochoa Hernández, Emeson Carló Zúñiga.

Laboratorio de Inmunogenómica Marina, Dr. Martin Ramírez y a Rosa María Morelos Castro.

Laboratorio de Microbiología Ambiental, Manuel Moreno L., Blanca Romero, Oskar Palacios y Juan Pablo Hernández.

Laboratorio de Aclimatación de Organismos, Pablo Monsalvo, Gabriel Robles

Al personal de Posgrado: Dra. Norma Hernández, Lic. Osvelia Ibarra, Lic. Leticia González, Horacio Sandoval, Tania Nuñez, Claudia Olachea.

Laboratorio de Genómica, Isaac López Cruz.

A mis amigos de vigilancia.

A mis amigos, que me brindó el estudiar una maestría, Lupita, Karina Alejandra, Jessica, Leilani, Yared, Nuria, Paulina, Ana Carolina, Carolina A., Catalina, Carmen P., Carmen V., Mayela, Emilio, Amaral, Memo, César, Josue, Daniel, Tomás, Idael, José Luis, Isaí, Miguel, Alfredo, Tai Coh, Goyo, Jeb, Crystal, Eliza, Abraham, Miriam, y en especial a Marlenne y Bryan.

Contenido

Resumen	i
Abstract	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Lista de figuras	vii
Lista de tablas	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Manglar	2
2.2 Eutrofización del medio.....	3
2.3 Enfermedades en la acuicultura	5
2.4 Probióticos y el sistema inmune	6
3. JUSTIFICACIÓN.....	7
4. HIPÓTESIS.....	8
5. OBJETIVOS	8
5.1 Objetivo general	8
5.2 Objetivos específicos.....	8
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
6.1 Objetivo I.....	9
6.1.1 Obtención y aislamiento de microorganismos	9
6.1.2 Aislamiento de ADN bacteriano	11
6.1.3 Identificación molecular de las cepas.....	11
6.1.4 Selección de microorganismos	12
6.1.5 Preservación de cepas de trabajo	12
6.2 Objetivo II.	13
6.2.1 Preparación de inóculos de bacterias de prueba	13
6.2.2 Medición de NO_2^- , NO_3^- y NH_4^+	13
6.2.3 Bioensayo I. Calidad de agua	14
6.2.4 Bioensayo II. Calidad de agua con camarones 0% de recambio de agua.....	15
6.3 Objetivo III	16
6.3.1 Bioensayo III. Calidad de agua con camarones 8-10% recambio de agua.....	16

6.3.2	Conteo de hemocitos	17
6.3.3	Análisis de sistema antioxidante.....	18
6.4.	Análisis estadísticos.....	20
7.	RESULTADOS	21
7.1	Selección de microorganismos	21
7.2	Bioensayo I Calidad de agua	21
7.3	Bioensayo II y Bioensayo III.....	23
7.4.	Parámetros de crecimiento	28
7.5.	Conteo total de hemocitos circulantes	30
7.6.	Respuesta enzimática.....	31
8.	DISCUSIÓN	34
9.	CONCLUSIONES	38
10.	LITERATURA CITADA	39
11.	ANEXOS	47

Lista de figuras

- Figura 1.** Descripción gráfica del ciclo de N en el cultivo de camarón. Se produce TAN (nitrógeno amoniacal total, por sus siglas en inglés, $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) por la adición de alimento y las excretas de los organismos. Las bacterias en la columna de agua y en el sedimento llevan a cabo la oxidación de NO_2^- a NO_3^- y finalmente a N_2 . (Modificado de Crab *et al.*, 2007). 4
- Figura 2.** Ubicación geográfica de la zona de muestreo. 10
- Figura 3.** Izquierda: vista aérea de la zona de muestreo. b) Derecha: toma de muestra raíz, sedimento y agua. 10
- Figura 4.** Unidad experimental bioensayo I. Matraces de 500 mL, aireación continua y temperatura controlada con baño María (n=3). 15
- Figura 5.** Variación en la concentración de amonio en un periodo de 96 horas. 7 tratamientos: (S23) *Bacillus oceanisediminis*, (S10) *Candida cretensis*, (S31) *Rhizobium halotolerans*, (S21) *Macrocooccus caseolyticus*, (RS5) *Bacillus sp.* (S32N) *Pseudomona baleárica*, (S32) *Phenylobacterium koreense*, (C) control y (C+) control positivo (n=3). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$), los datos representan la media \pm error estándar. 22
- Figura 6.** Evaluación de la concentración de nitrito en un periodo de 96 horas. 7 tratamientos: (S23) *Bacillus oceanisediminis*, (S10) *Candida cretensis*, (S31) *Rhizobium halotolerans*, (S21) *Macrocooccus caseolyticus*, (RS5) *Bacillus sp.* (S32N) *Pseudomona baleárica*, (S32) *Phenylobacterium koreense*, (C) control y (C+) control positivo (n=3). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$), los datos representan la media \pm error estándar. 23
- Figura 7.** Concentración de amonio. Tratamientos: (S10) *Candida cretensis*, (S23) *Bacillus oceanisediminis*, (MIX) mezcla de microorganismos, (C-) control (n=3). Las letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$), los datos representan la media \pm error estándar. 24
- Figura 8.** Evaluación de la concentración de nitrito en los diferentes tratamientos. (S10) *Candida cretensis*, (S23) *Bacillus oceanisediminis*, (MIX) mezcla de microorganismos, (C-) control (n=3). Las letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$), los datos representan la media \pm error estándar. 25
- Figura 9.** Concentración de nitrato. Tratamientos: (S10) *Candida cretensis*, (S23) *Bacillus oceanisediminis*, (MIX) mezcla de microorganismos, (C-) control (n=3). Las letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$), los datos representan la media \pm error estándar. 25

- Figura 10.** Concentración de amonio en los diferentes tratamientos, unidades experimentales con recambios mínimos de agua. (S10) *Candida cretensis*, (S23) *Bacillus oceanisediminis*, (MIX) mezcla de microorganismos, (C) control y (INM) control positivo (n=3). Las letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$), los datos representan la media \pm error estándar..... 26
- Figura 11.** Concentración de nitrito en los diferentes tratamientos, unidades experimentales con recambios mínimos de agua. (S10) *Candida cretensis*, (S23) *Bacillus oceanisediminis*, (MIX) mezcla de microorganismos, (C) control y (INM) control positivo. (n=3). Las letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$), los datos representan la media \pm error estándar..... 27
- Figura 12.** Concentración de nitrato en los diferentes tratamientos, unidades experimentales con recambios mínimos de agua. (S10) *Candida cretensis*, (S23) *Bacillus oceanisediminis*, (MIX) mezcla de microorganismos, (C) control y (INM) control positivo (n=3). Las letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$), los datos representan la media \pm error estándar..... 27
- Figura 13.** Talla de los organismos muestreados semanalmente. (S10) *Candida cretensis*, (S23) *Bacillus oceanisediminis*, (MIX) mezcla de microorganismos, (C) control y (INM) control positivo (n=20). Sin diferencias significativas ($P > 0.05$), Los datos representan la media \pm error estándar..... 29
- Figura 14.** Peso de los organismos muestreados semanalmente. (n=20). (S10) *Candida cretensis*, (S23) *Bacillus oceanisediminis*, (MIX) mezcla de microorganismos, (C) control y (INM) control positivo (n=20). Sin diferencias significativas ($P > 0.05$) los datos representan la media \pm error estándar..... 29
- Figura 15.** Tasa de crecimiento de los diferentes tratamientos. (S10) *Candida cretensis*, (S23) *Bacillus oceanisediminis*, (MIX) mezcla de microorganismos, (C) control y (INM) control positivo (n=20). Las letras diferentes denotan las diferencias significativas ($P < 0.05$), los datos representan la media \pm error estándar..... 30
- Figura 16.** Conteo total de hemocitos circulantes al término del bioensayo. No existen diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$) (n=9). Los datos representan la media \pm error estándar..... 31
- Figura 17.** Efecto de los tratamientos en la actividad SOD en hemocitos. Efecto de los tratamientos. Los datos representan la media \pm error estándar (n=9). Las letras denotan diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento S10 (*Candida cretensis*), los controles y el tratamiento S23 (*Bacillus oceanisediminis*) Los datos representan la media \pm error estándar..... 32
- Figura 18.** Actividad enzimática de superóxido dismutasa en tejido muscular de camarón blanco, expuestos a los distintos tratamientos (n=3). Sin diferencias significativas ($P > 0.05$). Los datos representan la media \pm error estándar..... 32
- Figura 19.** La actividad de la enzima GST en tejido muscular de camarón blanco, expuestos a los distintos tratamientos. Sin diferencias significativas ($P > 0.05$) (n=3). Los datos representan la media \pm error estándar..... 33

Lista de tablas

Tabla I. Lista de microorganismos seleccionados.....	12
Tabla II. Tratamientos evaluados en bioensayo I.....	14
Tabla III. Tratamientos evaluados en el bioensayo II.....	16
Tabla IV. Tratamientos evaluados en el bioensayo II.....	17
Tabla V. Características de microorganismos seleccionados.....	21
Tabla VI. Preparación de muestras para determinar la actividad SOD con el Kit "SOD determination kit" (Sigma).	49
Tabla VII. Reactivos para llevar a cabo la prueba de SOD.....	50
Tabla VIII. Curva estándar para SOD en músculo (Cayman).	50
Tabla IX. Preparación de las reacciones para el Kit GST de Cayman.	50

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, el consumo de proteína de origen acuático proviene mayormente de la acuicultura que de la pesca (Tran *et al.*, 2018). El camarón blanco del pacífico *Litopenaeus vannamei* ha dominado la producción global de camarón, en 2012 representó el 15% del valor total de los productos costeros comercializados a nivel mundial, los volúmenes de producción de camarón en los últimos años a pesar del incremento de la oferta y demanda de este producto, ha sido limitada por enfermedades causadas por virus y bacterias patógenas, afectando la economía de varios países que comercializan el producto. (FAO, 2014)

Para controlar las enfermedades que se presentan y ocasionan pérdidas millonarias al sector, se utilizan tratamientos químicos, como antibióticos y desinfectantes, generando controversia por contaminación y la generación de microorganismos resistentes (Kautsky *et al.*, 2000), el uso indiscriminado de estos productos causa diferentes problemas ambientales, afectando el metabolismo de las comunidades microbianas naturales, modificando los ciclos biogeoquímicos en el cuerpo de agua receptor (Holmström *et al.*, 2003) y ocasionando la inhibición de diferentes procesos naturales importantes en el ambiente, como la denitrificación o la producción primaria por cianobacterias. (García-Armisen *et al.*, 2011). El uso de los antibióticos fue severamente restringido; dejando un vacío de mecanismos para el control bacteriano por ello en busca de alternativas, han encontrado la importancia de las bacterias como agentes de control biológico mediante actividad antagónica (Sugita *et al.*, 1996) y probióticos, para inmunoestimular al animal de cultivo y controlar la calidad del agua.

Ramos *et al.* (2008), refieren que los principales problemas ocasionados por la acuicultura son las descargas de efluentes no tratados, con lo que se contamina los cuerpos de agua naturales con nutrientes y materia orgánica, que estimulan el crecimiento de algas y otras formas de vida fotosintéticas, acelerando de esta manera la eutrofización del medio receptor, con lo cual se reduce significativamente la concentración del oxígeno disuelto y producen cambios indeseables en las poblaciones acuáticas (Knobelsdorf, 2005; Ruíz, 2008). Debido a la rápida expansión y a la creciente conciencia de los impactos negativos de las prácticas de cultivo de camarón sobre el ambiente y su propia producción, muchos

países productores de camarón están realizando grandes esfuerzos para cumplir con el concepto de acuicultura responsable (FAO, 2014), en la que se usen microorganismos benéficos tal como bacterias y microalgas que sirvan como biorremediadores de los efluentes, asimismo, se les utilice como fuente de alimento natural para las especies en cultivo, ayudando con la nutrición, producción, control de enfermedades, calidad de agua y cuidando el impacto ambiental que ocasionen los efluentes. (Abreu *et al.*, 2007; Crab *et al.*, 2007; Khatoon *et al.*, 2007; Thakur y Lin, 2002)

2. ANTECEDENTES

2.1 Manglar

El manglar es la vegetación que se localiza en la zona de mareas, entre el ambiente marino y el terrestre, están formados por 12 familias que comprenden 70 especies. Es la vegetación dominante en muchas lagunas costeras y estuarios (Lacerda *et al.*, 1993).

Los mangles se caracterizan por estar adaptados a hábitats salinos, de sedimentos ricos en materia orgánica y por lo tanto en condiciones reductoras (Flores-Verdugo, 1993). Los manglares forman parte importante de los intercambios de materia y energía con otros ecosistemas que los rodean, como son los ambientes terrestres, el mar, la atmósfera y el sedimento (Odum *et al.*, 1982) además de jugar papel importante como zona de crianza, refugio y alimentación para numerosos organismos gracias a la descomposición de hojas de mangle se sostienen una cadena alimenticia muy extensa basada en el detritus, rico en contenido calórico, proteico y carga microbiana.

En las aguas del manglar hay escasez de nitrógeno y fósforo (Holguin *et al.*, 1992; Vázquez *et al.*, 1996), aun así los mangles se observan sanos y frondosos, no mostrando alguna deficiencia nutricional aparente (Holguin *et al.*, 1999). El nitrógeno es un constituyente básico, que se encuentra en varios estados de oxidación. Dos de los principales procesos de la transformación microbiana del nitrógeno son: fijación de nitrógeno y desnitrificación (Madigan, *et al.*, 2001) siendo los microorganismos los que mantienen la funcionalidad de los ciclos biogeoquímicos así como la productividad de los ecosistemas de manglar (Bashan y Holguin, 2002; Nannipieri *et al.*, 2003)

2.2 Eutrofización del medio

En el cultivo de camarón la acumulación de nitrógeno disuelto especialmente amonio, es el resultado de la adición de alimento y la excreción de los organismos, la acumulación y aumento de estos metabolitos en el cultivo genera baja ingesta de alimento, disminuye por ende la talla y el porcentaje de supervivencia (Cavalli *et al.*, 1996; Ostrensky y Wasielesky, 1995).

Los desechos producidos por la acuicultura son, principalmente alimentos no consumidos por los organismos, excretas y antibióticos. Estos desechos, rápidamente incrementan las concentraciones de nutrientes (fósforo total, amonio, nitrógeno orgánico y materia orgánica), en el sedimento y la columna de agua, descendiendo la concentración de oxígeno disuelto y aumentando el nivel trófico en el cuerpo de agua (Tartarotti *et al.*, 2004), el resultado de todo esto es la eutrofización de las aguas por la materia orgánica a través de amonio, nitrito, fosfatos y silicatos (González-Félix y Pérez-Velázquez, 2006; Urakawa *et al.*, 2006). Estos componentes nitrogenados pueden ser eliminados del agua a través de la asimilación por parte de microorganismos como bacterias y microalgas (Cervantes-Carrillo, Pérez y Gómez, 2000; Fig. 1). La eutrofización se define como la consecuencia de la adición de nutrientes y a los cambios que se generan en los ecosistemas acuáticos por ellos, causando grandes efectos ecológicos y toxicológicos sobre el medio acuático (Camargo y Alonso, 2006).

Algunos de las consecuencias de la eutrofización son las siguientes: Reducción de la disponibilidad de luz debido a la disminución de la transparencia en la columna de agua, incremento de la cantidad de materia orgánica que sedimenta, disponibilidad de fósforo por la degradación de la materia orgánica acumulada en los sedimentos, pérdida de biodiversidad en especies y comunidades de fitoplancton, perifiton, macrófitas, macroalgas y coral, incremento de la biomasa, productividad y composición de los organismos del medio, reducción de la concentración de oxígeno, incremento de la biomasa, productividad y cambios en la composición de comunidades de macroalgas marinas, pérdida de biodiversidad, degradación de las condiciones del hábitat para la reproducción, alteraciones de la cadena alimentaria que afectan todos los niveles tróficos y la producción y

acumulación de compuestos reducidos como el sulfuro de hidrógeno (Camargo y Alonso, 2006).

En sistemas de acuicultura existen tres vías para la conversión del NH_4^+ : (a) asimilación y remoción fotoautotrófica por medio de algas y/o microalgas, (b) conversión de NH_4^+ en NO_2^- y NO_3^- por medio de bacterias que oxidan al NH_4^+ y bacterias nitrificantes, y, (c) conversión del NH_4^+ en biomasa bacteriana por medio de bacterias heterotróficas (James *et al.*, 2006). Estas bacterias con ayuda del oxígeno oxidan los nutrientes, convirtiéndolos en primer lugar de amonio a nitrito y luego de nitrito a nitrato, este último menos tóxico para los organismos cultivados (Azim *et al.*, 2003; Bender *et al.*, 2004), sin embargo, el nitrato en grandes concentraciones se convierte en un contaminante en mantos y reservorios de agua, causando problemas en el suministro de agua (Zumft, 1997), estimulando el crecimiento de algas y otras formas de vida fotosintéticas, reduciendo la concentración de oxígeno disuelto (Knobelsdorf, 2005; Ruíz, 2008).

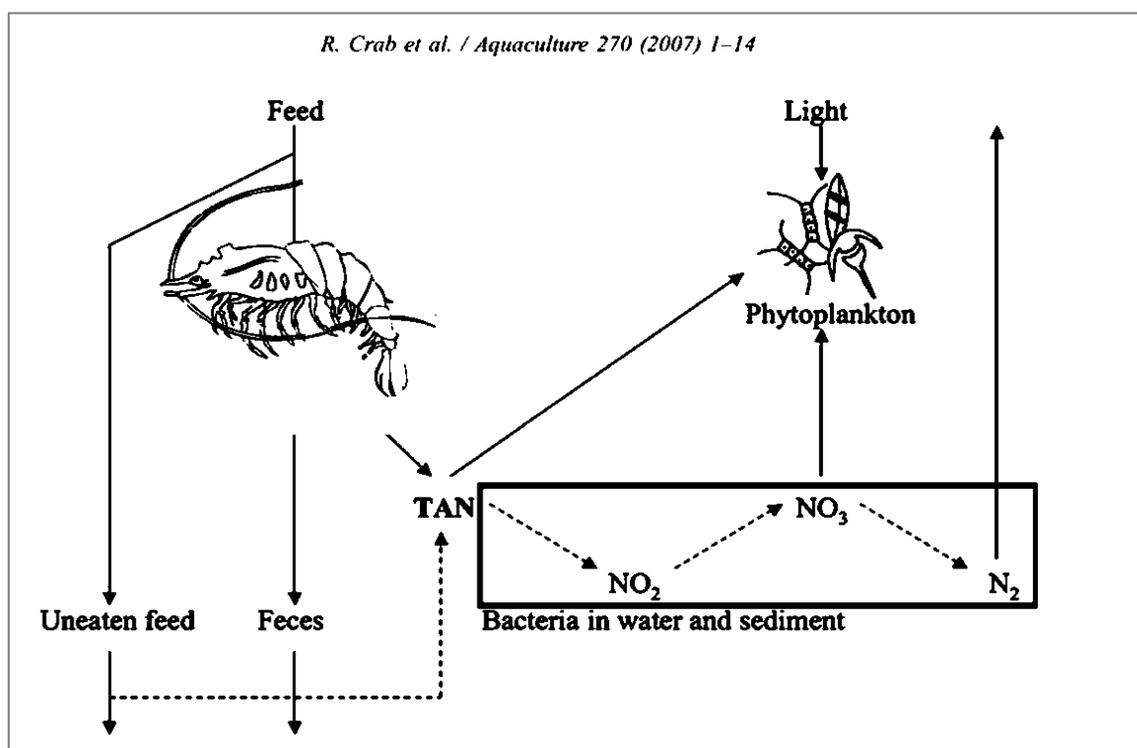


Figura 1. Descripción gráfica del ciclo de N en el cultivo de camarón. Se produce TAN (nitrógeno amoniacal total, por sus siglas en inglés, $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) por la adición de alimento y las excretas de los organismos. Las bacterias en la columna de agua y en el sedimento llevan a cabo la oxidación de NO_2^- a NO_3^- y finalmente a N_2 . (Modificado de Crab *et al.*, 2007).

2.3 Enfermedades en la acuicultura

La Vibriosis y el Síndrome de la mancha blanca, la primera enfermedad de origen bacteriana y la segunda viral, se reportan que afectan al camarón blanco *L. vannamei* responsables de la mortalidad del camarón de cultivo en todo el mundo (Chen *et al.*, 2000). El género *Vibrio* es el más estudiado y es considerado el de mayor importancia debido a que muchas especies son patógenas para humanos. Por otro lado, la incidencia de vibrios patógenos en organismos de cultivo y en organismos extraídos del medio natural (como peces y moluscos) es un problema sanitario que ha propiciado numerosos estudios al respecto (Madigan *et al.*, 1999; Ronda *et al.*, 2003).

En acuicultura, los vibrios se han reportado en numerosos casos de mortalidades en cultivos de peces, crustáceos y moluscos (Brock y LeaMaster, 1992). Esta bacteria en particular es responsable de mortalidades masivas, invade el hepatopáncreas del hospedero y provoca la muerte de larvas de camarones peneidos, se propaga muy rápido y una vez que ocurre la infección es sumamente difícil controlarla (Johnson, 1989; Vinod *et al.*, 2006).

Las especies de *Vibrio* se encuentran generalmente en los cultivos como agentes oportunistas, como una infección secundaria o en el caso actual como un patógeno verdadero (Saulnier *et al.*, 2000)

Los brotes pueden ocurrir cuando los factores ambientales, como la eutrofización del agua disparan la rápida multiplicación de las bacterias (Sizemore y Davis, 1985).

Para combatir este tipo de brotes que afectan a los acuicultores en el mundo es necesario emplear medidas preventivas, una estrategia de control bacteriológico, aunque no es novedosa tiene resultados prometedores, se enfoca al empleo de probióticos, algunos microorganismos tienen la capacidad de producir compuestos microbianos que refuerzan su sistema inmune y se utilizan como alternativa al uso de antibióticos y quimioterapéuticos. Chae-Woo Ma *et al.* (2009), reportan que *Lactobacillus plantarum* y *L. hilgardii* pueden ser utilizadas simultáneamente como eliminadores de nitrógeno y de patógenos en los cultivos de camarón.

2.4 Probióticos y el sistema inmune

El sistema de inmune de los crustáceos está basado en efectores celulares y humorales, los cuales se conjugan para eliminar microorganismos potencialmente infecciosos. Los efectores humorales son la expresión de las enzimas lisosomales, lectinas, peroxidasa, proteínas de la coagulación, péptidas antimicrobianas y radicales libres del oxígeno y el nitrógeno. Los hemocitos son cruciales en estas reacciones inmunitarias como efectores celulares siendo capaces de realizar fagocitosis, encapsulación, formación de nódulos y de citotoxicidad (Söderhäll y Cerenius, 1992). De acuerdo con Redón *et al.* (2003), éstos se constituyen en la fracción celular de la hemolinfa y son generalmente clasificados en tres tipos, hialinos que se caracterizan por no tener gránulos, con un delgado citoplasma basófilo y un núcleo amplio en el centro, tienen capacidad fagocítica e intervienen en el proceso de coagulación, semigranulares por tener un núcleo esférico o con forma de herradura y muchos gránulos redondos, involucrados en la fagocitosis, encapsulación y liberación del sistema profenoloxidasa, sintetizan y liberan péptidos antimicrobianos y granulares que se caracterizan por ser células grandes con gránulos, con una alta relación citoplasma-núcleo, almacenan las enzimas que constituyen al sistema proPO incluso más que los semigranulosos y en el proceso de encapsulación.

La presencia de compuestos microbianos en el sistema inmune pueden activar directamente las funciones celulares de defensa (Chiu *et al.*, 2007). El género *Bacillus* ha demostrado ser productor de sustancias que mejoran la absorción de nutrientes, incrementan los niveles de proteínas y mejoran el crecimiento en diferentes organismos en la acuicultura (Nemutanzhela *et al.*, 2014), otras maneras de contrarrestar las enfermedades es inhibiendo el crecimiento de los patógenos por compuestos antagónicos, por competencia de nutrientes y espacio, mejorando la digestión de los alimentos y la utilización de los mismos por el organismo (Bomba *et al.*, 2002; Fooks *et al.*, 1999; Fuller, 1989).

La ventaja de utilizar microorganismos vivos como probióticos es que algunos degradan materia orgánica o materiales tóxicos existentes en el ambiente, mejorando así la calidad del agua empleada en los sistemas de cultivo. Esto ocurre principalmente por la acción de especies del género *Bacillus sp.* los cuales convierten de manera eficiente la materia orgánica en CO₂ disminuyendo niveles tóxicos de amonio y nitritos que pueden ser

mortales para los organismos marinos de cultivo (Nemutanzhela *et al.*, 2014). El utilizar mezclas de bacterias que generan diferentes efectos suelen tener un efecto sinérgico, inhibiendo los patógenos, mejorando la absorción de nutrientes, un efecto biorremediador mejorando la calidad del agua e inmunoestimula al organismo en cultivo (Lallo *et al.*, 2007)

3. JUSTIFICACIÓN

Uno de los factores que determinan el éxito de un cultivo en acuicultura es la calidad del agua, las condiciones y concentraciones óptimas de las variables fisicoquímicas y biológicas principalmente el pH, temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, amonio (NH_4^+), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-), fosfatos (PO_4^-) y materia orgánica. Cuando no hay un control de los parámetros antes mencionados suceden entre otras cosas, el brote de enfermedades de origen microbiano principalmente, estos incidentes causan altas mortalidades y un aumento de los precios del camarón a raíz de la escasez de la oferta y repercusiones en el comercio.

De este modo la importancia del presente trabajo tiene como finalidad regular dichas variables e inmunoestimular a los camarones (*Litopenaeus vannamei*.) para obtener un mayor crecimiento y supervivencia. Se propone un modelo de control microbiano orientado a encontrar una solución a las descargas de efluentes sin tratamiento provenientes del cultivo de camarón blanco, utilizando microorganismos que contribuyan a mejorar la calidad de agua.

4. HIPÓTESIS

Si los microorganismos aislados de los sistemas de manglar presentan características biorremediadoras e inmunoestimulantes, entonces reducirán niveles de compuestos tóxicos de nitrógeno y mejorarán la respuesta inmune en el camarón blanco en un sistema de cultivo experimental con recambio reducido de agua.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Aislar y caracterizar microorganismos con capacidad biorremediadora del manglar en la Bahía de La Paz, Baja California Sur y evaluar su efecto benéfico en el cultivo de *L. vannamei*.

5.2 Objetivos específicos

- I.- Caracterizar e identificar *in vitro* microorganismos benéficos aislados de mangle.
- II.- Determinar la calidad de agua y el crecimiento de *L. vannamei* utilizando microorganismos con potencial biorremediador en cultivos con recambios mínimos de agua.
- III.- Evaluar la capacidad inmunoestimulante de microorganismos aislados de mangle en el cultivo de *L. vannamei* por actividad enzimática de respuesta antioxidante.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Objetivo I.

6.1.1 Obtención y aislamiento de microorganismos

El aislamiento de bacterias se realizó en 2 etapas una en invierno del 2015 y otra en verano del 2016 en la zona de mangle ubicado en la carretera a Pichilingue 24°14'59.80''N, 110°18'47.12''O (Fig. 2). Se tomaron muestras de agua, sedimento, raíz externa y raíz interna, en bolsas estériles, fueron colocadas en una hielera, 30 minutos posteriores a su obtención fueron trabajadas en el laboratorio de diagnóstico microbiológico. Las muestras de raíz fueron maceradas en un mortero esterilizado por flameo utilizando solución salina al 2.5 % de NaCl, las muestras de sedimento y las muestras de agua fueron homogenizadas y se sembraron alícuotas de 1 mL en placas de Agar Potato Dextrosa (PDA, Difco) para levaduras, MRS agar (Difco) para bacilos, Agar Marino (2216 Difco) y se incubaron a 30°C por 24 horas. Para las bacterias nitrificantes se empleó un medio de cultivo líquido denominado en el medio ANM para bacterias nitrificantes, (medio 756c, Autotrophic nitrobacter medium de DSMZ, Anexo A); se incubaron por 48 horas a 35°C, posteriormente, las colonias fueron caracterizadas con base en su aspecto macroscópico (Anexo B) y representantes de cada morfotipo se seleccionaron y purificaron mediante resiembras sobre placas de agar marino, mismas que se incubaron por 48 horas a 35°C. Las cepas puras fueron caracterizadas con base a tinción de gram (Anexo C) y almacenadas en tubos de agar inclinado estéril y mantenidas a 15°C. Para su evaluación, cada cepa fue resembrada en placas de agar marino.



Figura 2. Ubicación geográfica de la zona de muestreo.



Figura 3. Izquierda: vista aérea de la zona de muestreo. b) Derecha: toma de muestra raíz, sedimento y agua.

6.1.2 Aislamiento de ADN bacteriano

Tomando una colonia aislada de cada una de las cepas se sembraron en su medio de cultivo líquido correspondiente, se incubaron por 24 horas a la temperatura ideal según cada microorganismo y se realizó la extracción de ADN de todas las cepas de interés; la extracción se realizó con el UltraClean Microbial DNA Isolation Kit. Este kit fue diseñado para una extracción de calidad de ADN genómico de microorganismos, primero las células son lisadas por la combinación de calor, detergente y fuerza mecánica, con una solución de lisis y perlas. Después los componentes de las células son lisadas por acciones mecánicas utilizando agitación en vortex. El ADN liberado es acumulado en un filtro de sílice, al lavar este filtro el ADN es recuperado en agua grado molecular.

Los productos obtenidos del termociclador se verificaron en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X a 40V por 25 minutos. Las bandas se visualizaron en un foto documentador (Biorad). Se cuantificó la concentración usando un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) y se evaluó su pureza con la relación 260/280 y 260/230.

6.1.3 Identificación molecular de las cepas

La región de interés que se amplificó mediante PCR, es la que codifica para el gen 16S ARNr. Para esto se preparó una mezcla de reacción de PCR con los primers 8F (cebador Forward) y 1492R (cebador Reverse) (8F/5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R/5'-GGTTACCTTGTTACGACT-3') (Hutson *et al.*, 1993) a un volumen final de 25 μ L con: 2 μ L de templado (100ng/ μ L), 3 μ L de MgCl₂ (1.5mM), 0.5 μ L de cada cebador (0.5 μ M), 0.5 μ L de mix dNTPs y 0.05 U/ μ L de Taq polimerasa, 2.5 μ L de Buffer 10X y 15.9 μ L de agua, con el siguiente programa: 2 minutos de desnaturalización inicial a 95°C, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 2 minutos, alineación a 58°C por 1 minutos y la extensión a 72°C por 2 minutos.

Los productos obtenidos de la amplificación se verificaron en gel de agarosa al 2 en buffer TAE 1X a 40V por 45 minutos, las bandas se visualizaron con un foto documentador (Biorad). Se realizaron alícuotas de 100 ng/ μ L y se enviaron 40 μ L para su secuenciación a los laboratorios de MacroGen (<http://www.macrogen.com>) en Seul, Korea.

Una vez obtenidas las secuencias se depuraron y alinearon utilizando el programa BioEdit para crear la cadena completa y se comparó en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) NCBI, tomando como válidas las comparaciones cuyos porcentajes de cobertura e identidad fuesen superiores al 97% (Broda *et al.*, 1999).

6.1.4 Selección de microorganismos

Se realizó la selección de los organismos que se utilizarían para las siguientes pruebas y bioensayos (Tabla I), de cada cepa que resultó en la secuenciación, se buscó información en la red y en el manual Bergey (2005, 2015) se hizo la selección de los microorganismos.

Tabla I. Lista de microorganismos seleccionados.

ID	Especie
S23	<i>Bacillus oceanisediminis</i>
S10	<i>Candida cretensis</i>
S31	<i>Rhizobium halotolerans</i>
S21	<i>Macrococcus caseolyticus</i>
RS5	<i>Bacillus sp</i>
S32N	<i>Pseudomonas balearica</i>
S32	<i>Phenylobacterium koreense</i>

6.1.5 Preservación de cepas de trabajo

Las cepas aisladas se conservaron en tubos criogénicos de 1.5 mL estériles, conteniendo 500 µL del medio de cultivo más 500 µL de glicerol como crioprotector, (al 30 % para levaduras y al 20% para bacterias); los tubos se colocaron en cajas criogénicas almacenadas a -80°C, para su uso posterior.

6.2 Objetivo II.

6.2.1 Preparación de inóculos de bacterias de prueba

Para los inóculos de las bacterias se reactivaron las cepas seleccionadas en sus medios de cultivo respectivos, 2216, PDA y MRS, después de 24 horas en incubación a 35 °C se tomaron de 2 a 3 colonias para inocularlas en el mismo medio de cultivo en líquido. Se colocaron en agitación constante a $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Una vez pasadas las 24 horas, se recolectó la biomasa por medio de centrifugación en tubos falcón de 50ml estériles, y se ajustó la densidad óptica a 1, leyendo a 540 nm para obtener 1×10^9 UFC mL^{-1} de acuerdo al estándar de McFarland y Según la fórmula: $C1V1 = C2V2$, se inoculó una concentración de 1×10^6 UFC mL^{-1} .

6.2.2 Medición de NO_2^- , NO_3^- y NH_4^+

Para la medición de estos parámetros se utilizó el kit LYSANO2 para nitritos, LYSANO3 para nitratos y LYSANH4, los cuales están basados en el método del Fenato (Standard Methods, 4500-NH3 F). La determinación de nitrato y nitrito está basada en los métodos 4500-NO3 y 4500-NO2B respectivamente (Standard Methods, 2005). Utilizando 10 mL de muestra filtrada para evitar interferencia por el material suspendido y siguiendo las instrucciones del proveedor la reacción se llevó a cabo en tubos falcón de 50 mL, para NO_2^- y NO_3^- la longitud de onda es 540 y para NH_4^+ es 640. La concentración de éstos se calcula como se indica en las siguientes ecuaciones:

$$F = \frac{0.360 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{NH}_4}{\text{Abs prom est} - \text{Abs prom bco}} \quad (1)$$

$$\text{NH}_4 \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = (\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{Bco}}) * F * \text{FD} \quad (2)$$

$$F = \frac{0.230 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{NO}_2}{\text{Abs prom est} - \text{Abs prom bco}} \quad (3)$$

$$\text{NO}_2 \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = (\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{Bco}}) * F * \text{FD} \quad (4)$$

$$F = \frac{0.310 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{NO}_3}{\text{Abs prom est} - \text{Abs prom bco}} \quad (5)$$

$$\text{NO}_3 \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = (\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{Bco}}) * F * \text{FD} \quad (6)$$

6.2.3 Bioensayo I. Calidad de agua

Con la finalidad de evaluar la interacción y el comportamiento de los metabolitos NO_2^- y NH_4^+ , bajo el efecto de los microorganismos seleccionados, en el Laboratorio Húmedo de Genómica del CIBNOR se realizaron 2 bioensayos con duración de 5 días cada uno de ellos, en matraces de 500 mL, con 200 mL de agua de mar filtrada con una concentración inicial de 15 mgL^{-1} de NO_2^- nitrito de sodio y para NH_4^+ sulfato de amonio 3 mgL^{-1} , más 2 controles los cuales se colocaron dentro jvasas con capacidad de 20 L con 6 L de agua para obtener una temperatura de $29 \pm 1^\circ\text{C}$ con un calentador (Fig. 4), con aireación moderada y constante. El primer control consistió en solo agregar agua y el segundo (C+) en agregar la misma concentración del metabolito, sin ningún otro aditivo.

Para los inóculos se llevó a cabo el procedimiento descrito anteriormente en el punto 6.2.1, Se inocularon 2 mL de la solución de microorganismos en los 2 L de agua, obteniendo así una concentración de $1 \times 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$. Los tratamientos están en la tabla II.

Tabla II. Tratamientos evaluados en bioensayo I.

ID	Tratamiento
C	N/A
C+	N/A
S23	<i>Bacillus oceanisediminis</i>
S10	<i>Candida cretensis</i>
S31	<i>Rhizobium halotolerans</i>
S21	<i>Macrocooccus caseolyticus</i>
RS5	<i>Bacillus sp</i>
S32N	<i>Pseudomonas balearica</i>
S32	<i>Phenylobacterium koreense</i>

*N/A no aplica.



Figura 4. Unidad experimental bioensayo I. Matrices de 500 mL, aireación continua y temperatura controlada con baño María (n=3).

6.2.4 Bioensayo II. Calidad de agua con camarones 0% de recambio de agua

Para las unidades experimentales se utilizaron recipientes rectangulares con capacidad de 4 L, a las cuales se les adiciono 2 L de agua de mar filtrada, clorada y neutralizada, con aireación continua. En cada uno de los recipientes se colocaron 2 camarones, con una biomasa promedio de 4.2 gr. La temperatura de los recipientes se reguló colocando los recipientes dentro de jvas de 20 L de capacidad, con agua a $29 \pm 1^\circ\text{C}$ regulada con calentadores. Se realizaron 3 tratamientos y un control negativo (Tabla III), por triplicado. Los camarones fueron alimentados 2 veces al día con el 6% de su peso. El experimento duró 11 días, se tomaron las mediciones de los metabolitos NO_2^- , NO_3^- y NH_4^+ , los días 0, 3, 5, 7, 9 y 11. Se hizo el inóculo de los tratamientos los días 7 y 9, contemplando la acumulación de los metabolitos.

Tabla III. Tratamientos evaluados en el bioensayo II.

ID	Tratamiento
C	N/A
S23	<i>Bacillus oceanisediminis</i>
S10	<i>Candida cretensis</i>
MIX	Mezcla de los 7 microorganismos *

N/A no aplica. *Ver Tabla I

6.3 Objetivo III

6.3.1 Bioensayo III. Calidad de agua con camarones 8-10% recambio de agua

Este bioensayo se realizó por triplicado y consistió en tres tratamientos y 2 controles (Tabla IV), en unidades experimentales de 50 L, se agregaron 35 L, a una densidad de 20 camarones con una biomasa promedio de 3.27 gr; los cuales fueron inoculados con las bacterias a los 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 días y las mediciones de los metabolitos los días 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21, los camarones se midieron y pesaron semanalmente, hasta culminar el bioensayo que duró 21 días, empleando la siguiente fórmula para determinar la tasa de crecimiento

$$\text{Tasa de Crecimiento \%} = \frac{\text{Ln peso final} - \text{Ln peso inicial}}{\text{Número de días}} \times 100 \quad (7)$$

Al término del bioensayo, se tomó muestra de 6 organismos por tanque, 3 de ellos para hacer pruebas enzimáticas y conteo de hemocitos circulantes y los restantes para análisis moleculares. Se extrajo hemolinfa de la base del pleópodo del primer segmento abdominal, utilizando una jeringa de 1mL previamente cargada con 200 µL de solución anticoagulante fría a 4°C (27mM de citrato de sodio, 385 mM NaCl, 115 mM glucosa, con pH 7.5, se le agregó DEPC para degradar cualquier RNASA). La hemolinfa fue colocada en tubos eppendorft de 1.5 mL y colocados en hielo para que al término del muestreo estos se congelaran en nitrógeno líquido los organismos para su traslado al ultracongelador a -80°C.

Tabla IV. Tratamientos evaluados en el bioensayo II.

ID	Tratamiento
C	N/A
INM	MacroGard®
S23	<i>Bacillus oceanisediminis</i>
S10	<i>Candida cretensis</i>
MIX	Mezcla de los 7 microorganismos*

N/A no aplica. *Ver tabla I

6.3.2 Conteo de hemocitos

Para el conteo de hemocitos circulantes totales (CHCT) y las pruebas enzimáticas, se hicieron diluciones con el mismo anticoagulante para tener la misma concentración en todas las muestras. Se centrifugó a 10000 g por 10 minutos, se guardó el suero en tubos nuevos y se resuspendió el pelet en solución anticoagulante. Las muestras usadas para evaluar la actividad enzimática se congelaron en nitrógeno líquido y después se guardaron a -80°C y para CHCT se fijaron con formol al 4%, se colocaron 40 µL de la hemolinfa y 160 µL de la solución fijadora para tener una dilución 1:5 (Campa-Córdova *et al.*, 2002)

El conteo de hemocitos se realizó con la ayuda de un hematocitómetro, cámara de Neubauer, contando 2 cuadrantes y tomando el promedio de éstos, se tomaron fotos en el microscopio para el conteo posterior. Los hemocitos se reportaron en células por mililitro, para ello: CHCT = se multiplica el promedio * 10,000 * factor de dilución con la solución anticoagulante (2) * el factor de la solución fijadora (5).

$$CHCT = \Delta * 10000 * FD * FSF \quad (8)$$

6.3.3 Análisis de sistema antioxidante

Hemolinfa

Para el análisis de la actividad SOD en hemocitos se utilizó SOD Determination Kit (Sigma, Num. Cat. 19160) el que determina el porcentaje de inhibición del sustrato Xantina oxidasa y se relaciona directamente con la reducción de O₂. La preparación de las muestras se llevó a cabo como se indica en la tabla V (Anexo D), se utilizaron 3 blancos y se realizaron las mediciones por duplicado.

Las reacciones se llevaron a cabo en micro placa de 96 pozos, se incubaron a 37°C por 20 minutos y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 450 nm. El cálculo se realizó de la siguiente manera:

$$(\% \text{ inhibición SOD}) = \frac{(AbsBlanco1 - AbsBlanco3) - (AbsMuestra - AbsBlanco2)}{Absblanco1 - AbsBlanco3} * 100 \quad (9)$$

Músculo

Para la actividad SOD en músculo se tomaron los camarones guardados a -80°C y con un equipo de disección se tomaron 0.1 gramos de tejido muscular y se colocó en 1 ml de buffer (solución amortiguadora de fosfatos y EDTA (50 mM ph.7.0)) para ser homogenizado por un disruptor de tejidos.

Una vez homogenizado el tejido, se centrifugó a 1500 g por 5 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en baño de hielo hasta que se realizó la prueba.

El análisis se realizó con el Kit de Cayman "Superoxide Dismutase Assay kit" (Item No. 706002) la reacciones se realizaron por duplicado en microplaca. Una vez agregado los reactivos (Anexo E), se agitó un poco la placa para homogenizar, se tapó la microplaca y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente con movimiento oscilatorio. Se leyó la absorbancia a 440 nm.

Para calcular la concentración de SOD en las muestras se realiza una curva estándar (Anexo E)

El cálculo de los resultados de SOD se realizó de la siguiente manera:

$$SOD(U/mL) = \left(\frac{\text{Muestra LR}-y\text{-Intercepto}}{\text{Pendiente}} \right) (.023mL/.01mL) * \text{Dilución Muestra} \quad (10)$$

Actividad enzimática GST

El análisis de la actividad glutatión s-transferasa (GST) en músculo se utilizó el Kit de – Cayman, “Glutathione S-Transferasa Assay Kit” (Item No703002). Esta prueba mide la actividad total de GST, midiendo la conjugación de 1-Cloro-2,4dinitrobenceno con glutatión reducido, Esta conjugación está asociada con el incremento de absorbancia a 340 nm, la proporción de incremento, es directamente proporcional a la actividad GST. Para la obtención de las muestras se llevó a cabo el mismo procedimiento que con SOD en músculo, cambiando únicamente la centrifugación a 10,000 g por 15 minutos a 4°C.

Una vez preparados los pozos con los primeros 3 reactivos y la muestra (Anexo F) se comenzó la reacción agregando el CDNB rápidamente. Los resultados fueron leídos a 340nm cada minuto durante 5 minutos y calculados de la siguiente forma:

$$\Delta A_{340}/\text{min} = (A_{340}(\text{Tiempo}2) - A_{340}(\text{Tiempo}1)) / (\text{Tiempo}2 - \text{Tiempo}1) \quad (11)$$

Determinación de la tasa de la reacción. Graficando los valores de absorbancia con el tiempo, para obtener una pendiente. Se determinó la tasa de Absorbancia 340/min de los blancos y se les restó a los blancos.

Para calcular la actividad GST, se utilizó la siguiente fórmula:

$$GST \text{ actividad} = \left(\frac{\Delta A_{340}/\text{min}}{.00503\mu M} \right) * \left(\frac{.2mL}{.02mL} \right) * \text{Dilución} \quad (12)$$

6.4. Análisis estadísticos

Se realizaron pruebas de homogeneidad de varianzas de Levene y de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnoff a cada réplica por tratamiento experimental para inferir la normalidad y homocedasticidad de los datos.

Se utilizaron ANOVAS de una vía, junto con pruebas de rangos múltiples de medias de Tukey, para detectar diferencias significativas en los valores de Nitrato, Nitrito, Amonio, crecimiento, conteo de hemocitos y actividad enzimática (SOD y GST) en función de los tratamientos suministrados. Para todos los análisis efectuados, el nivel de significancia se fijó a una $P \leq 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando los programas estadísticos Statistica (Ver. 7.0, SoftStat Inc., Tulsa, OK, E.U.A.)

7. RESULTADOS

7.1 Selección de microorganismos

De los muestreos realizados en el presente trabajo se seleccionaron 7 microorganismos. 6 bacterias y 1 levadura, provenientes de sedimento y raíz. Las cuales fueron incorporadas al cepario de referencia del CIBNOR, registrando con un ID para futuras pruebas del presente proyecto (Tabla X).

Tabla V. Características de microorganismos seleccionados.

ID	Especie	Código Acceso	% Identidad	Gram	Hemólisis
S23	<i>Bacillus oceanisediminis</i>	NR_117285.1	99	(+)	γ
S10	<i>Candida cretensis</i>	KU 316775.1	97	Levadura	γ
S31	<i>Rhizobium halotolerans</i>	NR_125632.1	99	(-)	γ
S21	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	NR_119262.1	99	(+)	γ
RS5	<i>Bacillus sp</i>	NR_113265.1	99	(+)	γ
S32N	<i>Pseudomonas baleárica</i>	NR_025972.1	99	(-)	γ
S32	<i>Phenylobacterium koreense</i>	NR_114055.1	99	(-)	γ

7.2 Bioensayo I Calidad de agua

Al realizar el análisis de NH_4^+ (Fig. 4) las concentraciones iniciales de los metabolitos fueron controladas, con este bioensayo se pudo descartar a RS5 (*Bacillus sp*) como biorremediador ya que no tuvo diferencias significativas para ninguno de los dos metabolitos evaluados; resultó igual al control positivo, sin embargo se utilizó en los siguientes bioensayos en el tratamiento MIX para evaluar el crecimiento y la respuesta inmune de los organismos.

Los tratamientos que registraron valores significativamente menores de amonio ($P < 0.05$) respecto al control fueron S31 y S23. Se puede observar como hay una disminución rápida del metabolito en las primeras 24 horas después del inóculo, esto puede explicarse por la

volatilidad del amonio. S23 (*B. oceaonosediminis*) fue el microorganismo con mejor respuesta. Disminuyó la concentración de amonio significativamente (0.057 ± 0.23 mgL⁻¹) (Fig. 5), respecto al control (1.12 ± 0.19 mgL⁻¹) y se puede enlazar con los resultados obtenidos en la valoración de nitritos (Fig. 6), donde fue el tratamiento con mayor concentración (20.09 ± 1.3 mgL⁻¹), ya que el amonio es oxidado a nitritos (James *et al.*, 2006), los otros tratamientos fueron iguales estadísticamente al control positivo. Coincidiendo con el análisis anterior donde S23 redujo la concentración de NH₄⁺ acumulándose así NO₂⁻.

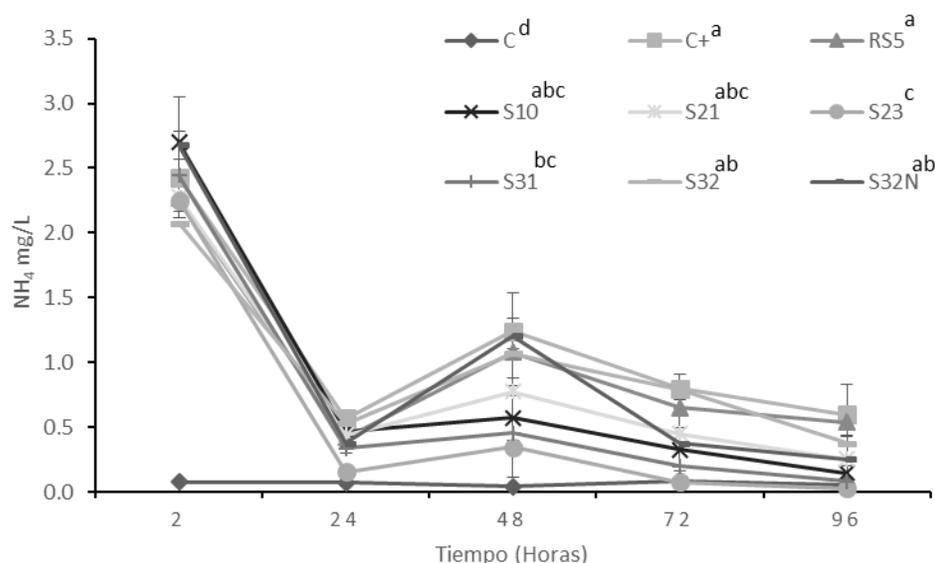


Figura 5. Concentración de amonio en un periodo de 96 horas. 7 tratamientos: (S23) *Bacillus oceanisediminis*, (S10) *Candida cretensis*, (S31) *Rhizobium halotolerans*, (S21) *Macrococcus caseolyticus*, (RS5) *Bacillus sp.* (S32N) *Pseudomona baleárica*, (S32) *Phenylobacterium koreense*, (C) control y (C+) control positivo (n=3). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$), los datos representan la media \pm error estándar.

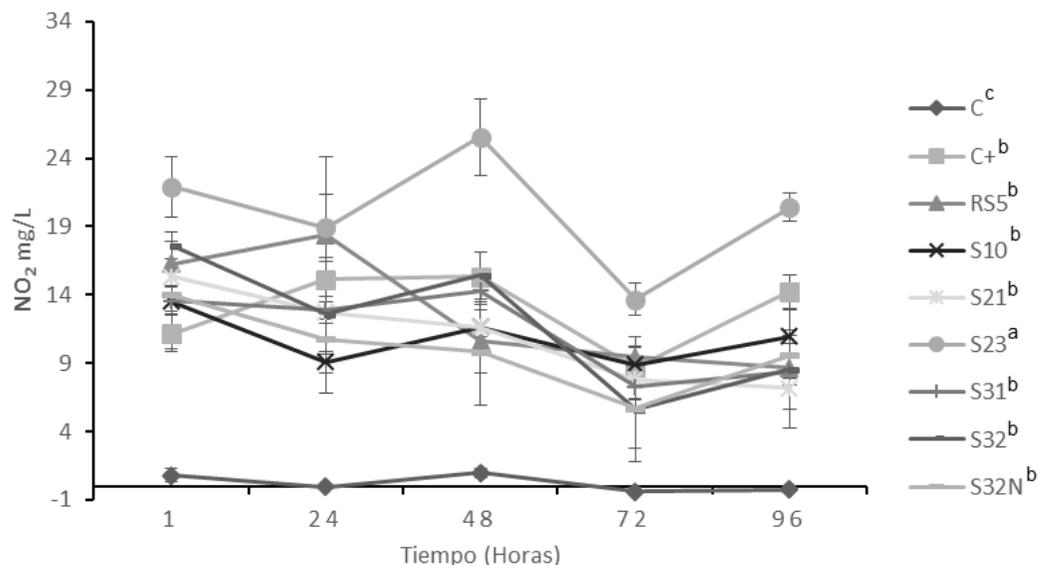


Figura 6. Concentración de nitrito en un periodo de 96 horas. 7 tratamientos: (S23) *Bacillus oceanisediminis*, (S10) *Candida cretensis*, (S31) *Rhizobium halotolerans*, (S21) *Macrocooccus caseyiticus*, (RS5) *Bacillus sp.* (S32N) *Pseudomona baleárica*, (S32) *Phenylobacterium koreense*, (C) control y (C+) control positivo (n=3). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$), los datos representan la media \pm error estándar.

7.3 Bioensayo II y Bioensayo III

Bioensayo II.

En la gráfica de amonio (Fig. 7), se puede apreciar el aumento del metabolito cuando se hace el inóculo los días 7 y 9, se observa que para el día 11 de cultivo, los valores promedio de amonio de los tratamientos son superiores al grupo control, excepto el tratamiento S10, no se registraron diferencias significativas respecto al control ($P > 0.05$). El tratamiento con mayor concentración promedio de amonio fue MIX ($P < 0.05$).

En la figura 8, se puede apreciar el aumento NO_2^- hasta día 7, donde hay una disminución de la concentración en todos los tratamientos, continuando hasta el final del experimento, a excepción del tratamiento S23, donde la concentración de NO_2^- , aumenta para el día 11, S23 ($0.028 \pm 0.03 \text{mgL}^{-1}$) obteniendo la mayor cantidad de nitritos, seguida del tratamiento

MIX ($0.027 \pm 0.03 \text{mgL}^{-1}$), ambos mostrando diferencias significativas respecto al control y a S10 ($0.024 \pm 0.02 \text{mgL}^{-1}$) ($P < 0.05$).

En cuanto al análisis de concentración de nitrato (Fig. 9), el tratamiento MIX fue diferente significativamente de los tratamientos S10 y S23. Sin embargo no hubo diferencias significativas con el control ($P > 0.05$).

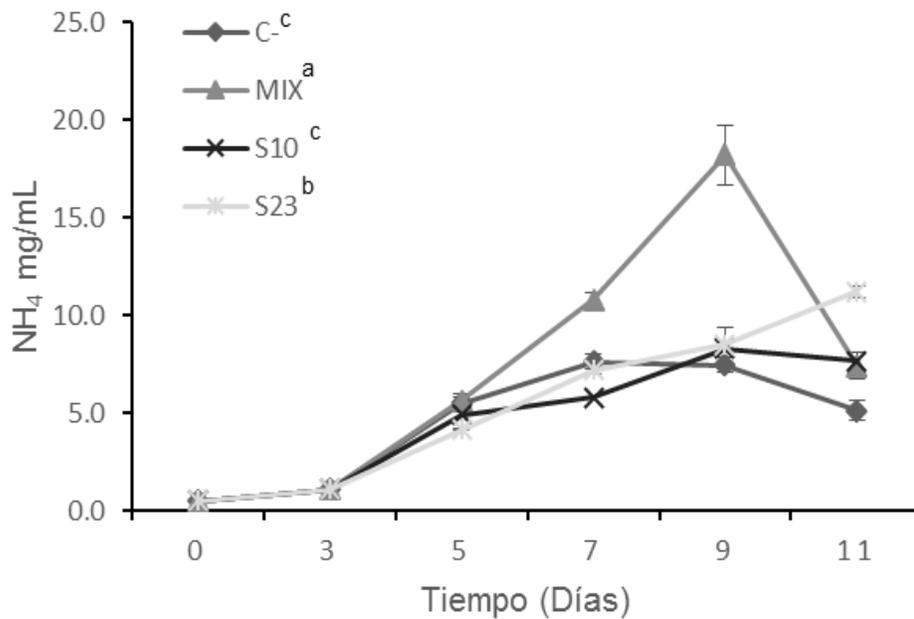


Figura 7. Concentración de amonio. Tratamientos: (S10) *Candida cretensis*, (S23) *Bacillus oceanisediminis*, (MIX) mezcla de microorganismos, (C-) control (n=3). Las letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$), los datos representan la media \pm error estándar.

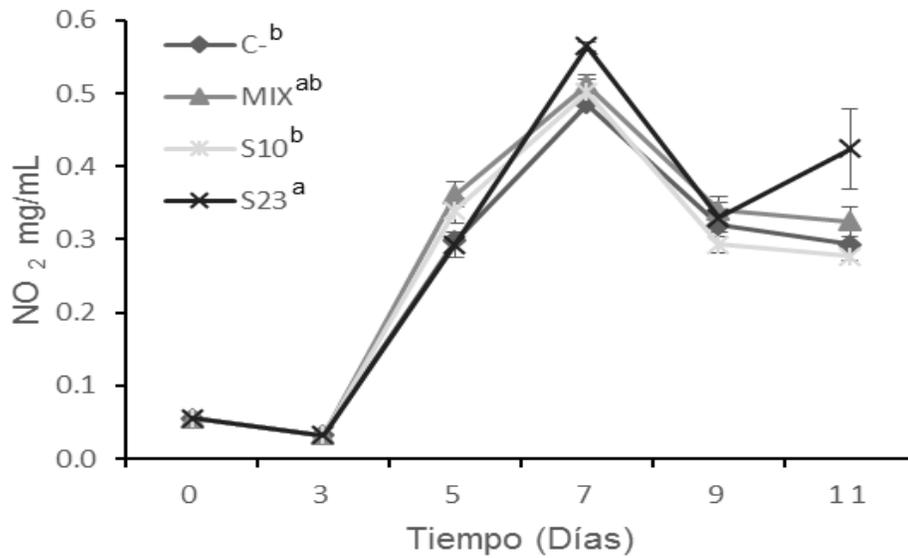


Figura 8. Concentración de nitrito en los diferentes tratamientos. (S10) *Candida cretensis*, (S23) *Bacillus oceanisediminis*, (MIX) mezcla de microorganismos, (C-) control (n=3). Las letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$), los datos representan la media \pm error estándar.

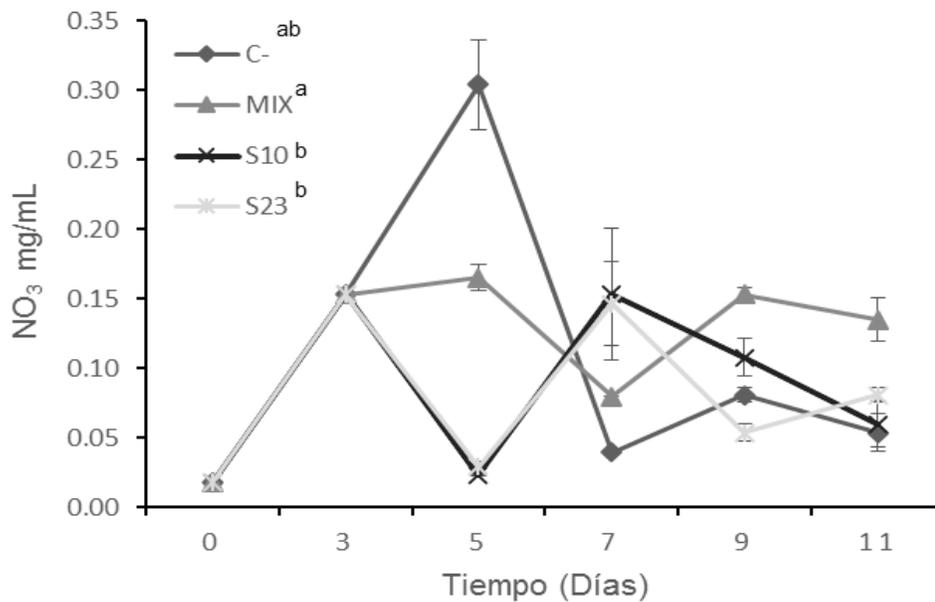


Figura 9. Concentración de nitrato. Tratamientos: (S10) *Candida cretensis*, (S23) *Bacillus oceanisediminis*, (MIX) mezcla de microorganismos, (C-) control (n=3). Las letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$), los datos representan la media \pm error estándar.

Bioensayo III.

En la figura 10 se puede observar el incremento de NH_4^+ al avanzar los días, para el día 14 y 18, teniendo las concentraciones más altas. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos S10 y S23, respecto a los controles y MIX. Siendo S10 el tratamiento que redujo de manera más eficiente la concentración del metabolito.

Para la valoración de nitritos se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$), los tratamientos evaluados resultaron con mayor concentración que los controles (Fig. 11)

Por último en nitratos, los tratamientos MIX y S23 fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) a los controles, al inmunoestimulante (INM) y a la levadura (S10) siendo estos últimos los tratamientos con las concentraciones más bajas de nitratos (Fig. 12).

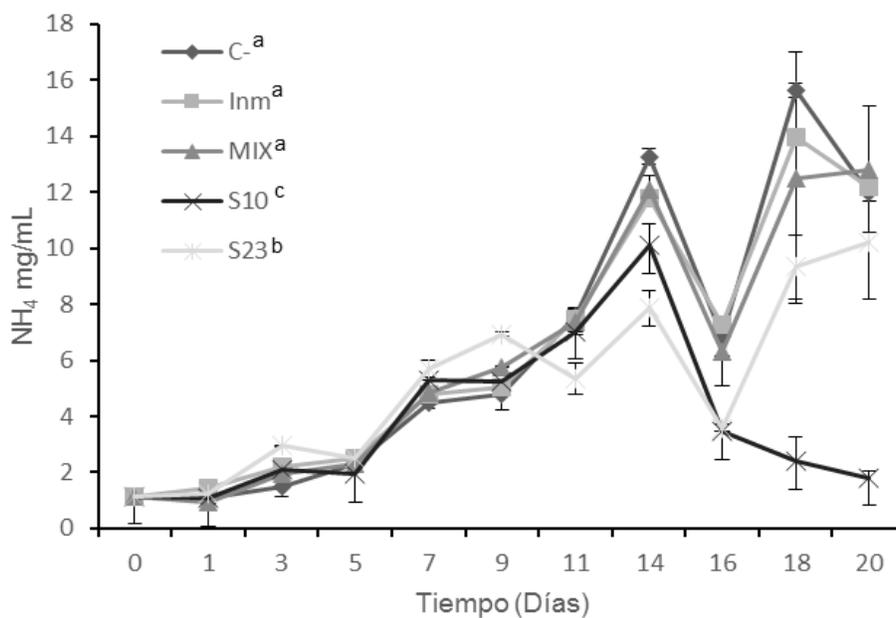


Figura 10. Concentración de amonio en los diferentes tratamientos, unidades experimentales con recambios mínimos de agua. (S10) *Candida cretensis*, (S23) *Bacillus oceanisediminis*, (MIX) mezcla de microorganismos, (C) control y (INM) control positivo (n=3). Las letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$), los datos representan la media \pm error estándar.

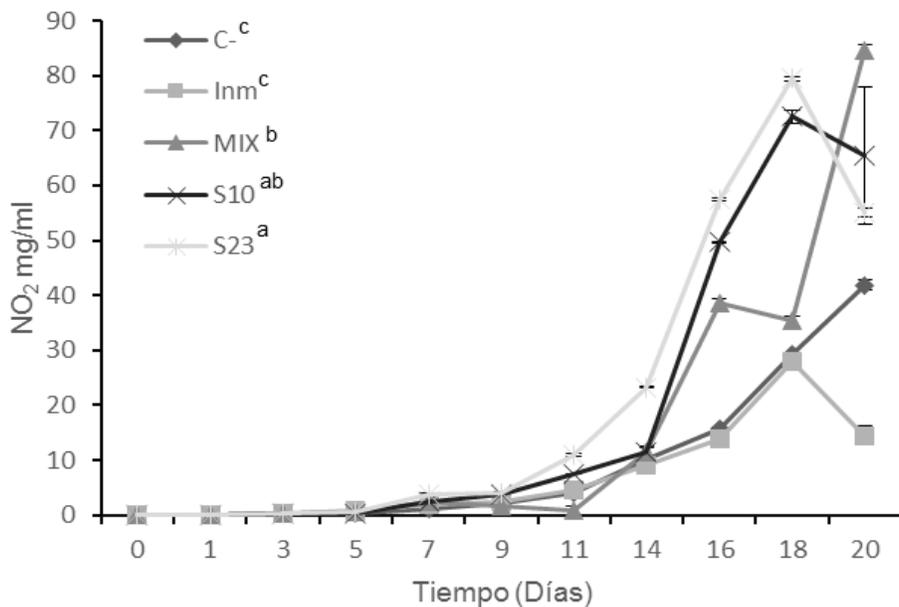


Figura 11. Concentración de nitrito en los diferentes tratamientos, unidades experimentales con recambios mínimos de agua. (S10) *Candida cretensis*, (S23) *Bacillus oceanisediminis*, (MIX) mezcla de microorganismos, (C) control y (INM) control positivo. (n=3). Las letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$), los datos representan media \pm error estándar.

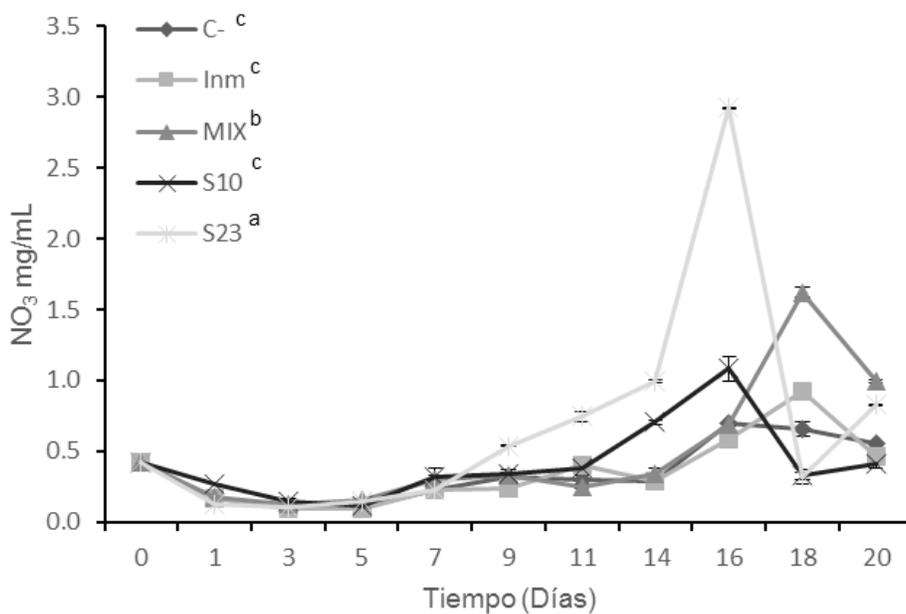


Figura 12. Concentración de nitrato en los diferentes tratamientos, unidades experimentales con recambios mínimos de agua. (S10) *Candida cretensis*, (S23) *Bacillus oceanisediminis*, (MIX) mezcla de microorganismos, (C) control y (INM) control positivo. (n=3). Las letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$), los datos representan media \pm error estándar.

Para el bioensayo II (cero recambios) y bioensayo III (recambios bajos) ambos con la misma densidad de camarones. A pesar de las condiciones diferentes de cultivo, los resultados fueron similares, incluso con el bioensayo I (*in vitro*) destacando los microorganismos S23 (*B. oceanosediminis*) y S10 (*C. cretensis*).

En los bioensayos II y III, se puede observar la acumulación continua de los metabolitos al paso del tiempo ya que no hubo recambios (BI) o hubo recambios reducidos de agua (BII5-8%), el amonio es producido principalmente por la excreción directa de los camarones (Zapata y Sánchez, 1997) y las bacterias nitrificantes se encargan de oxidarlos a nitritos y luego a nitratos, tendiendo a haber una acumulación de nitritos en los estanques (Emerenciano *et al.*, 2011),

Para la evaluación de amonio en ambos bioensayos con camarones, S10 fue el tratamiento con menor concentración de amonio (BI $4.20 \pm 0.56 \text{ mgL}^{-1}$ BII $3.88 \pm 0.48 \text{ mgL}^{-1}$), seguido del tratamiento S23 (BI $5.16 \pm 0.7 \text{ mgL}^{-1}$, BII $5.17 \pm 0.54 \text{ mgL}^{-1}$).

7.4. Parámetros de crecimiento

No se encontraron diferencias significativas en el incremento en talla y peso de los organismos ($P > 0.05$) (Figs. 13 y 14), sin embargo en la tasa de crecimiento se encontraron diferencias significativas con los tratamientos S23 y S10 respecto a los controles y al tratamiento MIX. Los organismos tratados con la cepa S10 aumentaron más rápido de talla que los organismos sometidos a los demás tratamientos (Fig. 15).

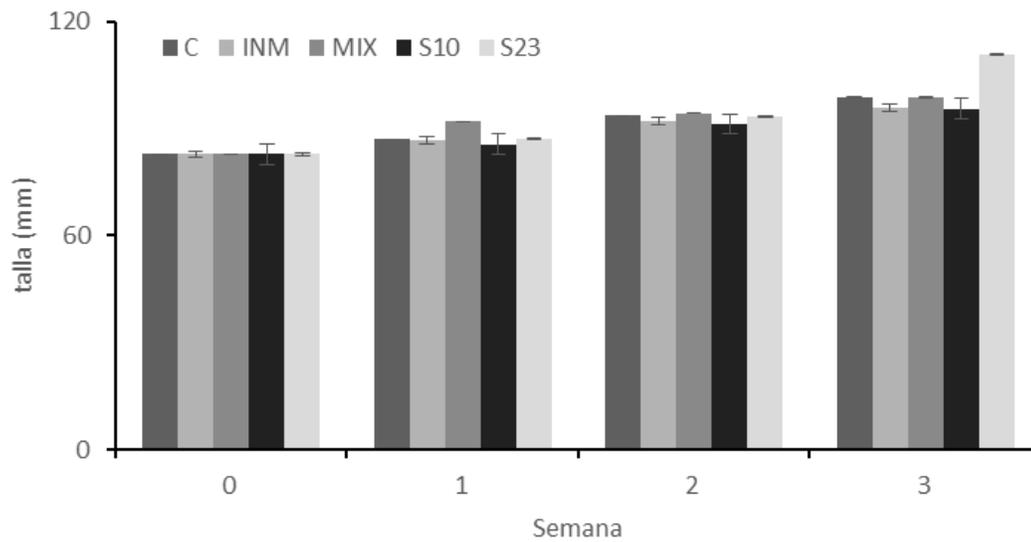


Figura 13. Talla de los organismos muestreados semanalmente. (S10) *Candida cretensis*, (S23) *Bacillus oceanisediminis*, (MIX) mezcla de microorganismos, (C) control y (INM) control positivo (n=20). Sin diferencias significativas ($P>0.05$), Los datos representan la media \pm error estándar.

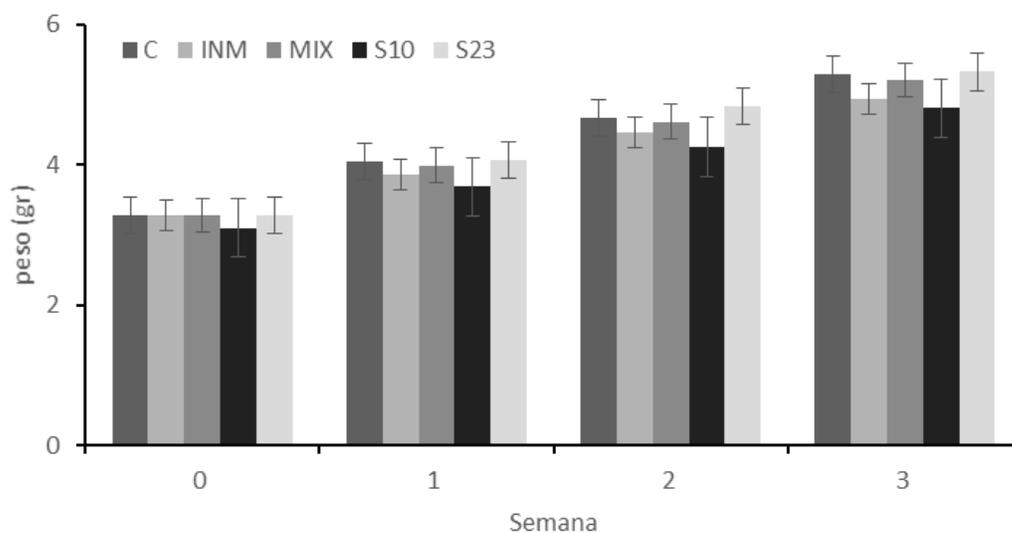


Figura 14. Peso de los organismos muestreados semanalmente. (n=20). (S10) *Candida cretensis*, (S23) *Bacillus oceanisediminis*, (MIX) mezcla de microorganismos, (C) control y (INM) control positivo (n=20). Sin diferencias significativas ($P>0.05$) los datos representan la media \pm error estándar.

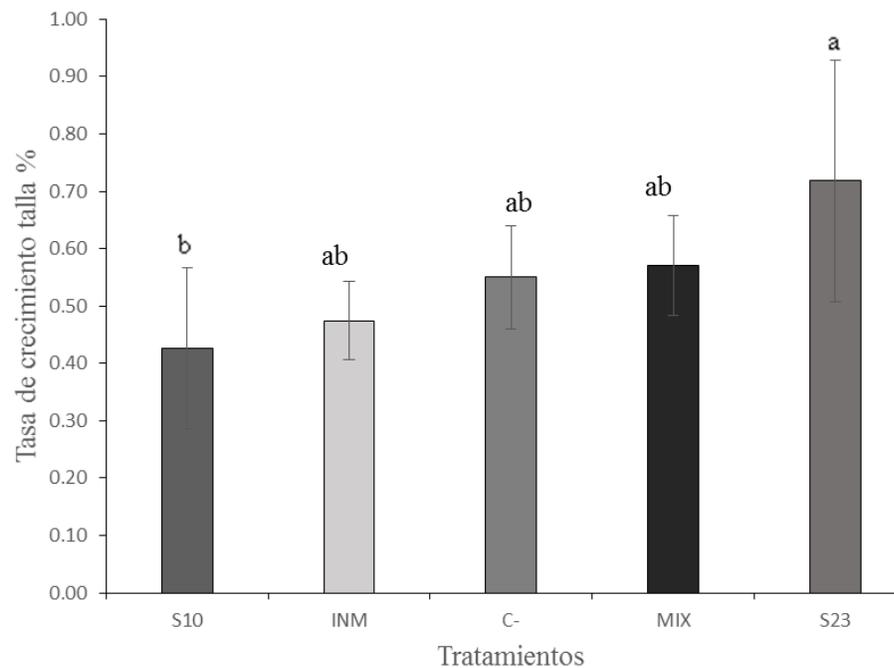


Figura 15. Tasa de crecimiento de los diferentes tratamientos. (S10) *Candida cretensis*, (S23) *Bacillus oceanisediminis*, (MIX) mezcla de microorganismos, (C) control y (INM) control positivo (n=20). Las letras diferentes denotan las diferencias significativas ($P < 0.05$), los datos representan la media \pm error estándar.

7.5. Conteo total de hemocitos circulantes

El conteo de hemocitos circulantes no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$), sin embargo los valores promedio del conteo de hemocitos en los tratamientos S10 y MIX fue mayor que los controles y el tratamiento S23. (Fig. 16)

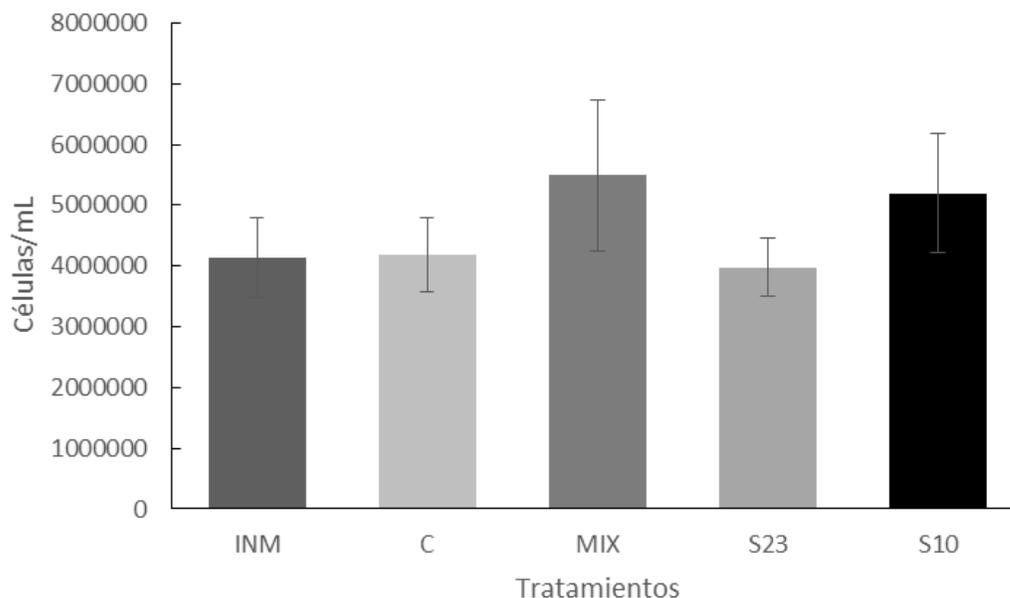


Figura 16. Conteo total de hemocitos circulantes al término del bioensayo. No existen diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$) ($n=9$). Los datos representan la media \pm error estándar.

7.6. Respuesta enzimática

Actividad de SOD

Hemolinfa

Los camarones tratados con S10 presentaron significativamente mayor actividad de la enzima SOD ($P < 0.05$; $25.52 \pm 4.32\%$) que los del grupo de control positivo tratado con alimento suplementado con el inmunostimulante MacroGard® ($P < 0.05$; $6.52 \pm 1.06\%$) en hemocitos (Fig. 17), sin embargo no es comparable con los resultados obtenidos en la evaluación de SOD en músculo, donde no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$) (Fig. 18), en la evaluación de GST (glutación s-transferasa) en músculo los resultados tampoco arrojaron diferencias significativas (Fig. 19).

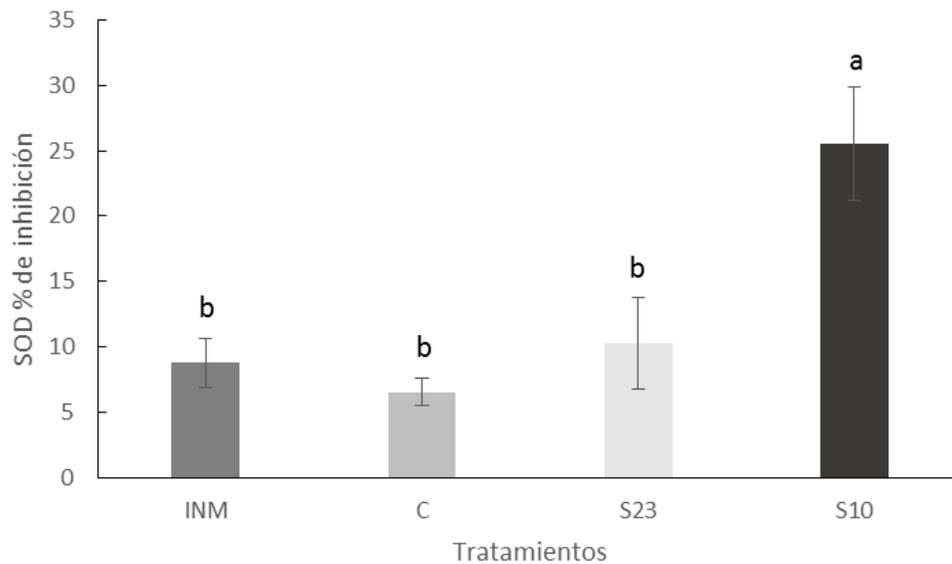


Figura 17. Efecto de los tratamientos en la actividad SOD en hemocitos. Efecto de los tratamientos. Los datos representan la media \pm error estándar (n=9). Las letras denotan diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento S10 (*Candida cretensis*), los controles y el tratamiento S23 (*Bacillus oceanisediminis*). Los datos representan la media \pm error estándar.

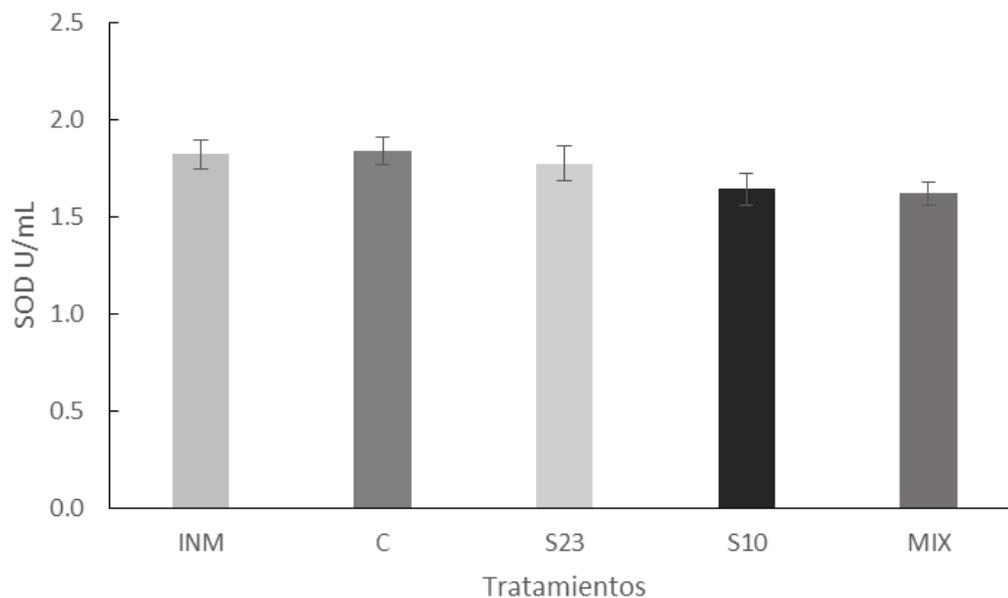


Figura 18. Actividad enzimática de superóxido dismutasa en tejido muscular de camarón blanco, expuestos a los distintos tratamientos (n=3). Sin diferencias significativas ($P > 0.05$). Los datos representan la media \pm error estándar.

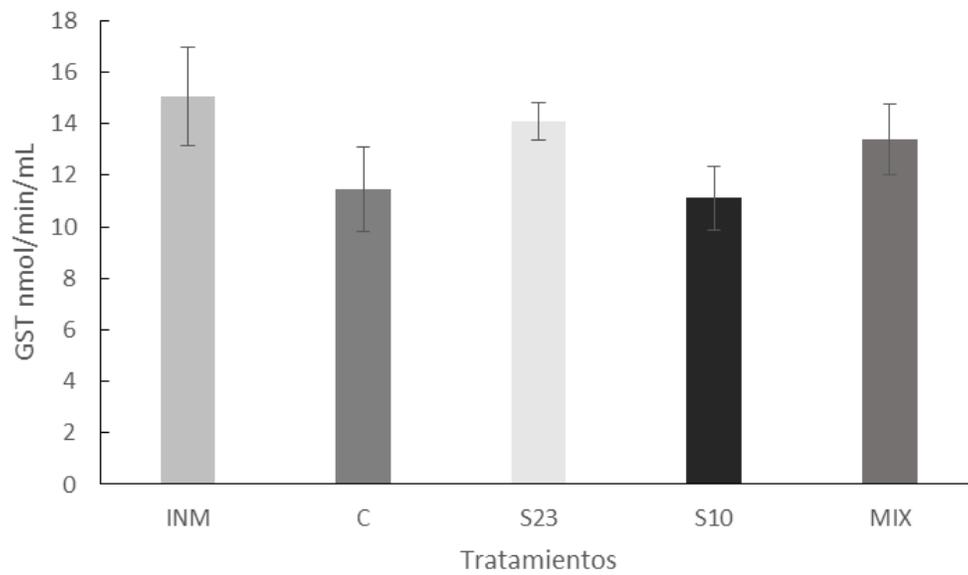


Figura 19. La actividad de la enzima GST en tejido muscular de camarón blanco, expuestos a los distintos tratamientos. Sin diferencias significativas ($P > 0.05$) ($n=3$). Los datos representan la media \pm error estándar.

8. DISCUSIÓN

Objetivo I.

En este trabajo, se consiguió corroborar que *Bacillus oceanisediminis* lleva a cabo la reducción de nitratos y se puede ver en los distintos bioensayos como consiguió mantener un equilibrio entre los metabolitos. Siendo el microorganismo con mayor actividad benéfica, mejorando la calidad del agua. *B. oceanisediminis*, es una bacteria gram positiva y aerobia facultativa, tolerante a 25 % w/v de NaCl, con sistemas de fosfotransferasas, lo que le permite tener diferentes fuentes de carbono, como glucosa, manitol, sacarosa, maltosa y fructosa, (Lee y Lee, 2012). Reduce nitratos (Maher, 2017, Zhang *et al.*, 2010) fija nitrógeno (Yousuf *et al.*, 2017) y reduce arsénico, ha sido aislada de lugares contaminados, siendo una bacteria con potencial biorremediador (Lee y Lee, 2012).

Bacillus sp. (RS5) Bacteria gram positiva, formadora de esporas, es el género que más se ha probado en la acuicultura, como próbióticos, removedor de nutrientes y patógenos. Nemutanzhela *et al.* (2014) reporta que este género ha demostrado ayudar a mejorar la absorción de nutrientes, incrementando así los niveles de proteínas y la talla de organismo en cuestión y al mismo tiempo disminuye los niveles tóxicos de amonio y nitritos que pueden ser mortales para los organismos marinos de cultivo.

En este trabajo, no se encontraron diferencias significativas con nuestra cepa RS5, discrepando con varios trabajos, sin embargo la cepa S23 cumple con lo sugerido por varios autores donde el género *Bacillus* vía nitrificación y/o denitrificación reducen las concentraciones de amonio y nitrito (Kim *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2005) agregando a esto la oxidación de nitrito a nitratos.

Candida cretensis. Levadura que ha sido aislada de alimentos y de materia orgánica, lleva a cabo la fermentación de glucosa, galactosa, trehalosa y cellobiosa (Quirós, 2008). No se encontraron artículos donde esta levadura fuera utilizada, con propósitos de inmunoestimulación o biorremediación, la han vinculado solamente con la inhibición de la angiotensina para el ser humano, disminuyendo así el riesgo de aumento de presión arterial y la vasoconstricción (Sang-Min y Jong-Soo, 2016). Siendo homóloga la hemolinfa a la sangre del ser humano, se puede asumir que actúa sobre ésta, ayudando al organismo a

estar más alerta a futuras infecciones o enfermedades, como fue observado en este estudio, siendo el tratamiento con mayor expresión SOD en hemolinfa. Al ser una levadura tiene β -glucanos en su pared celular, que actúan como promotores de la activación inespecífica del sistema inmune, pudiéndose comparar con el tratamiento INM donde fue suministrado MacroGard® rico en β -glucanos.

Otras cepas que se han aislado de ambientes contaminados, como *Bacillus oceanosediminis*, *Rhizobium halotolerans* y *Pseudomonas baleárica*, demostrando poder degradar compuestos químicos contaminantes de la zona (Bennasar et al., 1996; Diange & Lee, 2013). En este trabajo *R. halotolerans* logró reducir la concentración de amonio, se reporta como fijadora de nitrógeno (Sawada et al., 2003) y *P. baleárica* es una bacteria denitrificante vigorosa (Bennasar et al., 1996).

Objetivo II.

Montoya *et al.* (2002) reportan que el nitrógeno inorgánico está conformado en su mayoría, por NH_4^+ seguido por NO_3^- y NO_2^- , sin embargo en el presente trabajo nuestros resultados difieren, en el bioensayo II, tenemos el siguiente orden: NH_4^+ seguido por NO_2^- y NO_3^- y en el bioensayo III : NO_2^- seguido por NH_4^+ y NO_3^- . Estos resultados se pueden atribuir a la duración de los bioensayos, la tasa de recambio de agua y microorganismos que se encuentran naturalmente en el agua (Montoya *et al.*, 2002).

De acuerdo con lo reportado por Cohen *et al.* (2005) bajas concentraciones de NO_2^- significan la completa oxidación del NH_4^+ a NO_3^- ; lo anterior, corresponde a lo observado al comienzo de este bioensayo II en donde se tuvieron bajas concentraciones de NO_2^- y altas concentraciones de NH_4^+ , Por el tiempo de duración del mismo, los niveles de nitrito no alcanzaron a acumularse lo suficiente para considerarse una concentración tóxica. La máxima concentración promedio fue al día 7 ($0.515 \pm 0.009 \text{ mgL}^{-1}$) resultando una disminución después de este punto (Fig. 7).

Por otro lado en el bioensayo III, la acumulación y el aumento de nitritos a partir del día 14, los valores ($13.08 \pm 1.24 \text{ mgL}^{-1}$) estuvieron por encima del valor más bajo de LC50 (10.7 mgL^{-1}) reportado por Ostrensky y Wasieñesky en 1995. Sin embargo, esto no

ocasionó mortalidad alguna. Los controles y MIX fueron los tratamientos con los valores más bajos siendo diferentes a los tratamientos S10 y S23 ($P < 0.05$). S23 ($20.19 \pm 3.90 \text{ mgL}^{-1}$) obtuvo la mayor concentración reafirmando los resultados del bioensayo I y II. Probablemente la actividad denitrificante de los tratamientos fue inhibida por la concentración alta de nitritos a partir del día 16, que estuvo por encima de 20 mgL^{-1} similar a los resultados que obtuvieron Yu *et al.* (2005).

Para los últimos días de este bioensayo, las concentraciones de NO_2^- fueron preocupantes, sin embargo no se notaron cambios en los comportamientos de los organismos en los tratamientos S23, S10 y MIX, donde los valores estuvieron por encima de los 40 mgL^{-1} . Ostrensky y Wasieñesky (1995) reportan que una exposición por 48 horas a concentraciones mayores a las obtenidas, existe una mortalidad del 50%, sin embargo hubo el 100% de supervivencia. Para explicar el aumento de nitritos, se puede inferir que el amonio fue oxidado a nitrito, de igual manera el agua de los recambios, no era libre de microorganismos, pudiendo haber en ella bacterias del género *Bacillus* denitrificantes, convirtiendo los nitratos a nitritos (Hagopian y Riley, 1998).

En este estudio, en el bioensayo III, la concentración de amonio más alto, fue observado el día 14, coincidiendo con el incremento de nitrito al mismo tiempo, esto sugiere que el proceso de nitrificación se estableció a los 14 días (Mével y Chamroux, 1981).

Paralelamente entre los días 14 y 16, el ión nitrato aumenta, comprobando el proceso de nitrificación de acuerdo a lo que encontraron Hirayama (1974) y Hagopian y Riley (1998), los nitratos tienden a acumularse porque es el resultado final de esta ruta, sin embargo en este bioensayo no hubo acumulación notoria por los microorganismos oxidadores de NO_2^- . De igual manera, para el bioensayo II, no hay una tendencia de acumulación de nitratos, este oscila en las mediciones, S23 y S10 son los tratamientos con las concentraciones promedio más bajas, asumiendo que es por su capacidad de reducir nitratos (Maher, 2017).

Objetivo III.

La especie, la etapa de vida del organismo y las condiciones de cultivo, son factores que determinan la toxicidad de nitrito y amonio. Sin embargo en general, los efectos de este metabolito en los camarones es que disminuye la tolerancia térmica de los organismos,

provoca el incremento de mudas, detiene el crecimiento del organismo y al acumular nitritos en la hemolinfa, interfiere en el transporte de O_2^- (Armstrong *et al.*, 1976; Chen y Chen, 1992)

A lo largo del bioensayo II, la concentración de las diferentes formas residuales de N se mantuvieron dentro de los rangos reportados para el cultivo de *L. vannamei* (Lin y Chen, 2001; 2003), sin embargo en el bioensayo III los niveles de NH_4^+ y NO_2^- estuvieron por encima de estos niveles desde el día 7 y 11 respectivamente.

El crecimiento de los organismos, (tasa de crecimiento y peso) fue afectado por las altas concentraciones de NH_4^+ y NO_2^- como reportan varios autores (Colt y Armstrong, 1981; Racotta y Hernández-Herrera, 2000). En este trabajo, los organismos tratados con S23 crecieron más rápido que el resto.

El conteo de hemocitos circulantes, aunque estadísticamente no hubo diferencias significativas entre los diferentes tratamientos y los controles, se pudo notar aritméticamente que existe una tendencia a que los resultados favorecieron a los tratamientos S10 y MIX (Fig. 8). Sin embargo los conteos fueron bajos a los reportados en bibliografía, donde se pueden ver valores 5 veces mayores que los obtenidos en nuestro trabajo (Luis, 2012).

Por otro lado, la respuesta enzimática antioxidante (SOD) realizada en hemolinfa, los organismos tratados con S10, fueron los que obtuvieron mejor respuesta, incluso que el tratamiento INM, que contenía alimento suplementado con MacroGard®, un producto químico β -1, 3/1,6-glucano utilizado para peces y camarones se reporta que mejora la respuesta inmune, reduce la mortalidad ante la presencia de patógenos como el causante de la mancha blanca así como con diferentes especies de *vibrio* (Bagni, 2005). Con la Figura 9, se pudiera explicar por qué S10 fue el mejor tratamiento, ya que a finales del bioensayo, este tenía la menor cantidad de NH_4^+ , Sin embargo en la figura 10, el tratamiento INM tuvo la menor cantidad de NO_2^- . NH_4^+ perjudica más que NO_2^- en la respuesta del sistema inmune coincidiendo con Chung-Hung Liu y Jiann-Chu Chen (2004).

En la medición de las enzimas SOD y GST en músculo, no hubo diferencias significativas, esto, pudiéndose deber de igual manera a los altos niveles de amonio y nitrito que se presentaban al final del bioensayo III. Coincidiendo con Liu y Chen (2004) que

demuestran que a una exposición de amonio entre 11.21 y 21.22 40 mgL^{-1} , incrementa la susceptibilidad de *L. vannamei*, reduciendo su respuesta inmune, sin embargo esto no desacredita la función de inmunoestimular de la cepa S10. Ya que en músculo se presentan otro tipo de reacciones que inhiben el O_2 , pudiendo haber un sesgo y en hemolinfa una de sus principales funciones es defender y mantener al organismo sano, por esto ésta molécula es uno de los parámetros del sistema inmune más utilizados para determinar el estado de los camarones (Muñoz *et al.*, 2000).

9. CONCLUSIONES

Se comprobó que los microorganismos aislados de un sistema de mangle, se pueden utilizar en el cultivo de camarón para ser utilizados como inmunoestimulantes y/o removedores de los diferentes compuestos nitrogenados.

Bacillus oceanosediminis, es una bacteria con potencial para ser utilizada como biorremediador y probiótico, cumple con la conversión de amonio – nitrito –nitrato – nitrógeno atmosférico y fue el tratamiento con la tasa de crecimiento más rápida.

Candida cretensis, es una levadura que estimula la respuesta inmune de *L. vannamei* y reduce eficientemente la concentración de amonio, confirmando su efectividad como probiótico y biorremediador.

Los microorganismos evaluados obtuvieron mejor respuesta evaluados individualmente.

10. LITERATURA CITADA

Abreu, P. C., E. L. C. Ballester, C. Odebrecht, Jr. W. Wasielesky, R. O. Cavalli, W. Granéli y A. M. Anésio. 2007. Importance of biofilm as food source for shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*) evaluated by stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 347:88–96.

Alcaraz, G., X. Chiappa-Carrara, V. Espinoza, C. Vanegas. 1999. Acute toxicity of ammonia and nitrite to white shrimp *Penaeus setiferus* postlarvae. *Journal of the World Aquaculture Society*, 31:90-97

Armstrong, D.A., J.J. Stephenson, A. Knight. 1976. Acute toxicity of nitrite of the giant Malasyan prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 9:39-46.

Aslam, Zubair, Wan-Teak Im, Leonid N. Ten, Sung Taik Lee. 2005. *Phenylobacterium koreense* sp. nov., isolated from South Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55:2001-2005

Azim, M. E., A. Milstein, M. Wahab, M. C. J. Verdegam. 2003. Periphyton- water quality relationships in fertilized fishponds with artificial substrates. *Aquaculture*, 228(1-4): 169-187.

Basavaraja, N. 2010. Efficacy of macrogard (an immunostimulant) on growth and survival in shrimps and carps. *Indian Journal of Animal Research*, 47(5):443–448

Bender, J., R. Lee, M. Sheppard, K. Brinkley, P. Phillips, Y. Yeboah, R.C. Wah. 2004. A waste effluent treatment system based on microbial mats for black sea bass *Centropristis striata* recycled-water mariculture. *Aquacult. Eng.*, 31:73-82

Bennasar, A., R. Rosselo-Mora, J. Lalucat, E. R. B. Moore. 1996. 16S rRNA gene sequence analysis relative to genomovars of *Pseudomonas stutzeri* and proposal of *Pseudomonas balearica* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(1): 200–205.

Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. 2005. Garrity, George. 1203p.

Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. Hoboken, New Jersey.

Bomba, A., R. Nemcová, D. Mudroň, P. Guba. 2002. The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. *Trends in Food Science and Technology* 13:121–126.

Broda D. D., P. Lawson, R. G. Bell, D. R. Musgrave. 1999. *Clostridium frigidicarnis* sp. Nov., a psychrotolerant bacterium associated with "blown pack" spoilage of vacuum-packed meats. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49:1539-50.

Camargo, J.A., A. Alonso, A. Salamanca. 2005. Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* 58:1255-1267.

Campa-Córdova A.I., N.Y. Hernández-Saavedra, R. De Philippis, F. Ascencio. 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to B-glucan and sulfated polysaccharide. *Fish Shellfish Immunol*, 12:353–366.

Cavalli, R.O., Jr. W. Wasielesky, C.S. Franco, C. Miranda Filho. 1996. Evaluation of the short-term toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to *Penaeus paulensis*. Crustacea, decapoda, Broodstock. *Arq. Biol. Tecnol.* 39:567–575.

Cervantes-Carrillo, F., J. Pérez, J. Gómez. 2000. Avances en la Eliminación Biológica del Nitrógeno de las Aguas Residuales. *Rev. Latinoamericana de Microb.* 42:73-82

Chen, J. C., S. F. Chen. 1992. Effects of nitrite on growth and molting of *Penaeus monodon* exposed to ambiente ammonia. *Aquaculture*. 109:177-185

Chin, T.S., J.C. Chen. 1987. Acute toxicity of ammonia to larvae of the tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 66:247-253

Chiu, C.H., Y.K. Guu, C.H. Liu, T.M. Pan, W. Cheng. 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish Shellfish Immun.* 23(2):364-377.

Colt, E. J., D. A. Armstrong. 1981. Nitrogen Toxicity to Crustaceans, Fish and Mulluscs. *Bio- Engineering Symposium for Fish Culture*. 1:34-47.

Crab, R., Y. Avnimelech, T. Defoirdt, P. Bossier, W. Verstraete. 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*. 270:1-4

Diange E. A., S. S. Lee. 2013. *Rhizobium halotolerans* sp. nov., isolated from Chloroethylenes Contaminated Soil. *Current Microbiology*, 66(6), 599–605.

Emerenciano, M., E. L. C. Ballester, R. O. Cavalli, W. Wasielesky. 2011. En Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). *Aquaculture Research*. 3:447–457

FAO. 2012. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura - 2012.

FAO. 2014. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura – 2014.

Flores Verdugo, F., F. Gonzalez Farias, U. Zaragoza Araujo. 1993. Ecological parameters of the mangroves of semi-arid regions of México: Important for ecosystem management. En In H. Lieth and Al Mansoom: Toward the rational use of high salinity tolerant plants. Kluwer Academic Publishers. 1:123-132.

Fooks, L.J., R. Fuller, G. R. Gibson. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal* 9:53–61

Frías, M., F. Páez. 2001. Toxicidad de los Compuestos del Nitrógeno en Camarones. *Camaronicultura Y Medio Ambiente*, En: Federico Páez-Osuna. *Camaronicultura y Medio Ambiente*. pp23.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*. 66(5):365-378.

Garcia, S.M. 2011. Selective fishing and balanced harvest in relation to fisheries and ecosystem sustainability. Reporte de taller científico organizado por IUCN-CEM Fisheries Expert Group (FEG) y el Departamento Europeo para la conservación y Desarrollo (EBCD) en Nagoya (Japan), 33:14–16

González-Félix, M. L., S. Gómez-Jiménez, M. Perez-Velazquez, D. A. Davis, J. G. Velazco-Rameños. 2007. Nitrogen budget for a low salinity, zero-water exchange culture system: I. Effect of dietary protein level on the performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research*. 38(8):798-808.

Hagopian, D.S, J.G. Riley. 1998. A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquacultural Engineering* 18:223–244

Hirayama, K. 1974. Water control by filtration in closed culture systems. *Aquaculture*, 4:369-385.

Holguin, G., M. A. Guzman Y., Bashan. 1992. Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees: their isolation, identification and in vitro with rhizosphere *Staphylococcus sp.* *FEMS Microbiol Ecol.* 101:207-216.

Holguin, G., Y. Bashan, R. A. Mendoza, E. Amador, G. Toledo, P. Vázquez y A. Amador. 1999. La microbiología de los manglares. *Ciencia y Desarrollo. Sep- Conacyt.* Vol. XXV. N. 144:26-35.

Hutson R. A., D. E. Thompson, M. D. Collins. 1993. Genetic interrelationships of saccharolytic *Clostridium botulinum* types B, E and F and related *clostridia* as revealed by small-subunit rRNA gene sequences. *FEMS Microbiology Letters.* 10:103-110.

James, E.M., M. Timmons, I. Bisogni. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257(1-4):346-358.

Kautsky N., P. Ronnback, M. Tedengren, M. Troell. 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* 191:145–161

Khatoon, H., F. Yusoff, D. S. Banerjee, S., M. Shariff, S. Mohamed. 2007. Use of periphytic cyanobacterium and mixed diatoms coated substrate for improving water quality, survival and growth of *Penaeus monodon* Fabricius postlarvae. *Aquaculture.* 271: 196-205.

Kim, J.K., K. Park, K. S. Cho, S. W. Nam, T. J. Park, R. Bajpai. 2005. Aerobic nitrification–denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains. *Biore-sour. Technol.* 96:1897–1906

Knobelsdorf M. 2005. Eliminación biológica de nutrientes en un ARU de baja carga orgánica mediante el proceso VIP. Tesis doctoral. Univ. Politécnica de Catalunya. España

Lacerda Ld, Je Conde, Pr Bacon, C. Alarcon, L. d'croz, B. Kjehrfve, J. Polania, M. Vannucci M. 1993. Mangrove ecosystems of Latin America and the Caribbean: a summary. ISME, Japan, p. 1-42.

Lee, Y. J., S. J. Lee, H. Jeong, H. Kim, H. J. Ryu, N., B. C. Kim. 2012. Draft genome sequence of *Bacillus oceanisediminis* 2691. Journal of Bacteriology, 194(22):6351–6352.

Lin, Y., J. Chen. 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 259:109–119.

Lin, Y., J. Chen. 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. Aquaculture 224:193–201

Liu, C. H., J.C Chen. 2004. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. Fish and Shellfish Immunology, 16(3):321–334.

Luis Villaseñor, I. 2012. Efecto de probióticos en la modulación de la microbiota intestinal y respuesta inmune del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis (Doctorado en ciencias en el uso, manejo y preservación de los recursos naturales). Centro de Investigaciones del Noroeste, La Paz, Baja California Sur. 105p.

Ma, C. W., Y. S. Cho, K. H. Oh. 2009. Removal of pathogenic bacteria and nitrogens by *Lactobacillus spp.* JK-8 and JK-11. Aquaculture, 287(3–4):266–270.

MacFaddin, J.F. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Médica Panamericana. Buenos Aires. 850p.

Madigan, M. T., J. M. Martinko, J Parker. 2001. Biología de los microorganismos. Prentice may - Iberia. España. 986p.

Maher, O. 2017. Isolation and characterization of extremely halotolerant *Bacillus* species from Dead Sea black mud and determination of their antimicrobial and hydrolytic activities. African Journal of Microbiology Research, 11(32):1303–1314.

McFarland, L.V. 2006. Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. Am J Gastroenterol. 101(4):812-822.

Mevel, G., S. Chamroux. 1981. A study on nitrification in the presence of prawn (*P. japonicus*) in marine closed system. *Aquaculture*, 23:29-43.

Montoya, R. A., A. L. Lawrence, W. E. Grant, M. Velasco. 2002. Simulation of inorganic nitrogen dynamics and shrimp survival in an intensive shrimp culture system. *Aquaculture Research* 33:81-94

Nemutanzhela, M.E., Y. Roets, N. Gardiner, R. Lalloo. 2014. The use and benefits of *Bacillus* based biological agents in aquaculture. En: Hernandez-Vergara, M. (ed.) Sustainable aquaculture techniques. Murcia, Spain

Odum, W. E., C. C. McIvor, T. J. Smith III. 1982. The ecology of the mangroves of southFlorida: A community profile. U. S. Fish & Wildlife Service, Office of Biological Service.

Ostrensky A., W. Wasielesky. 1995. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the Sao Paulo shrimp *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. *Aquaculture*, 132:339-347.

Quirós M., P. Martorell, A. Querol, E. Barrio, J.M. Peinado, M.I. de Silóniz. 2008. Four new *Candida cretensis* strains isolated from Spanish fermented sausages (chorizo): taxonomic and phylogenetic implications. *Fems yeast research*, 8(3):485-91

Racotta, I. S., R. Hernandez-Herrera. 2000. Metabolic responses of the White shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 125:437-443.

Ramos R., L. Vinatea & R. da Costa. 2008. Tratamiento de efluentes del cultivo de *Litopenaeus vannamei* por sedimentación y filtración por la ostra *Crassostrea rhizophorae*. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 36(2):235-244.

Rendón L., J. L. Balcázar. 2003. Inmunología de camarones : Conceptos básicos y recientes avances Introducción Sistema inmune Hemocitos. *Revista AquaTIC*, 1(19):30.

Ruíz O. 2008. Nitrification and denitrification bacterial communities in the sediment and rhizosphere of free water surface constructed wetland. Tesis doctoral. Univ. de Girona-España.

Saulnier D., H. Phillippe, C. Goarant, P. Levy, D. Ansquer. 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture*, 191:133-144.

Song Z. F., J. An, G. H. Fu, X. L. Yang. 2011. Isolation and characterization of an aerobic denitrifying *Bacillus sp.* YX-6 from shrimp culture ponds. *Aquaculture*. 319:188-193.

Söderhäll, K., L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. *Ann Rev of Fish Diseases*, 2:3-23.

Talavera V., M. Zapata y D. Sánchez. 1997. Amoniaco en estanques de producción camaronera. *Boletín Nicovita*. Edición Tumpis.

Tartarotti B., G. Baffico, P. Temporetti, H. Zagarese. 2004. Dinámica del fósforo en cuerpos de agua con cría intensiva de salmonidos. *Journal of Plankton Research*. Oxford Univ. 23:753-762

Thakur, E.D., C.K. Lin. 2003. Water quality and nutrient budget in close shrimp (*Penaeus monodon*) culture systems. *Aquac. Eng.* 27:159-176.

Tran, K. C., M. P. Tran, T. Van Phan , A. Dalsgaard. 2018. Quality of antimicrobial products used in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) aquaculture in Northern Vietnam. *Aquaculture*, 482:167–175.

Urakawa H., Sh. Murata, T. Fujiwara, D. Kuroiwa, H. Maki, S. Kawabata, T. Hiwatari, H. Ando, T. Kawai, M. Watanabe, K. Kohata. 2006. Characterization and quantification of ammoniaoxidizing bacteria in eutrophic coastal marine sediments using polyphasic molecular approaches and immunofluorescence staining. *Environmental Microbiology*. 8 (5):787– 803.

Vázquez-Correa, P. 1996. Bacterias solubilizadoras de fosfatos inorgánicos asociados a la rizósfera de los mangles: *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa*. Gaerth. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur.

Wang, Y.B., Z. R. Xu, M. S. Xia. 2005. The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds. *Fish. Sci.* 71:1036–1041.

Yousuf, J., J. Thajudeen, M. Rahiman, S. Krishnankutty, P. A. Alikunj, M. H. Mohamed. 2017. Nitrogen fixing potential of various heterotrophic *Bacillus* strains from a tropical estuary and adjacent coastal regions. *Journal of Basic Microbiology*. 57(11):922–932.

Zhang, J., Wang, J., Fang, C., Song, F., Xin, Y., Qu, L., Ding, K. 2010. *Bacillus oceanisediminis* sp. nov., isolated from marine sediment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60(12):2924–2929.

Zumft, W. G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiol Mol Biol Rev. 61(4):533-616

11. ANEXOS

Anexo A.

Medio de cultivo MNH

Stock solution:		Trace element solution:	
CaCO ₃	0.07 g	MnSO ₄ x H ₂ O	33.80 mg
NaCl	5.00 g	H ₃ BO ₃	49.40 mg
MgSO ₄ x7H ₂ O	0.50 g	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	37.10 mg
KH ₂ PO ₄	1.50 g	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	43.10 mg
Distilled water	1000.00 ml	FeSO ₄ x7H ₂ O	97.30 mg
		CuSO ₄ x 5 H ₂ O	25.00 mg
		Distilled water	1000.00 ml

Trace element solution	1.00 ml
Stock solution	100.00 ml
Distilled water	899.00 ml
NaNO ₂	2.00 g/l

Ajuste de pH a 7.4 con NaOH o KOH.

Stock solution:		Trace element solution:	
CaCO ₃	0.07 g	MnSO ₄ x H ₂ O	33.80 mg
NaCl	5.00 g	H ₃ BO ₃	49.40 mg
MgSO ₄ x7H ₂ O	0.50 g	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	37.10 mg
KH ₂ PO ₄	1.50 g	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	43.10 mg
Distilled water	1000.00ml	FeSO ₄ x7H ₂ O	97.30 mg
		CuSO ₄ x 5 H ₂ O	25.00 mg
		Distilled water	1000.00 ml

Anexo B.

Purificación

La purificación de las cepas se llevó a cabo de acuerdo a la morfología de las colonias, tomando en cuenta el tamaño, color, superficie (brillante, lisa, granular, rugosa), consistencia (viscosa, mantecosa), densidad (opaca, transparente), forma, elevación y margen. Se realizó mediante el método de estría cruzada para tomar la colonia más aislada, asegurando que sea una sola colonia la que se tomaba para poder purificar.

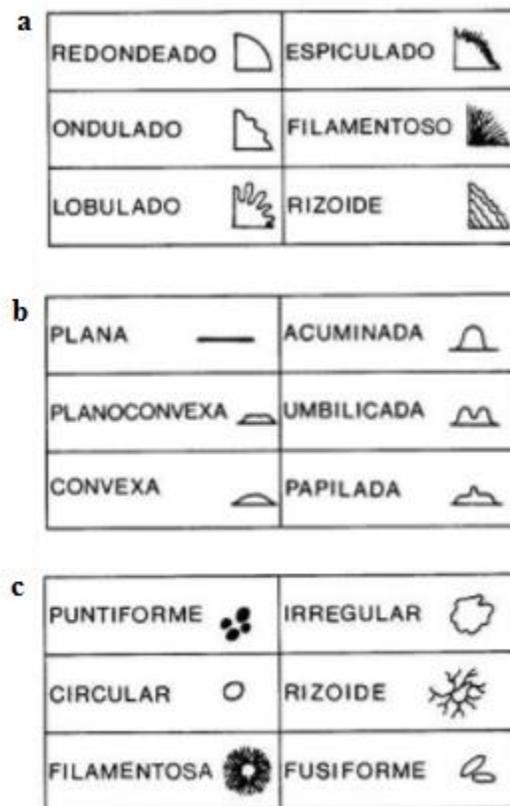


Figura 20. Guía para diferenciar colonias de microorganismos. a) margen, b) elevación y c) forma.

Anexo C.

Tinción gram

La tinción de Gram se considera básica para la clasificación de las bacterias en 2 grupos, Gram (+) y Gram (-), se realizaron frotis de cada una de las cepas, se aplicaron los siguientes colorantes en el orden mencionados por 1 minuto cada uno, a excepción del reactivo 3, se aplica 30 segundos y se enjuaga. 1.- Cristal Violeta 2.- Lugol 3.- Alcohol Acetona 4.- Safranina.

La diferenciación entre ellas se hace en las paredes celulares. Donde las bacterias Gram (+) tienen una capa gruesa de peptidoglucano en su pared celular y hace que no sea soluble en solventes orgánicos y en cambio las Gram (-) que tienen una capa delgada sí lo son, haciéndoles imposible retener el cristal violeta que se aplicó primero y quedándose con el color que le ofrece la Safranina.

Mediante su observación bajo el microscopio se diferenciaron las bacterias Gram (+) de color violeta y las Gram (-) de color rosa, además, se determinó la forma celular característica de cada una (cocos, bacilos, coco bacilos) (MacFaddin, 2003)

Anexo D.

Tabla VI. Preparación de muestras para determinar la actividad SOD con el Kit "SOD determination kit" (Sigma).

Reactivo	Muestra	Blanco 1	Blanco 2	Blanco 3
Muestra	20 μ L		20 μ L	
AguaMq		20 μ L		20 μ L
WST Solución de trabajo	200 μ L	200 μ L	200 μ L	200 μ L
Enzyme Sol. de trabajo	20 μ L	20 μ L		
Buffer de dilución			20 μ L	20 μ L

Anexo E.

Tabla VII. Reactivos para llevar a cabo la prueba de SOD

Reactivo	Curva Estandar	Muestras
Muestra	Tabla VII	10 μ L
Detector Radical	10 μ L	200 μ L
Xantina Oxidasa	20 μ L	20 μ L

Tabla VIII. Curva estándar para SOD en músculo (Cayman).

Tubo	SOD stock	Buffer Muestra	Actividad Final SOD (U/mL)
A	0	1000	0
B	20	980	0.005
C	40	960	0.01
D	80	920	0.02
E	120	880	0.03
F	160	840	0.04
G	200	800	0.05

Anexo F.

Tabla IX. Preparación de las reacciones para el Kit GST de Cayman.

Reactivo	Muestra	Blanco	Control
Muestra	20 μ L		
Buffer de Ensayo	150 μ L	170 μ L	150 μ L
Glutation	20 μ L	20 μ L	20 μ L
GST			20 μ L
CDNB	10 μ L	10 μ L	10 μ L