

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE
CIENCIAS MARINAS



Aislamiento de bacterias y fagos para el control biológico de *Vibrio* spp. durante la eclosión de *Artemia*

TESIS

Que para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

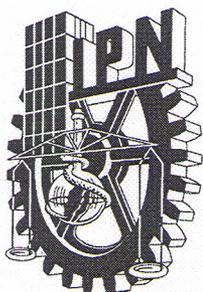
Presenta

BIOL. MAR. EDUARDO QUIROZ GUZMAN



CICIMAR-IPN

La Paz Baja California Sur, México Agosto 2005



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 02 del mes Agosto del año 2005, el (la) que suscribe EDUARDO QUIROZ GUZMÁN alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro B031463 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: MC. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ y cede los derechos del trabajo titulado: "AISLAMIENTO DE BACTERIAS Y FAGOS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE *Vibrio* spp. DURANTE LA ECLOSIÓN DE *Artemia*"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: equirozg@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

EDUARDO QUIROZ GUZMÁN

nombre y firma



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION
ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 14:00 horas del día 5 del mes de Julio del 2005 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

"AISLAMIENTO DE BACTERIAS Y FAGOS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE
Vibrio* spp. DURANTE LA ECLOSIÓN DE *Artemia

Presentada por el alumno:

QUIROZ

Apellido paterno

GUZMAN

materno

EDUARDO

nombre(s)

Con registro:

B	0	3	1	4	6	3
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

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

LA COMISION REVISORA

Director de tesis
PRIMER VOCAL

MC. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ

PRESIDENTE

SECRETARIO

DR. DAVID ALFARO SIQUEIROS BELTRONES

DR. JESUS IVAN MURILLO ALVAREZ

SEGUNDO VOCAL

TERCER VOCAL

DR. BENJAMIN H. ANGUAS VÉLEZ

DR. RICARDO VAZQUEZ JUÁREZ

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE



L. P. N.
CICIMAR
DIRECCION

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional y al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas donde realice mis estudios y el presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico a través de la beca No. 183678.

Al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) por el apoyo a través del proyecto CGPI 20041114.

A mi director de tesis M. en C. Sergio Francisco Martínez Díaz quien me ayudo a tener un reencuentro con la Microbiología, además de ser un excelente guía como profesor durante mi estancia. En verdad no tengo palabras para agradecerle tu motivación, pasión, compromiso, calidad y sobre todo tu gran amistad como persona.

Al resto de mi comisión revisora Dr. David Alfaro Siqueiros Beltrones, Dr. Benjamín H. Anguas Vélez, Dr. Ricardo Vázquez Juárez, Dra. Aída Martínez López y al Dr. Jesús Iván Murillo Álvarez, por sus atinados comentarios y excelente disposición para ayudar.

A Rubén García (Burro) por su amistad y ayuda durante el presente trabajo, y al resto de mis amigos durante la maestría.

A la granja camaronera Acuicultores de la Península S.A. APSA por el apoyo de donación de poslarvas para la presente tesis.

INDICE

ÍNDICE	i
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
GLOSARIO	vi
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	9
2.1 Uso de bacterias para combatir las infecciones en acuicultura.....	9
2.2 Uso de fagos para combatir infecciones bacterianas.....	11
2.3 <i>Artemia</i>	13
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. OBJETIVOS E HIPOTESIS	16
4.1 Objetivo general.....	16
4.2 Hipótesis.....	16
4.3 Objetivos particulares.....	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS	17
5.1 Aislamiento de bacterias del cultivo larvario de camarón.....	17
5.2 Evaluación in vitro del efecto antagónico de las bacterias aisladas contra <i>Vibrio harveyi</i>	17
5.3 Identificación taxonómica de las bacterias con efecto antagónico sobre <i>Vibrio</i>	18
5.4 Bacterias durante la eclosión de <i>Artemia</i> sin tratamiento de desinfección	18
5.5 Evaluación del efecto de las bacterias antagónicas aisladas, durante la eclosión de quistes de <i>Artemia</i> infectados experimentalmente con <i>Vibrio</i> <i>harveyi</i>	19
5.6 Aislamiento de vibriófagos, método I.....	22
5.7 Aislamiento de vibriófago, método II.....	22
5.8 Evaluación de la presencia de fagos en medio líquido.....	22
5.9 Sitios de obtención de muestras para el aislamiento de fagos.....	23
5.10 Caracterización de la actividad de los vibriófagos aislados.....	25
5.11 Expresión de fagos en placa, método I.....	25

5.12	Expresión de fagos en placa, método II.....	25
5.13	Evaluación del efecto de fagos durante la eclosión de <i>Artemia</i>	26
5.14	Mantenimiento de los fagos.....	26
6.	RESULTADOS.....	27
6.1	Aislamiento de bacterias del cultivo larvario de camarón.....	27
6.2	Identificación.....	32
6.3	Antagonismo.....	33
6.4	Bacterias durante la eclosión de <i>Artemia</i>	36
6.5	Efecto de las bacterias antagónicas (C37, C80 y C96) sobre <i>Vibrio harveyi</i> durante la eclosión de <i>Artemia</i>	37
6.6	Aislamiento de fagos.....	38
6.7	Evaluación de la actividad de vibriófagos, método I.....	40
6.8	Caracterización de la actividad de los vibriófagos aislados.....	41
6.9	Aislamiento en placa, método II.....	47
6.10	Evaluación de fagos durante la eclosión de <i>Artemia</i>	48
7.	DISCUSIÓN.....	50
7.1	Aislamiento de bacterias del cultivo larvario.....	50
7.2	Identificación de los vibrios presentes en la microflora de camarón.....	51
7.3	Antagonismo bacteriano.....	53
7.4	Aislamiento de fagos.....	55
7.5	Fagoterapia.....	57
8.	CONCLUSIONES.....	59
9.	RECOMENDACIONES.....	62
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	63
11.	APÉNDICES.....	75

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Pruebas bioquímicas de las bacterias aisladas en TCBS (**) y AM de los tanques de cultivo durante el primer periodo.....	29
Tabla 2. Pruebas bioquímicas de las bacterias aisladas en TCBS (**) y AM de los tanques de cultivo durante el segundo periodo.....	31
Tabla 3. Análisis de secuencias del sistema multipuebas BIOLOG® a partir del estadio de zoea I.....	32
Tabla 4. Análisis de secuencias del sistema multipuebas BIOLOG® a partir del estadio de nauplio.....	33
Tabla 5. Características generales de las bacterias con efecto antagónico aisladas de los cultivos larvarios de la granja de camarón APSA.....	34
Tabla 6. Resultados del análisis de la presencia de vibriófagos en muestras tomadas de La Bahía y Ensenada de La Paz. “+” efecto lítico sobre bacterias blanco; (-) no causa lisis. (25916= <i>Vibrio (Listonella) pelagia</i> , 35084= <i>V. carchariae</i> , 14048= <i>V. natriegens</i> , 17802= <i>V. parahaemolyticus</i> , 25920= <i>Vibrio campbellii</i> , 14126= <i>Vibrio harveyi</i> y 15338= <i>Vibrio proteolyticus</i>).....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del ciclo de replicación de un bacteriófago.....	6
Figura2. Placa con fago PPpW-3 de <i>P. plecoglossicida</i> PTH-9802.....	12
Figura 3. Unidad experimental usada para los ensayos de efecto de las bacterias antagónicas contra <i>V. harveyi</i> durante y después de la eclosión de <i>Artemia</i>	20
Figura 4. Vista frontal del sistema usado para evaluar el efecto de las bacterias antagónicas sobre <i>V. harveyi</i> . (a) Blanco (sin <i>V. harveyi</i> y sin bacterias antagónicas); (b) Control de <i>V. harveyi</i> (con <i>V. harveyi</i> y sin bacterias antagónicas). (c, d y e) Bacterias antagónicas contra <i>V. harveyi</i> (con <i>V. harveyi</i> y bacterias antagónicas); C37, C96 y C80.....	21
Figura 5. Sitios de obtención de muestras para el aislamiento de vibriófagos.	23
Figura 6. Toma de muestra de los diferentes tanques de cultivo durante el aislamiento de vibriofagos.....	24
Figura 7. Comportamiento bacterias y vibrios totales de los tanques 25 y 28 durante la primer corrida.....	28
Figura 8. Comportamiento bacterias y vibrios totales de los tanques 2, 6 y 12 durante la segunda corrida.....	30
Figura 9. Ejemplos del efecto in Vitro de las bacterias de la microflora de camarón sobre <i>V. harveyi</i> . (A) Sin efecto antagónico; (B) Con efecto antagónico.....	35
Figura 10. Proliferación de bacterias durante la eclosión de <i>Artemia</i>	36
Figura 11. Efecto de las bacterias antagónicas sobre la proliferación de <i>Vibrio</i> en la eclosión de <i>Artemia</i>	37
Figura 12. Evaluación en placa de la actividad de vibriófagos en muestras de la Ensenada y Bahía de La Paz (A) Placa con respuesta positiva en todas las muestras probadas, (B) Placa con efecto negativo en todas las muestras y (C) Placa con un solo resultado positivo.....	40
Figura 13. Ejemplo de la lisis causada por vibriófagos en diferentes concentraciones de NaCl.....	41
Figura 14. Ejemplo de la lisis causada por vibriófagos en diferentes temperaturas.....	42

Figura 15. Comportamiento de la expresión de los vibriófagos 1, 2 y 3 en diferentes concentraciones de medio.....	43
Figura 16. Comportamiento de la expresión de los vibriófagos 4, 5 y 6 en diferentes concentraciones de medio.....	44
Figura 17. Comportamiento de la expresión de los vibriófagos 7, 8 y 9 en diferentes concentraciones de medio.....	45
Figura 18. Comportamiento de la expresión de los vibriófagos 10, 11 y 12 en diferentes concentraciones de medio.....	46
Figura 19. Placa con fagos de <i>V. harveyi</i> (ATCC 14126).....	47
Figura 20. Comportamiento de la proliferación de <i>Vibrio harveyi</i> con y sin fagos en un periodo de 72 horas.....	48
Figura 21. Comportamiento de los vibriofagos F8 y F12 sobre el crecimiento de <i>Vibrio</i> spp por un periodo de 72 horas.....	49

GLOSARIO

Antagonismo: Inhibición de bacterias y hongos potencialmente patógenos, debido a la competencia por factores esenciales y en algunas ocasiones, a la producción de sustancias que eliminan las especies competidoras.

Antibiótico: Producto de la actividad celular (generalmente microbiana) que inhibe o mata algunos microorganismos específicos.

Bacteriófago: Virus cuyo huésped natural son las bacterias.

Cepa: Población celular descendiente de una única célula y con características genotípicas y fenotípicas específicas.

Control biológico: Reducción de la densidad o de las actividades productoras de enfermedades de un patógeno o parásito, en su estado activo, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedero o de antagonistas del patógeno que se quiere controlar.

Competencia: Asociación entre dos especies, cuando ambas requieren cierto factor ambiental limitante como un nutriente.

Colonización: Población de células que crecen en un medio sólido y que se originan de una sola célula.

Cromatoforo: Célula pigmentada o plastide productora de color.

Desinfección: Es el proceso de tratamiento de un objeto o material para eliminar o matar microorganismos patógenos.

Enfermedad: Estado de anormalidad funcional o estructural en un ser vivo.

Estéril: Libre de todo organismo vivo.

Fagoterapia: Administración de bacteriófagos para el control bacteriano.

Huésped: Es el parásito o agente infeccioso que se aloja en el hospedero.

Infeción: Invasión de un ser vivo por un agente patógeno que desencadena una enfermedad.

Inhibición: Que impide el crecimiento o función.

Medio de cultivo: Sustancias o materiales en que se desarrollan los microorganismos en condiciones de laboratorio.

Probióticos: Bacterias residentes que forman colonias en el tracto gastrointestinal, vaginal y en la boca, y que son la primera línea de defensa contra los microorganismos potencialmente dañinos que se inhalan o ingieren.

RESUMEN

De manera natural *Vibrio* forma parte de la microflora de quistes de *Artemia* y prolifera durante su eclosión. Las estrategias para reducir su número incluyen el uso de desinfectantes químicos y la aplicación de calor, lo cual trae consecuencias negativas en la calidad de *Artemia* como alimento para larvas. En el presente trabajo se evaluó el uso de bacterias y fagos como medida de control biológico de *Vibrio* spp en la producción de nauplios de *Artemia*. Para ello se aislaron bacterias de la microflora de camarón con efecto antagónico contra *Vibrio* spp y fagos con actividad lítica a partir de muestras de agua obtenidas en la Bahía y Ensenada de La Paz y de la granja APSA. La actividad antagónica sobre *Vibrio* fue determinada por la presencia de halos de inhibición mediante la técnica de doble capa en placas de Agar Marino y la presencia de fagos por la aparición de zonas de lisis bacteriana en placas con Agar marino suave. Las cepas *Vibrio (Listonella) pelagia* ATCC 25916, *V. carchariae* ATCC 35084, *V. natriegens* ATCC 14048, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *V. campbellii* ATCC 25920, *V. harveyi* ATCC 14126 y *V. proteolyticus* ATCC 15338 se usaron como indicadores de la actividad antagónica de las bacterias y para evaluar la presencia de fagos. En condiciones de laboratorio, las cepas antagónicas y los fagos fueron inoculados durante la eclosión de *Artemia* en recipientes de 500 ml y se evaluó el efecto sobre la proliferación de *Vibrio* a las 0, 6, 12 y 24 horas. De un total de 167 cepas bacterianas aisladas, se seleccionaron 4 cepas (C37, C42, C80 y C96) por tener el mayor efecto antagónico contra *Vibrio*. Todas las muestras procesadas para fagos presentaron actividad lítica para al menos una de las cepas blanco; para la evaluación se seleccionaron los fagos F8 y F12 por presentar la mayor actividad lítica. Se observó que las cepas C37 y C96 inhibieron por completo la proliferación de *Vibrio* durante la eclosión de *Artemia*, mientras que la cepa C80 solo disminuyó su abundancia. Por su parte, F8 inhibió el crecimiento de *Vibrio harveyi* pero permitió la proliferación de *Vibrio proteolyticus* en los nauplios de *Artemia*. F12 inhibió por completo la proliferación tanto de *Vibrio harveyi* como de otros tipos de vibrios durante y después de la eclosión de *Artemia*. De acuerdo a los resultados obtenidos es posible reducir la carga de Vibrios durante la eclosión de *Artemia* mediante el uso de bacterias o fagos como agentes de control biológico, lo cual es útil para prevenir enfermedades en los sistemas de producción acuícola.

ABSTRACT

The bacteria *Vibrio* forms part of the natural microflora on *Artemia* cysts and proliferates during hatching. This induces mortality in shrimp fed on *Artemia*. Strategies to reduce the number of bacteria include the use of chemical disinfectants and the application of heat, both of which reduce the quality of *Artemia* as food for fish larvae and crustaceans. In this investigation, the use of bacteria and phages was evaluated as a means of biological control of *Vibrio* spp. during the production of *Artemia* nauplii. Bacteria antagonistic to *Vibrio* spp were isolated from shrimp microflora and phages that induce lysis were isolated from water samples from the Bahia and Ensenada of La Paz and from the local APSA shrimp culture facilities. The antagonistic activity of the bacteria on *Vibrio* spp. was determined by the presence of inhibition, using the double layer method in plates of soft marine agar medium and that of phages by the appearance of zones of bacterial lysis. The strains *Vibrio (Listonella) pelagia* ATCC 25916, *V. carchariae* ATCC 35084, *V. natriegens* ATCC 14048, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *V. campbellii* ATCC 25920, *V. harveyi* ATCC 14126 and *V. proteolyticus* ATCC 15338 were used to test their vulnerability to the biological controls. The antagonistic bacteria and phages were inoculated during the hatching of *Artemia* under controlled laboratory conditions. The effect on *Vibrio* proliferation was evaluated at 0, 6, 12 and 24 h. Out of a total of 167 isolates, 3 strains (C37, C80 and C96) stood out as the bacteria with the greatest effect against *Vibrio*. C37 and C96 totally inhibited the proliferation of *Vibrio* during *Artemia* hatching, while strain C80 only diminished their abundance. All the samples processed for phages revealed lytic activity on at least one of the tested strains. Phages F8 and F12 showed high activity. F12 completely inhibited the proliferation of *V. harveyi* as well as the other vibrios, both during and after the hatching of *Artemia*. As for F8, it inhibited the growth of *V. harveyi* but allowed the proliferation of *V. proteolyticus* on *Artemia* nauplii. The results obtained in this study show that it is possible to reduce the *Vibrio* load during *Artemia* hatching using antagonistic bacteria or phages as biological control agents, a valuable means of preventing disease during aquaculture production.

1. Introducción.

La vibriosis es el principal problema infeccioso en los cultivos de camarón por la alta mortalidad que provoca (Lightner, 1988; Brocks y Lea Master, 1992; Mohny *et al.*, 1994), especialmente durante el cultivo larvario (Verpraet *et al.*, 1992). Diversas especies de *Vibrio* como *V. parahaemolyticus*, *V. damsela*, *V. vulnificus*, y *V. harveyi*, han sido reportadas como patógenas durante el desarrollo larvario del camarón; de ellas destaca la bacteria luminosa *Vibrio harveyi*, por ser una de las principales causas de mortalidad masiva del camarón bajo cultivo (Chythanya *et al.*, 2001).

Las bacterias responsables de la vibriosis ingresan de manera regular a los sistemas de cultivo a través del agua, los instrumentos usados en el larvicultivo, como parte de la microflora de los nauplios y en el alimento vivo que se proporciona a las larvas (Karunasagar *et al.*, 1994). Estudios recientes han demostrado que *Artemia* es una de las principales fuentes de contaminación para el larvicultivo ya que actúa como vector de infecciones causadas por bacterias Gram-negativas (Pérez y Gómez, 2000).

Las principales manifestaciones de la vibriosis en larvas de camarón son: músculo abdominal opaco, anorexia, expansión de cromatóforos, en especial los de color negro y pardos, lo que ocasiona una ligera pigmentación oscura en la superficie dorsal y la expansión de cromatóforos rojos sobre los pleópodos y pereiópodos, que dan un color rojizo a estos apéndices (Alabi *et al.*, 1997).

Los brotes de vibriosis causados por *Vibrio harveyi* han sido reportados en Filipinas (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990), Indonesia (Sunaryanto *et al.*, 1986), Tailandia (Jiravanichpaisal *et al.*, 1994), India (Karunasagar *et al.*, 1994), Australia (Pizzuto y Hirst, 1995), Taiwán (Liu *et al.*, 1996) y México (Nuno *et al.*, 2000).

La enfermedad causada por *Vibrio harveyi* se caracteriza por una degeneración del hepatopáncreas, donde el tejido forma un agregado de células que pasan al intestino superior causando daños severos en el aparato digestivo, ocasionan la pérdida del apetito y provocan cambios en el comportamiento; condición denominada *Bolitas nigricans* (Karunasagar *et al.*, 1994).

En los últimos años, varias investigaciones se han encaminado al desarrollo de técnicas preventivas y terapéuticas para reducir o impedir la incidencia de enfermedades en los cultivos. Peeters y Rodríguez (1999), señalaron que los problemas de enfermedades, muchas veces, son ocasionados por el manejo inadecuado de los antibióticos en el tratamiento de ataques bacterianos. Por lo que la tendencia actual es de restringir o reducir el uso de antibióticos, debido a la aparición de resistencia bacteriana, daños ecológicos, restricción de las exportaciones por presencia de residuos en los tejidos de camarones y por su impacto en la salud humana. Las estrategias de prevención de enfermedades en el cultivo de camarón han sido encaminadas hacia el uso de técnicas mejoradas en larvicultura (Alday, 1999), programas de selección genética (Pérez y Gómez, 2000), y aplicación de lipopolisacáridos (Newman, 2000), α -glucanos y peptidoglucanos (Otero y Cols., 2000; Newman, 2000) para incrementar el rendimiento y resistencia a enfermedades de origen viral o bacteriano.

1.1. Bacterias para combatir las infecciones en camarón

El uso de bacterias probióticas para el control de agentes infecciosos, es una estrategia que promete reducir la incidencia de enfermedades en el cultivo de camarón (Austin *et al.*, 1995). De acuerdo con la definición original de Parker, "los probióticos son microorganismos o sustancias provenientes de ellos que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal". Esta definición incluye cultivos, células y metabolitos microbianos. Sin embargo, la definición nunca pretendió ser tan amplia y únicamente incluye cultivos microbianos y productos directos del cultivo microbiano.

Entre los probióticos más utilizados actualmente se encuentran productos hechos a base de bacterias acidolácticas. Cada uno de estos microorganismos posee características únicas, lo que justifica su utilización (Irianto y Austin, 2000).

El modo de acción de los probióticos ha sido poco investigado, pero se supone que incluye la exclusión competitiva, es decir, los probióticos pueden inhibir la colonización de patógenos potencialmente activos en el tracto digestivo, mediante la competencia por nutrientes y/o por espacio; debido a la

alteración del metabolismo microbiano, y/o por el estímulo de inmunidad del portador (Gatesoupe, 1999). Adicionalmente, los probióticos pueden estimular el apetito y mejorar la nutrición del portador debido a la producción de vitaminas (Irianto y Austin, 2000).

Además, existen algunos probióticos que trabajan con base en su capacidad de producir sustancias antimicrobianas. Por ejemplo, se ha demostrado que algunas cepas de *Lactobacilos acidophilus* producen antibióticos como acidophilis, lactolin y acidolin; esto último se ha observado que tiene una alta actividad contra bacterias enteropatógenas, como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimuriun*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*. Lo mismo sucede con algunas cepas modificadas genéticamente, en las cuales se han incorporado genes que codifican para la producción de sustancias antimicrobianas; dichas cepas modificadas, generalmente se crean para atacar a un género específico de bacteria patógena, siendo el género *Vibrio* el blanco principal de estas cepas (Aguirre Guzman, 1994; Austin *et al.*, 1995).

Garriques y Arévalo (1995), probaron a *Vibrio alginolyticus* como probiótico en larvas de *Litopenaeus vannamei*, con resultados prometedores, ya que brinda alguna protección contra enfermedades. Sin embargo, su aplicación no es del todo conveniente, ya que en algunos casos *V. alginolyticus* ha sido reportado como patógeno (Austin *et al.*, 1995).

En la última década, se ha comprobado que la modificación de la flora bacteriana del agua de cultivo, mediante el uso de probióticos, mejora el cultivo de larvas de crustáceos (Nogami y Maeda, 1992; Garriques y Arévalo, 1995) y bivalvos (Douillet y Langdon, 1993; Douillet y Langdon, 1994; Riquelme *et al.*, 1996; Riquelme *et al.*, 1997; Riquelme *et al.*, 2000; Riquelme *et al.*, 2001) y se ha sugerido que el mantenimiento de una comunidad bacteriana natural y equilibrada puede beneficiar los cultivos larvarios de camarones peneidos (Alabi *et al.*, 1997).

Karunasagar (1994), probó el uso de *Pseudomonas* sp como probióticos en los larvicultivos para combatir a *Vibrio harveyi*; la usó en concentraciones de aproximadamente 10^4 a 10^5 células/ml. Encontró que la abundancia de *Vibrio harveyi* fue baja en los larvicultivos dónde se mantuvo una abundancia alta de *Pseudomonas*. Chythanya *et al.* (2001), demostraron que la bacteria

Pseudomonas aureginosa produce componentes inhibidores contra cepas de vibrios (*Vibrio harveyi*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio damsela* y *Vibrio vulnificus*) los cuales pueden llegar a ser una buena herramienta de control biológico en los sistemas de larvicultivo de camarón.

Así, en este campo, lo más novedoso que se plantea es la producción y utilización de probióticos para manipular la flora bacteriana en los laboratorios comerciales. Según Garriques y Arévalo (1995), existen varias hipótesis que explican el papel de los probióticos en los sistemas de acuicultura: exclusión competitiva de bacterias patógenas; mejoramiento de la nutrición por el suministro de nutrientes esenciales; incremento de la nutrición por el suministro de enzimas esenciales; obtención directa de materia orgánica transformada por bacterias y producción de sustancias que inhiben el crecimiento de patógenos oportunistas. Esta práctica incluye el cultivo de cepas seleccionadas de bacterias benéficas que son inoculadas intencionalmente en los tanques de larvicultura.

Recientemente, han aparecido en el mercado productos elaborados con combinaciones de bacterias capaces de degradar materia orgánica y de competir con bacterias patógenas oportunistas; sin embargo, se desconocen las consecuencias sobre la ruta de colonización y periodo del primer contacto con comunidades bacterianas en larvas de camarones (Alfonso *et al.*, 1988).

1.2. Uso de fagos para combatir infecciones bacterianas

La fagoterapia es otra alternativa para combatir bacterias infecciosas en agricultura, ganadería y en medicina humana. Ha sido usada durante décadas, y continúa siendo empleada principalmente en la antigua Unión Soviética (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Varios investigadores polacos han proporcionado datos convincentes sobre el tratamiento de infecciones bacterianas en humanos, principalmente casos crónicos en los que estaban implicadas bacterias altamente resistentes a antibióticos; entre éstos se encuentran: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* (Sulakvelidze *et al.*, 2001)

Los bacteriófagos son los entes más abundantes de la biósfera y se ha estimado que existen 10^{10} fagos por cada litro de agua de mar, lo que representa un excelente mecanismo natural de control biológico de las bacterias marinas, ya que se produce un equilibrio entre las bacterias que se multiplican y los fagos que destruyen una parte de esa población bacteriana (Ronda *et al.*, 2003). De aquí que no resulte extraño que los fagos produzcan efectos aparentemente inmunológicos en los animales (Chaina, 1965). Esto debió, tal vez, a que por fuera de la célula bacteriana los fagos son inertes, pero se fijan o adsorben a componentes específicos de la superficie celular bacteriana mediante una estructura complementaria al receptor celular, por lo que un determinado virus sólo puede infectar a las bacterias que contengan su receptor.

La naturaleza de la zona de adsorción varía con el tipo de fago, ya que ésta consiste en la glicolización y/o metilación de bases específicas. Ya realizada la adsorción, se produce un cambio configuracional en las proteínas de la placa basal, algunas de las cuales tienen actividad enzimática y producen un poro en la membrana citoplasmática de la célula. La vaina del fago se contrae y el material genético viral ingresa en la célula, mientras que la envoltura protéica queda en el exterior. Estas proteínas reparan el poro de la membrana citoplasmática por donde ingresó el genoma viral y degradan el DNA bacteriano, lo que proporciona una fuente de precursores, evita la síntesis de RNA y proteínas bacterianas y proporciona ribosomas para la síntesis de proteínas del fago (Davis *et al.*, 1979; Fig. 1). Algunas de estas proteínas

participan en la síntesis de las bases. La forma de replicación del genoma viral es dependiente del tipo de material genético (Davis *et al.*, 1979).

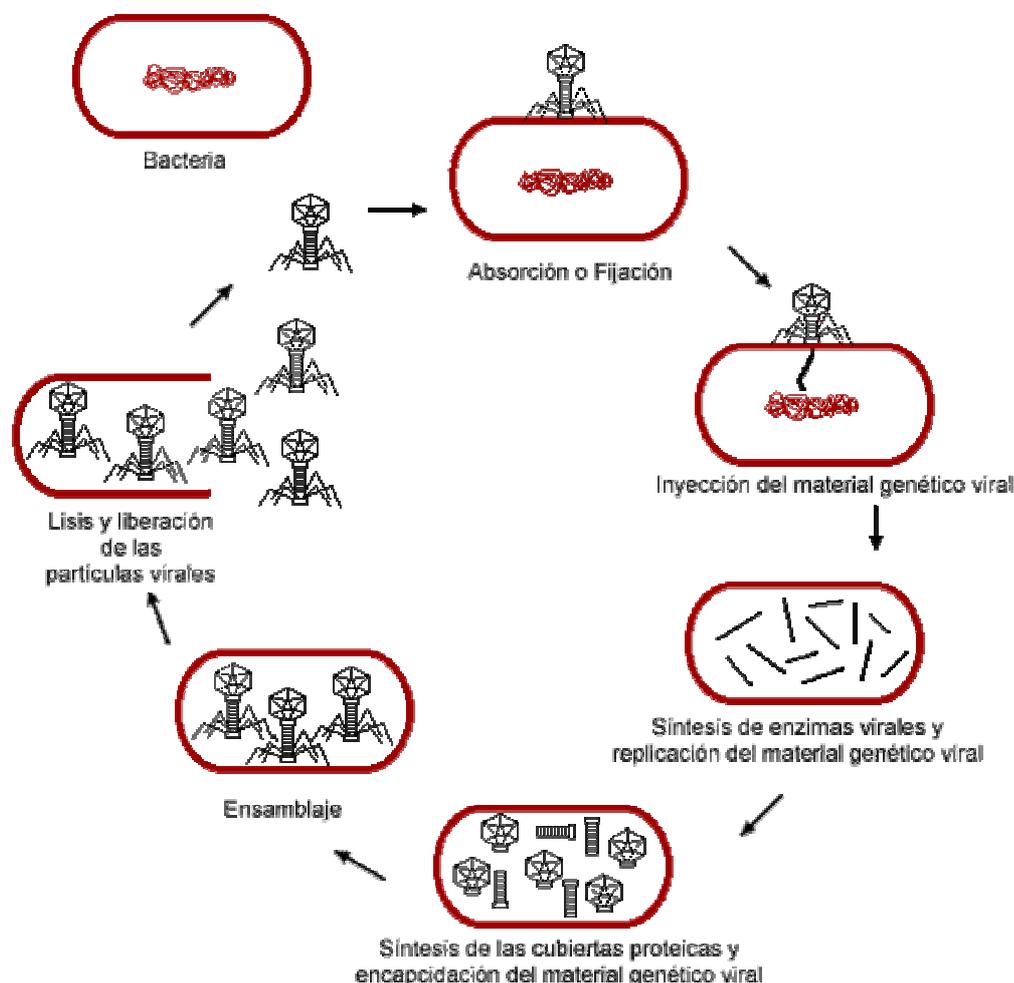


Figura 1. Esquema del ciclo de replicación de un bacteriófago (tomada de Davis *et al.*, 1979).

Debido a su especificidad, el uso de fagos puede permitir un control específico sobre las bacterias patógenas oportunistas en acuicultura (Ronda *et al.*, 2003). Se ha demostrado la efectividad de la terapia con fagos en el combate de *Aeromonas hydrophyla* (Wu *et al.*, 1981; Hsu *et al.*, 2000); *Pseudomonas plecoglossicida* (Park *et al.*, 2000) *Edwardsiella tarda* (Hsu *et al.*, 2000) y *Vibrio anguillarum* (Wu *et al.*, 1987) en peces.

Recientemente, investigadores japoneses han desarrollado métodos como la administración de fagos por vía intraperitoneal, mediante inyecciones de fagos purificados, o bien por vía oral, en peces jóvenes infectados experimentalmente con bacterias patógenas. Lo anterior ha permitido evaluar la

capacidad de los fagos como agentes terapéuticos en acuicultura (Nakai, 1999; Park, 2000). Además de que han sido aislados y caracterizados vibriófagos de amplio espectro que actúan contra *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* y *V. furnissii* (Wu *et al.*, 1987) y, recientemente, una compañía en la India comercializa una suspensión de fagos denominado LUMI-NIL-MBL[®], específico para combatir a *Vibrio harveyi* en el cultivo de camarón.

1.3. *Artemia* spp como alimento y vector

Una de las aportaciones más importantes para la acuicultura fue la introducción de *Artemia* como alimento de larvas de peces y crustáceos (Leger *et al.*, 1986; Sorgeloos *et al.*, 1988). Los quistes de *Artemia* presentan ventajas sobre las dietas artificiales, esto debido a que cuenta con las propiedades de un alimento artificial seco y el valor nutritivo de los nauplios es muy elevado (Hines *et al.*, 1980). Por otra parte, *Artemia* ha sido empleada como el principal vector en aplicaciones terapéuticas (Ozkizilcik y Chu, 1994; Dixon *et al.*, 1995; Touraki *et al.*, 1996; Burboa-Zazueta, 1997), además de ser un buen elemento de control biológico de dinoflagelados tóxicos en los sistemas de cultivo (Burboa-Zazueta, 1997). Debido a su composición bioquímica, *Artemia* es considerada como la fuente más importante de alimento (Mialhe, 1992).

Artemia también ha sido empleada como vehículo de hormonas, complementos nutricionales (Sorgeloos *et al.*, 1988), antibióticos (Majack *et al.*, 2000) y como vector de bacterias patógenas para realizar infecciones experimentales (Roque *et al.*, 2000).

En camaronicultura, *Artemia* es empleada de forma enriquecida para poder incrementar la frecuencia de desoves, mejorar los niveles de maduración de reproductores de *Litopenaeus vannamei* y mejorar la calidad larvaria (Wouters *et al.*, 1999). El estadio metanauplio II de *Artemia* es usado como un mejorador del crecimiento en los estadios post-larvales de camarón, obteniendo mejores resultados en el control de calidad de larvas (Sorgeloos *et al.*, 1988).

Para la obtención de nauplios de *Artemia* las granjas realizan rutinariamente la descapsulación química mediante hipoclorito, con la cual teóricamente se logra una completa desinfección de los quistes de *Artemia*

(Sorgeloos, 1972). Sin embargo, aunque el tratamiento con hipoclorito llega a desinfectar los quistes completamente, estos son rápidamente recolonizados por bacterias durante la etapa de eclosión (Dehasque *et al.*, 1998). Ello ocasiona que la producción intensiva de este alimento vivo esté asociada a la transmisión de enfermedades y a la disminución en la supervivencia. Adicionalmente, la elevada producción de sustancias orgánicas que libera *Artemia* dentro de los sistemas de cultivos ocasiona una rápida proliferación de bacterias patógenas oportunistas (Skjermo *et al.*, 1997).

Artemia también ha sido reportada como el principal vector de *Vibrio* spp. (Roque *et al.*, 1999; Verdonck *et al.*, 1997); tiene el potencial de acumular alrededor de 1×10^5 bacterias por nauplio (Campbell *et al.*, 1983). Lo cual incrementa las enfermedades por bacterias durante la producción de larvas de peces y crustáceos (Dopazo *et al.*, 1988).

La capacidad de modular la carga microbiana durante la producción de *Artemia* es una medida que puede ayudar a disminuir las enfermedades en acuicultura. En el presente trabajo, se analizó la capacidad de inhibir *in vivo* la proliferación de vibrios durante la eclosión de *Artemia*, mediante el uso de bacterias aisladas de la microflora de larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y mediante el uso de vibriófagos.

2. Antecedentes.

2.1. Uso de bacterias para combatir las infecciones en acuicultura.

Debido a la estrecha asociación de vibrios a larvas de camarón se ha incrementado el número de estudios dirigidos hacia su control y prevención ya que es una fuente de pérdidas monetarias fuertes para las granjas de producción de camarón (Ruangpan y Kitao, 1991; Lightner, 1993; Hameed, 1993).

Jones *et al.* (1997), identificaron que el inicio de la alimentación exógena en las larvas de camarones peneidos, es una fase crítica en términos de su sobrevivencia, crecimiento y desarrollo, ya que las larvas por primera vez son expuestas internamente a comunidades microbianas durante la muda de nauplio 5 a zoea 1. En esta etapa la exposición a la comunidad bacteriana presente en el agua, puede tener efectos benéficos o perjudiciales sobre la capacidad digestiva y de asimilación de las larvas, así como en su capacidad para sobrellevar el contacto con cepas patógenas presentes en el agua o el alimento que se les suministra (Vandenberghe *et al.*, 1999). Se ha sugerido que algunas condiciones letales como el síndrome de zoea 2, que induce la separación y disfunción de las células hepatopancreáticas causando la desintegración del epitelio intestinal, están a menudo asociadas con la bacteria causante de luminiscencia *Vibrio harveyi* en los estadios tempranos de zoea 1 (Pantoja *et al.*, 1997). Para evitar esto las granjas de producción camaronera emplean antibióticos y así logran tener un mejor control sobre dichas bacterias; sin embargo, el uso inapropiado de estos antibióticos como agente de control ha llevado al problema de la resistencia bacteriana (Karunasagar *et al.*, 1994).

Nuno *et al.* (2000), realizaron estudios sobre la ingestión de bacterias por parte de larvas de peneidos que se alimentan por primera vez. Mediante el marcado de bacterias con fluorescencia (BMF) para hacer el seguimiento de bacterias vivas dentro del tracto digestivo de larvas de crustáceos, observaron la ingestión, retención intestinal y excreción de una cepa probiótica de *Vibrio*. Así mismo, observaron que la calidad del agua de cultivo inicial puede generar cambios significativos en el resultado final del cultivo y que el ambiente interno del intestino en estadio de nauplio 5 tardío puede estar desde este momento

expuesto a las condiciones externas. Aún cuando en el estadio de nauplio 5 todavía no ha ocurrido la apertura de la boca, el ano sí se encuentra abierto y existen movimientos antiperistálticos (“anal drinking”). Para los estadios inmediatos de zoea 1-3, se sugiere que desde nauplio 5 los tejidos internos del intestino posterior pueden estar en contacto con el ambiente externo y, consecuentemente con las bacterias presentes en la columna de agua.

Maeda y Liao (1992), aislaron una bacteria denominada PM-4 del agua de los estanques de crianza larvaria de *Litopenaeus monodon*, obteniendo una alta tasa de sobrevivencia y muda en este organismo. La aplicación apropiada de los probióticos ha mostrado mejoramiento en el balance microbiano del intestino (Parker, 1974; Fuller, 1989), además de reducción del problema de las bacterias patógenas oportunistas en el tracto gastrointestinal (Lloyd *et al.*, 1977; Goren *et al.*, 1984). Así mismo, Nogami *et al.* (1997), emplearon una cepa bacteriana que identificaron como *Thalassobacter utilis* obteniendo resultados satisfactorios en la reducción o eliminación de bacterias patógenas oportunistas en *Litopenaeus monodon*. Por otra parte Austin (1988), al estudiar la interacción de bacterias antagónicas en crustáceos, observó que éstas proporcionan al huésped, sustancias nutricionales como vitaminas, aminoácidos esenciales, ácidos grasos y enzimas. Mientras que Schroeder (1997), aisló ácido láctico de las bacterias del intestino de peces, los cuales inhibieron el crecimiento *in vitro* de *Vibrio* sp. Con esto se puso de manifiesto la importancia ecológica de este tipo de técnicas así como el uso de dichas bacterias con efecto antagónico sobre los patógenos oportunistas.

Nikoskelainen *et al.* (2001), investigaron las propiedades de siete taxa de bacterias ácido lácticas, de las cuales estudiaron su capacidad de adherencia y penetración en el tracto digestivo de la trucha arcoiris y su capacidad de inhibición de bacterias patógenas oportunistas. Mientras que Riquelme *et al.* (1997), demostraron que una cepa de *Vibrio* sp confirió protección a las larvas de camarón contra *Vibrio anguillarum* y patógenos relacionados, demostrando así la capacidad antagónica que puede tener este tipo de bacterias empleadas como agentes de biocontrol. Sugita *et al.* (1998), aislaron una cepa de *Bacillus* sp., la cual demostró tener un efecto antagónico sobre el 63% de las bacterias aisladas del intestino de algunos peces. Con base en lo anterior cabe mencionar que el efecto antibacteriano es debido a cualquiera de los siguientes

factores en combinación o solos: **1)** la producción de antibióticos, **2)** la producción de bacteriocinas, **3)** proteasas y **4)** alteración de valores de pH por ácidos orgánicos producidos (Westerdahl *et al.*, 1991; Olsson *et al.*, 1992.).

2.2. Uso de fagos para combatir infecciones bacterianas.

A partir del descubrimiento de los fagos por D' Herelle y Twort (1915-1917); hasta los años 40, los fagos fueron usados en muchas ocasiones con éxito, para el combate de diversas enfermedades infecciosas. Hoy en día, la fagoterapia sigue aplicándose en algunos casos de enfisemas, peritonitis, entre otras (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Muchos resultados exitosos en la aplicación de la fagoterapia han sido reportados para distintos organismos, algunos ejemplos son: **a)** el control de *Escherichia coli* (Barrow *et al.*, 1998); y **b)** *Salmonella typhimurium* en pollos (Biswas *et al.*, 2002); **c)** en la prevención de infecciones de *Pseudomonas aeruginosa* en injertos de piel (Soothill, 1992) y **d)** en el biocontrol de *E. coli* 0157, asociada a la colitis hemorrágica, por eliminación de la flora bacteriana de los vegetales frescos (Smith *et al.*, 1987).

En acuicultura, la fagoterapia es una alternativa que se ha empezado a explorar como una vía alterna para combatir a las bacterias patógenas. Nakanishi *et al.* (1966) realizaron el primer aislamiento de bacteriófagos específicos para *Vibrio parahaemolyticus* del medio marino, de heces humanas y de bacterias lisogénicas; lo cual permitió tener una amplia variedad de bacteriófagos del medio marino, los cuales fueron descritos y diferenciados morfológicamente, descubriendo que la mayoría de estos requieren de sal en el medio para su desarrollo y capacidad de infección (Keynan *et al.*, 1974). Zachary (1974), realizó estudios de los ecosistemas marinos logrando el primer aislamiento de fagos de *Vibrio natriegens*, con lo que numerosos estudios se enfocaron a la presencia de bacteriófagos en el medio marino y en esteros; la mayoría de los estudios se han encaminado hacia la descripción de la distribución, abundancia y a evaluar el papel de estos virus en los ecosistemas marinos. Baross *et al.* (1978), aislaron numerosos bacteriófagos para *Vibrio parahaemolyticus* de muestras marinas, observando que los fagos permiten tener un excelente control sobre esta especie de *Vibrio*.

Los fagos abundan en las aguas marinas y se ha demostrado su presencia en organismos acuáticos sanos, *v. gr.* en riñones de peces sanos con una incidencia de casi el 3%. Se aislaron los fagos PLay y PLgW, que infectan a *Lactococcus garviae*, a partir de peces enfermos cultivados así como de peces capturados en mar abierto (Nakai *et al.*, 1999). Esto ha dado argumentos para suponer que están asociados con la muerte de bacterias en ambientes naturales, lo que podría redundar en una mayor supervivencia de peces, crustáceos y moluscos infectados por bacterias (Nakai y Park, 2002).

Un ejemplo del uso de la fagoterapia en acuicultura, es el caso de *Plecoglossus altivelis*, en el cual se presentaron fuertes brotes de *Pseudomonas plecoglossicida*; Park *et al.* (2000), aislaron fagos de la familia Myoviridae (PPpW-3) y Siphoviridae (PPp-W4), la actividad de estos fagos fue demostrada mediante la formación de transparencias en placas de cultivos, en un periodo de 72 horas a una temperatura de 25°C (Fig. 2). Éstos fueron empleados con fines terapéuticos mediante alimentos impregnados. En los tratamientos de control, se detectó una mortalidad del 65% en un lapso de una semana, mientras que, en aquellos que fueron tratados con fagos, la mortalidad fue del 22%. Adicionalmente, observaron que estos fagos son muy estables y resisten libremente durante al menos 3 días en agua de mar a temperaturas y salinidad variable y pH bajo, condiciones que facilitan la colonización.

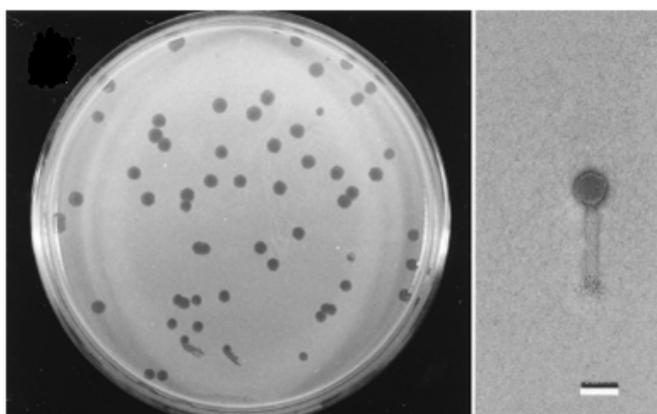


Figura 2. Placa con fago PPpW-3 de *P. plecoglossicida* PTH-9802 (Park *et al.*, 2000).

2.3 *Artemia*

En la actualidad, la mayoría de los trabajos sobre bacterias en la acuicultura, se enfocan en la prevención de la incorporación de bacterias patógenas oportunistas (Verpraet *et al.*, 1992; Touraki *et al.*, 1999), las que en su mayoría son transportadas por *Artemia*; sin embargo, debido a su fácil manejo durante el cultivo ésta también sirve como vector de antibióticos y bacterias con efecto antagónico (Vershuere *et al.*, 1999).

Se han realizado diversos estudios para la manipulación y control bacteriano en el alimento vivo, en un esfuerzo por reducir la carga bacteriana de las larvas en cultivo (Pérez y Gatesoupe, 1988). Sahul Hameed y Balasubramanian (2000), recomiendan la desinfección de los nauplios con formaldehído, antes de su ingreso al sistema de crianza. Sin embargo, algunos quistes de *Artemia* son sensibles al formaldehído, por lo que la técnica tendría que ser modificada (De Wolf *et al.*, 1998). Una alternativa es el tratamiento con hipoclorito, el cual desinfecta de igual manera los quistes. Aunque estos dos métodos son eficaces para lograr la desinfección de los quistes, los nauplios son rápidamente recolonizados por bacterias oportunistas durante la eclosión, poco antes de salir del corion (Munro *et al.*, 1999). Ya que al momento de la eclosión, los quistes liberan glicerol el cual sirve como medio de cultivo para bacterias oportunistas como *Vibrio* sp lo que puede ser una amenaza para larvas de peces o crustáceos (Dehasque *et al.*, 1998). Otra alternativa para el control de las bacterias es el tratamiento con probióticos, un aspecto particularmente interesante sobre el periodo de desinfección es su eficacia y que actúa sobre las bacterias Gram-negativas, Gram-positivas y hongos.

Los estudios sobre el control de bacterias oportunistas como *Vibrio* sp en *Artemia*, han tenido como principales objetivos: **i)** controlar la composición de la microflora del alimento vivo, agregando bacterias antagónicas específicas al agua de cultivo y **ii)** Valorar el cambio en la composición de la carga bacteriana de los organismos que, a su vez, servirán como alimento (Pavlos *et al.*, 2000).

3. Justificación.

La camaronicultura en América Latina, ha sido una de las actividades económicas de mayor crecimiento durante los últimos 15 años, a pesar de tener que sortear dificultades de tipo sanitario (FAO, 2003). De acuerdo con Vivares y Guesdon *et al.* (1992), la mayor mortalidad ocurre durante la etapa larvaria, debido a la presencia de bacterias patógenas y oportunistas que son frecuentemente introducidas en el cultivo, a través de presas vivas como *Artemia*. Esto tal vez porque gran parte de los quistes comerciales de *Artemia*, contienen de forma natural bacterias patógenas oportunistas como las del género *Vibrio*, que son responsables de mortalidades masivas en los cultivos larvarios de camarón.

Hasta hace unos años, el único método comúnmente practicado para el manejo de la flora bacteriana indeseable era el uso de antibióticos y desinfectantes. Ello llevó a una serie de nuevos problemas derivados de su mala utilización, tales como, la resistencia de las bacterias a los antibióticos, problemas ecológicos asociados con bacterias resistentes y sustancias químicas tóxicas. Así, se hizo necesario explorar otras vías ambientalmente seguras para el control de las enfermedades. Aparentemente, una de éstas es manipular la flora bacteriana de los sistemas de larvicultura a través de la inoculación de bacterias benéficas. En este campo, lo más novedoso que se plantea es la producción y utilización de bacterias y fagos como agentes de control biológico. Según Garriques y Arévalo (1995), existen varias hipótesis que explican el papel de los probióticos en los sistemas de acuicultura: exclusión competitiva de bacterias patógenas; mejoramiento de la nutrición por el suministro de nutrientes y enzimas esenciales; obtención directa de materia orgánica transformada por bacterias y producción de sustancias que inhiben el crecimiento de patógenos oportunistas. Esta práctica incluye el cultivo de cepas seleccionadas de bacterias benéficas que son inoculadas intencionalmente en los tanques de larvicultura (Verschuere *et al.*, 2000).

En el caso de la fagoterapia en la acuicultura es claro que como en otros campos de la biología, se debe profundizar, para conocer con detalle los límites auténticos del uso de los fagos como agentes terapéuticos, tanto por sí mismos

como complemento al uso de los antibióticos para la protección frente a las infecciones bacterianas (Ronda *et al.*, 2003).

La calidad nutricional del alimento y el manejo sanitario del alimento vivo en estanquearía son sumamente importantes para el cultivo de camarón, ya que tienen gran influencia sobre los factores que determinan el resultado final de la producción (FAO, 2003). Esto debido a que para las larvas de especies que no tienen un estómago funcional, al inicio de la alimentación exógena el alimento vivo es esencial para un crecimiento óptimo (Jones *et al.*, 1993). Un ejemplo de esto es *Artemia*, ya que con el desarrollo que ha adquirido la acuicultura en todo el mundo, su uso como alimento vivo para las larvas en cultivo, llegó a ser generalizado (Sorgeloos, 1988). Esto quizá porque el género *Artemia* tiene la capacidad de producir quistes, a partir de los cuales, se obtienen fácilmente por eclosión, estadios naupliares. Es por ello que constituye el alimento vivo más utilizado para las formas larvarias de peces y crustáceos (López y Lizárraga, 2001). De acuerdo con Darryl *et al.* (2002), se cosechan alrededor de 3,000 y 1,000 toneladas de quistes y biomasa, respectivamente, siendo Estados Unidos de América (Gran Lago Salado) el principal productor de quistes. Sin embargo, la calidad de los quistes depende de un gran número de factores, tales como la calidad nutricional intrínseca, las características microbianas, la talla de los quistes y nauplios, entre otras, que influyen en el valor comercial de los mismos (Sogerloos *et al.*, 2001).

La detección, prevención y control de infecciones en los cultivos larvarios de peces y crustáceos, es una parte importante, ya que las pérdidas por muertes no explicadas dentro de los sistemas se ve reflejada en muchas ocasiones, en pérdidas económicas considerables para los acuicultores. Por ello es necesario establecer un cuadro de control de las enfermedades en los cultivos larvarios, con el fin de evaluar el estado de salud de los organismos.

4.- Objetivos.

4.1. Objetivo general:

Aislar bacterias con propiedades antagónicas contra *Vibrio* de la microflora de larvas de camarón, así como vibriófagos del medio marino y evaluar su uso como agentes de control biológico de *Vibrio* spp durante y después de la eclosión de *Artemia*.

4.2. Hipótesis:

Las bacterias aisladas de la microflora de camarón con propiedades antagónicas a *Vibrio* spp y vibriófagos aislados del medio natural, funcionan como una estrategia de control biológico ya que éstos podrán inhibir el crecimiento de *Vibrio*, durante y después de la eclosión de *Artemia*.

4.3. Objetivos particulares:

- 1.- Aislar y caracterizar la microflora de larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* durante la producción comercial.
2. Seleccionar bacterias de la microflora de larvas de camarón con efecto antagónico sobre *Vibrio* spp.
- 3.- Aislar vibriófagos a partir de muestras de agua del medio marino o del cultivo larvario de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y caracterizar la actividad lítica
- 4.- Evaluar el efecto de agregar bacterias antagónicas y vibriófagos sobre la población de *Vibrio harveyi*, asociados al agua de cultivo y microflora de quistes durante y después de la eclosión de *Artemia*.

5.- Materiales y Métodos.

5.1. Aislamiento de Bacterias del cultivo larvario de camarón.

El aislamiento de bacterias se realizó durante dos periodos de producción comercial (Enero-Julio y Octubre-Diciembre) de larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* de la granja comercial Acuacultores de la Península S.A. (APSA), cada tercer día se tomaron muestras de agua y larvas de camarón (de los tanques 25 y 28 durante el primer periodo y de los tanques 2, 6 y 12 del segundo periodo); con el fin de evaluar la presencia de bacterias heterótrofas aerobias y facultativas totales y vibrios. Cada muestra fue tomada concentrando aproximadamente 500 larvas en un tamiz de 30 μm en 200 ml de agua del mismo estanque. Las muestras fueron transportadas al laboratorio en bolsas estériles de 500 ml dentro de una hielera para evitar cambios en su temperatura y fueron analizadas en aproximadamente 20 minutos posteriores a su obtención. En el laboratorio, de cada muestra se contaron 100 larvas, las cuales se homogenizaron en tubos estériles con 4.5 ml de solución salina al 2% de NaCl. Posteriormente, se realizaron diluciones decimales (hasta 10^{-3}); de cada dilución se sembraron por triplicado 100 μl , en placas de Agar Marino (AM) y Tiosulfato Citrato Bilis de Sacarosa (TCBS) y se incubaron a 35°C por 24 horas. Las colonias que crecieron en cada medio se aislaron y caracterizaron con base a Tinción de Gram, Forma, Tamaño, Oxidasa (OXI), Catalasa (CAT), Motilidad (MOT), Citrato (CIT), Indol (IND) y Oxido - Fermentación de Glucosa (OF). Cada una de las técnicas así como la composición de los medios usados se describe en el apéndice 1. Adicionalmente se procesaron muestras de *Artemia*, microalgas y del agua utilizada en la producción larvaria con el propósito de detectar fuentes de contaminación.

5.2. Evaluación *in vitro* del efecto antagonico de las bacterias aisladas contra *Vibrio harveyi*.

Para poder determinar el antagonismo de las bacterias aisladas de la microflora del camarón, se aplicó una modificación de la técnica de doble capa descrita

por Dopazo *et al.* (1988), para ello se realizaron punciones por triplicado en placas de agar marino, incubándolas a 35°C por 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se mataron mediante la exposición a vapores de cloroformo absoluto por un periodo no mayor a 15 min., dejando evaporar posteriormente los residuos de cloroformo de 6 a 24 horas. Una vez transcurrido este periodo, de un cultivo de *Vibrio harveyi* (cepa ATCC 14126) de 24 h se cosecharon y se lavaron las células, las cuales se ajustaron a una Densidad Óptica (D.O.) de 1 a 560 nm ($DO=1, 560 \lambda$), ya ajustada la suspensión bacteriana se realizaron diluciones decimales en solución salina hasta la dilución 10^{-3} , de la cual, se adicionaron 100 μ l a 15 ml de agar marino previamente esterilizado a 120°C y enfriado a 50° C; la mezcla se vació en la superficie de las placas con punción bacteriana y se incubaron por 24 horas. Después de incubar se evaluó el efecto antagónico mediante la aparición de halos de inhibición, alrededor de las punciones.

5.3. Identificación taxonómica de las bacterias con efecto antagónico sobre *Vibrio*.

Las bacterias aisladas que mostraron efecto antagónico contra *Vibrio harveyi*, se identificaron mediante el sistema de multipruebas BIOLOG[®], el cual consta de 96 fuentes de carbono. Los pozos de las fuentes de carbono utilizadas por las bacterias se tornan color púrpura, mientras que en aquellos que no son utilizados como única fuente de carbono el color permanece blanco; los resultados se analizaron con el programa MicroLog Release 4.01B[®].

5.4. Bacterias durante la eclosión de *Artemia* sin tratamiento de desinfección

Para evaluar las bacterias y vibrios totales durante y después de la eclosión de quistes de *Artemia* se pesaron 0.2 g/L de quistes NABS[®] (North American Brine Shrimp) e INVE[®], mismos que fueron incubados por triplicado en tubos con 500 ml con agua de mar artificial (Instant Ocean [35 g/L]) estéril, a 35‰ y 28°C, sin desquistar, sin desinfectar y con aireación continua, los cuales se evaluaron por triplicado en placas de agar marino y TCBS a las 0, 6, 12, 18 y 24 horas.

5.5. Evaluación del efecto de las bacterias antagónicas aisladas, durante la eclosión de quistes de *Artemia* infectados experimentalmente con *Vibrio harveyi*

Para la evaluación del efecto de bacterias antagónicas sobre *Vibrio harveyi*, se emplearon quistes de *Artemia* NABS®. 2 g de quistes fueron desinfectados por aproximadamente 30 s en solución de hipoclorito de sodio (60 g/L de cloro activo); posteriormente se enjuagaron repetidas veces con agua destilada estéril y se transfirieron a una solución al 0.3% de cloruro de benzalkonio por aproximadamente 30 segundos y fueron puestos a eclosionar en un recipiente de 1 L con 500 ml de agua marina artificial esterilizada (Instant Ocean [35 g/L]) con aireación continua. Posteriormente, los quistes fueron colocados en unidades experimentales de 500 ml de agua de mar estéril, adicionándoles 1000 µl de una solución ajustada con *Vibrio harveyi* a una D.O. de 1 a 560 nm y 1000 µl de las bacterias antagónicas aisladas (C37, C80, y C96) en concentraciones de 10^6 UFC ml⁻¹, evaluando por triplicado el efecto de dichas bacterias sobre *V. harveyi* en placas de TCBS por periodos de 0, 6, 12 y 24 horas (Fig. 3 y 4).

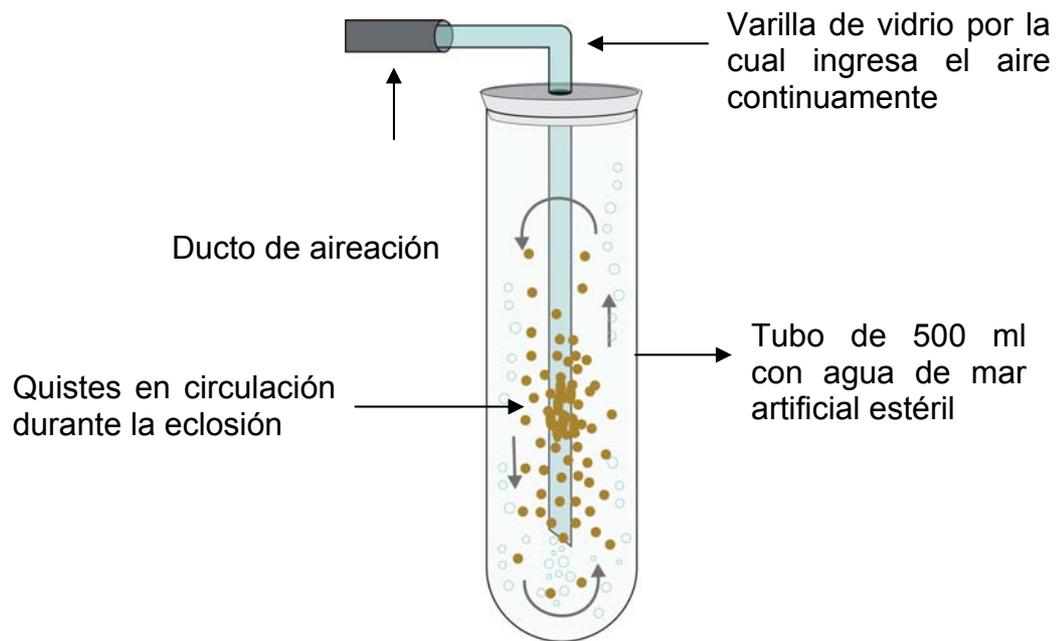


Figura 3. Unidad experimental usada para los ensayos de efecto de las bacterias antagonicas contra *V. harveyi* durante y después de la eclosión de *Artemia*.

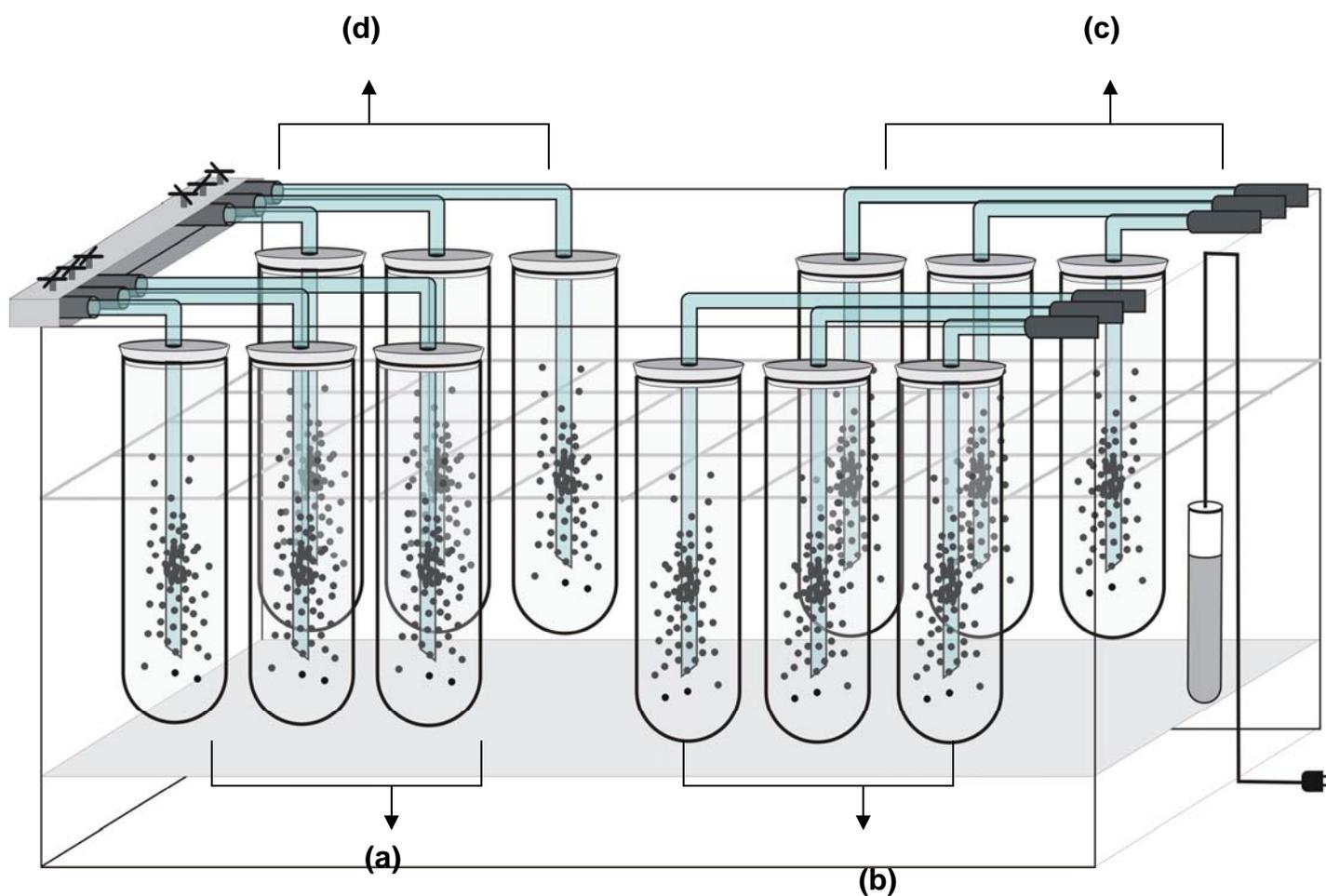


Figura 4. Vista frontal del sistema usado para evaluar el efecto de las bacterias antagonicas sobre *V. harveyi*. (a) Blanco (sin *V. harveyi* y sin bacterias antagonicas); (b) Control de *V. harveyi* (con *V. harveyi* y sin bacterias antagonicas) (c y d) Bacterias antagonicas contra *V. harveyi* (con *V. harveyi* y bacterias antagonicas); C37, C96 y C80.

5.6. Aislamiento de vibriófagos, método I

El aislamiento de fagos se realizó usando como cepas blanco a *Vibrio natriegens* ATCC 14084, *Vibrio carchariae* ATCC 35084, *Vibrio (Listonella) pelagia* ATCC 25916, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, *Vibrio harveyi* ATCC 14126, *Vibrio campbelli* ATCC 25920 y *Vibrio proteolyticus* ATCC 15338. El aislamiento se realizó siguiendo los procedimientos descritos por Wu *et al.* (1987). Muestras de agua de la granja de camarón, de la Ensenada y Bahía de La Paz se colocaron en 24 recipientes estériles, se agregaron células viables de *Vibrio* sp. hasta ajustar a una concentración de 10^5 UFC ml⁻¹ y se dejaron incubar durante 48 h a 30°C.

5.7. Aislamiento de vibriófagos, método II

Un segundo método de aislamiento de fagos se realizó usando los procedimientos descritos por Matsuzaki *et al.* (1992). En el cual las muestras de agua de la granja de camarón, de la Ensenada y Bahía de La Paz se colocaron en recipientes estériles con medio YPL, el cual contiene 0.3 % de extracto de levadura, 0.2 % de cloruro de sodio y 1 % de peptona a un pH de 8.0 A dicho medio y muestras de agua se les agregaron células viables de *Vibrio* hasta ajustar a una concentración de 10^5 UFC ml⁻¹ y se dejaron incubar durante 48 h a 30°C.

5.8. Evaluación de la presencia de fagos en medio líquido.

La determinación de la presencia de fagos en cada uno de los 24 recipientes se realizó usando los procedimientos descritos por Wu *et al.* (1987), para lo cual se tomaron 10 ml de agua, filtrada con membranas Whatmann de 0.2 µm, mismos que fueron agregados a una suspensión de vibrios, determinando la actividad positiva de acuerdo a la reducción en la absorbancia durante las siguientes 96 horas.

5.9 Sitios de obtención de muestras para el aislamiento de fagos.

La Ensenada de La Paz se localiza al sur de la Bahía de La Paz, entre los $110^{\circ} 25'$ y $24^{\circ} 06'$ norte, y los $110^{\circ} 25'$ oeste, tiene una superficie de aproximadamente 45 km^2 , referidos a la pleamar media superior. Está separada de la bahía por una barra de arena de origen marino denominada “El Mogote”, de aproximadamente 11 Km. de longitud y de 2.7 Km. en su parte mas ancha (Palomares, 1996) (Fig. 5). El aporte de agua dulce se circunscribe prácticamente a las descargas de aguas residuales de la ciudad de la Paz y las poblaciones aledañas a la laguna (García, 1977).

Las muestras fueron recolectadas en lugares cercanos a la costa, de diferentes sitios de la Bahía y de la Ensenada de La Paz marcados mediante la utilización de un GPS, indicados con una cruz en el mapa (Fig. 5). Las muestras se colocaron en botellas de 1 L y se trasladaron al laboratorio de microbiología del CICIMAR-IPN.

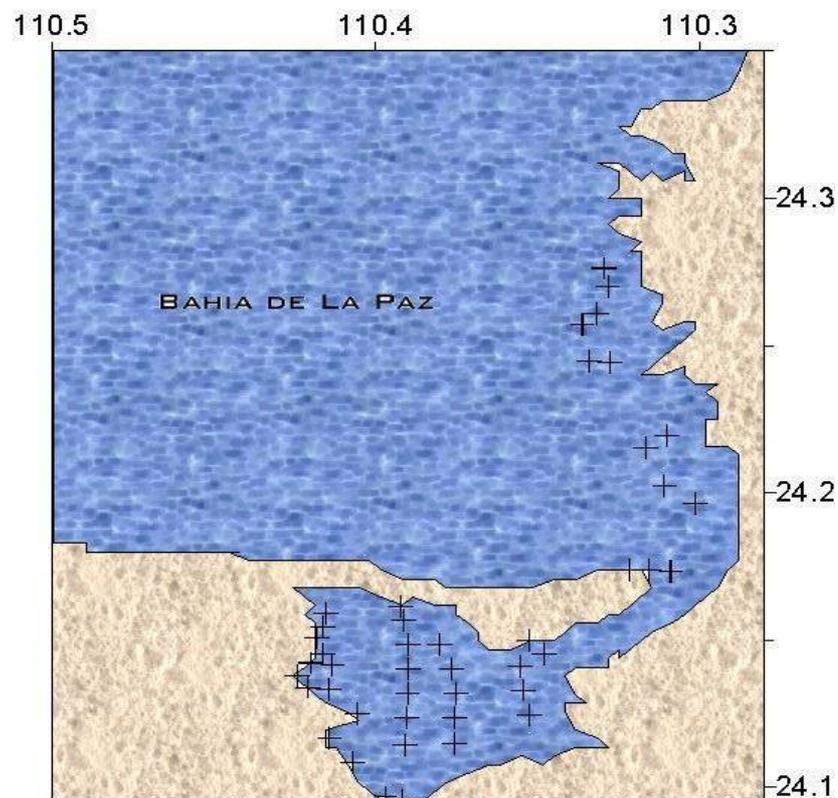


Figura 5. Sitios de obtención de muestras para el aislamiento de vibriófagos

Simultáneamente, se tomaron un total de 12 muestras de agua, en bolsas estériles de 500 ml, de 5 tanques de cultivo de camarón (tanques 2, 6, 12, 25 y 28) de la granja Acuacultores de la Península S.A. (APSA), la cual se encuentra ubicada en el Km 10 de la carretera La Paz - Pichilingue.



Figura 6. Toma de muestra de los diferentes tanques de cultivo durante el aislamiento de vibriófagos.

5.10. Caracterización de la actividad de los vibriófagos aislados.

A las muestras con efecto positivo a la presencia de fagos contra *V. harveyi* se les realizaron pruebas de la evaluación de actividad en diferentes condiciones de salinidad (35 ‰, 25 ‰, 15 ‰ y 5 ‰), temperatura (35°C, 30°C, 28°C y ambiente), y concentraciones del medio de cultivo (100%, 75%, 50% y 20%) con la finalidad de determinar las condiciones óptimas de la actividad de los fagos; dichas pruebas fueron evaluadas por triplicado en tubos de ensaye con 10 ml de suspensión de bacterias viables de *Vibrio* spp. a una concentración de 10^5 UFC ml⁻¹ y 1 ml de suspensión de fagos. La actividad de los fagos en cada tratamiento fue evaluada como la reducción en la densidad óptica (DO₅₆₀) por un periodo de 96 horas para salinidad y temperatura y de hasta 8 días para la prueba de concentraciones de medio.

5.11. Expresión de fagos en placa, método I

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la expresión de los fagos se evaluó la formación de placa, para lo cual, de cada recipiente con 10^5 UFC ml⁻¹ se tomó 1 ml de agua, la cual se filtró mediante el uso de membranas de 0.2 µm. Con el filtrado se realizaron diluciones decimales, en tubos con 4.5 ml de agua de mar estéril, para posteriormente ser inoculados por duplicado, en placas de agar marino previamente inoculadas con *Vibrio* spp.

5.12. Expresión de fagos en placa, método II

Usando los procedimientos descritos por Spencer (1959), en 20 ml de medio de cultivo agar marino suave (1.2 % de agar-agar), estéril y enfriado a 50°C, se agregaron 100 µl de *V. harveyi* ajustados a una concentración de 10^5 UFC·ml⁻¹ y 100 µl de suspensión de fagos. La presencia de vibriófagos se evaluó por la formación de zonas de transparencia en el crecimiento de *Vibrio* spp de cada placa.

5.13. Evaluación del efecto de fagos durante la eclosión de *Artemia*.

Para la evaluación *in vivo* del efecto de los fagos sobre *Vibrio harveyi*, se emplearon los quistes de *Artemia* NABS[®], los cuales fueron puestos a eclosionar a una densidad de 2 g/L. Previamente fueron desinfectados con solución de hipoclorito de sodio (60 g/L de cloro activo), una vez pasadas por esta solución se enjuagaron repetidas veces con agua destilada estéril; posteriormente se transfirieron a una solución al 0.3% de cloruro de benzalkonio por unos segundos y fueron puestos a eclosionar por triplicado en un tubo con 100 ml de agua marina artificial esterilizada (Instant Ocean [35 g/L]) con aireación continua (pasada por un filtro de 0.2 µm), en un sistema semejante al de los experimentos anteriores. A los cuales se les agregó 100 µl de un cultivo de 24 horas de *Vibrio harveyi* (cepa ATCC 14126), ajustándose a una D.O. de 1 a 560 nm posteriormente se les agregó por separado 3 ml de la suspensión los fagos con mayor actividad (los denominados F8 y F12), evaluándolos por triplicado en placas de TCBS por periodos de 0, 12, 24, 48 y 72 horas.

5.14. Mantenimiento de los fagos

Los fagos fueron mantenidos en agua de mar artificial y matraces estériles a temperatura ambiente. Y fueron criopreservados en tubos Eppendorf[®] a - 80° C con 50% de Glicerol estéril.

6. Resultados.

6.1. Aislamiento de bacterias del cultivo larvario de camarón

El primer muestreo se realizó en dos estanques durante la producción correspondientes al periodo del 5 al 16 de julio del 2003. En total se procesaron 13 muestras de larvas de camarón. También se procesaron 4 muestras de *Artemia* en las diferentes etapas de la producción, 2 muestras de agua, 4 muestras de la diatomeas *Chaetoceros calcitrans* y una muestra de *Spirulina* sp.

De las muestras de agua, tomadas al inicio de la corrida, así como en las muestras de diatomeas y *Spirulina*, no se obtuvieron aislamientos de *Vibrio* sp., por lo que se descartaron como posibles fuentes de contaminación para el cultivo de larvas de camarón.

En la Fig. 7 se muestra el comportamiento de los dos tanques en un periodo de 12 días, donde se aprecia un incremento en el número de bacterias, iniciándose el día 5, en el caso del tanque 28 con un pico máximo en el día 7; mientras que en el tanque 25 este incremento se inicio el día 5, con un máximo el día 8. En ambos estanques se observó un incremento tanto de bacterias totales como de vibrios a partir del día 5.

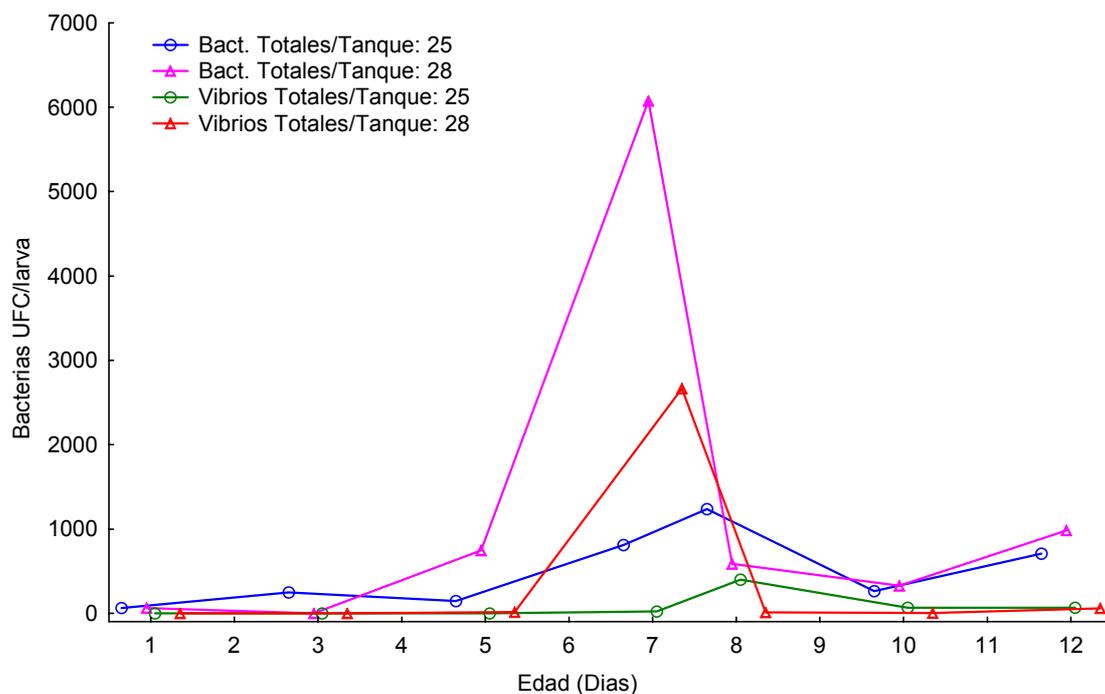


Figura 7. Concentración de bacterias y vibrios totales de los tanques 25 y 28 durante la primer corrida

En total se aislaron 57 cepas en ambos medios. Ocho de ellas fueron aislados en TCBS, por lo que fueron consideradas como presuntos vibrios.

Un lote de 8 cepas, entre las cuales se incluyeron las de TCBS, fueron caracterizadas bioquímicamente (Tabla 1).

Tabla 1. Pruebas bioquímicas de las bacterias aisladas en TCBS (**) y AM de los tanques de cultivo durante el primer periodo.

CLAVE	GRAM	Forma	Tamaño (μ)	OXI	CAT	MOT	CIT	IND-NO ₂	NO ₃	O-F
PL1	-	Bacilos	1.2x0.7	+	+	+	-	-	+	-
Pz	-	Bacilos	1.5x0.6	+	-	+	ND	-	+	-
M1**	-	Bacilos	1.2x0.7	+	+	+	+	-	+	+
Mi	-	Bacilos	1.0x0.4	+	+	+	+	-	+	-
A V	-	Bacilos	1.5x0.7	+	+	+	+	-	+	+
A V	-	Bacilos	1.1x0.5	+	+	+	+	-	+	-
LI	-	Bacilos	1.0x 0.7	+	+	+	+	-	+	+
Pr **	-	Bacilos	1.2x0.5	+	+	+	+	-	+	+
LIA **	-	Bacilos	1.0x0.6	+	+	+	-	-	+	-
Mn **	-	Bacilos	1.1x0.7	+	+	+	ND	-	+	+
Mr **	-	Bacilos	1.5x0.5	+	+	+	+	-	+	+
PL **	-	Bacilos	1.2x0.5	+	+	+	ND	-	+	+
Mz **	-	Bacilos	1.0x0.4	+	+	+	-	-	+	-
LI **	-	Bacilos	0.8x0.5	+	+	+	-	-	+	-
N1	+	Bacilos	1.2x1.0	+	+	-	-	-	+	-

+Positivo

- Negativo

ND No Determinadas

El segundo muestreo se realizó al inicio de la producción de los estanques 2, 6 y 12 correspondientes al periodo del 26 de febrero al 15 de marzo del 2004. En total se procesaron 26 muestras de larvas de camarón. También se procesaron 3 muestras de agua.

De las muestras de agua tomadas al inicio de la corrida no se obtuvieron aislamientos de bacterias del género *Vibrio*, por lo que nuevamente se descartó como posible fuente de contaminación para el cultivo de larvas de camarón.

En la Fig. 8 se muestra el comportamiento de los tres tanques en un periodo de 8 días donde se aprecia un incremento en el número de bacterias, iniciándose el día 3; en tanto que los tanques 2, 6 y 12 con un pico máximo en el día 7 para los estanques 2 y 12, mientras que el estanque 6 presentó una pequeña baja en la concentración bacteriana. En los tres estanques se observó un comportamiento a la alza, pero esta característica tan especial posiblemente se deba nuevamente al tratamiento con antibióticos que tienen los tanques utilizados.

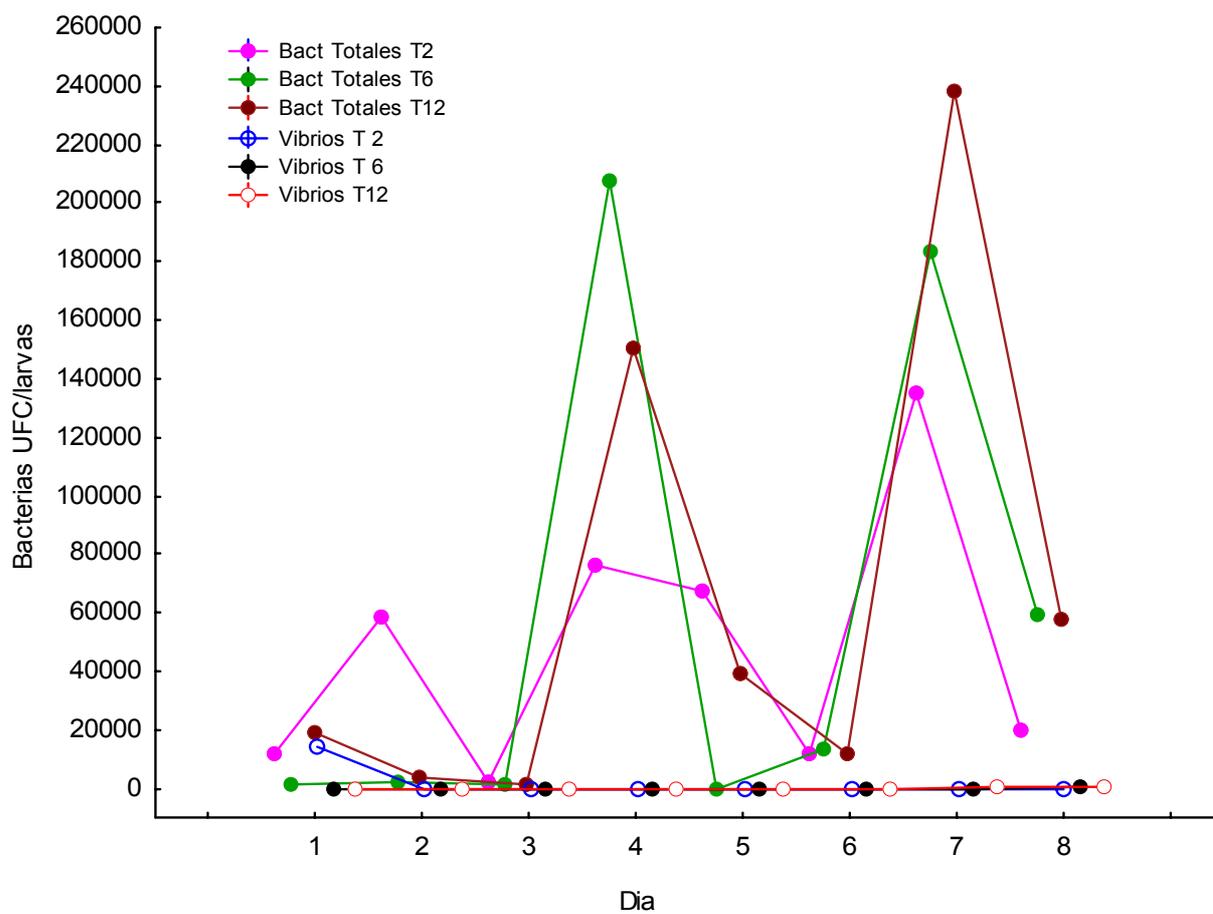


Figura 8. Comportamiento de bacterias y vibrios totales de los tanques 2, 6 y 12 durante la segunda corrida

A diferencia de la primer corrida, se logró aislar un número mayor de cepas el cual fue de 116, de las cuales 5 de ellas fueron aisladas en TCBS, por lo que fueron consideradas presuntamente como *Vibrios*.

Un lote de 21 cepas, entre las cuales se incluyeron las de TCBS, fueron caracterizadas bioquímicamente (Tabla 2).

Tabla 2. Pruebas bioquímicas de las bacterias aisladas en TCBS (**) y AM de los tanques de cultivo durante el segundo periodo.

Clave	GRAM	Forma	Tamaño (µm)	OXI	CAT	MOT
14 **	-	Bacilo corto	1.2x0.7	+	+	+
37	-	Bacilo	1.5x0.6	+	+	+
42	-	Coco	1.2x0.7	+	+	+
61 **	-	Bacilo	1.0x0.4	+	+	+
68 **	-	Bacilo	1.2x0.7	+	+	+
63	-	Bacilo corto	1.5x0.7	+	+	+
96	-	Bacilo	1.1x0.5	+	+	+
1	-	Bacilo	1.2x0.5	+	+	+
2 **	-	Bacilo corto	1.0x0.6	+	+	+
3	-	Coco	1.1x0.7	+	+	+
4	-	Bacilo corto	1.5x0.5	+	+	+
14	-	Bacilo	1.2x0.5	+	+	+
115	-	Bacilo	1.0x0.4	+	+	+
118	-	Bacilo	0.8x0.5	+	+	+
119 **	-	Bacilo corto	1.2x1.0	+	+	+
113	-	Bacilo	0.7x1.0	+	+	+
114	-	Bacilo	1.2x0.4	+	+	+
116	-	Bacilo	1.5x0.6	+	+	+
95	-	Bacilo	05x1.0	+	+	+
100	-	Bacilo	1.0x1.0	+	+	+
117	-	Bacilo	1.0x0.8	+	+	+

6.2 Identificación

Con el sistema de multipuebas BIOLOG[®] se identificaron 10 cepas a nivel de especie pertenecientes a: *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. proteolyticus* y *Pseudomonas creosotensis*; las cepas restantes no pudieron ser totalmente identificadas, pero fueron cercanas a las especies *Vibrio alginolyticus*, *V. carchariae*, *V. cholerae*, *V. harveyi* y *Kitococcus sedentarius*. De igual manera se analizó la secuencia de aislamiento de las diferentes especies de *Vibrio* y se observó que, al inicio los nauplios no contienen *Vibrios* en su microflora; a partir del estadio protozoa 1 se presenta *V. proteolyticus*, el cual se mantiene hasta larva, en el estadio de mysis también se observó la presencia de otras dos especies de *Vibrio*, tentativamente identificadas como *V. alginolyticus* y *V. cholerae*. Un dato sobresaliente es que en el estadio de larva se presenta *Vibrio harveyi*, el cual se mantiene hasta el estadio de postlarva (tabla 3).

Tabla 3. Análisis de secuencias del sistema multipuebas BIOLOG[®] a partir del estadio de zoea I

CLAVE	Identificación	%	Muestra	Medio	Numero de acceso	Biolog
PL1	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99	Poslarva	TCBS	6,7,2,0,2,5,0,3,5,0,3,6,7,0,1,0,0,5,2,4,1,6,7,7,3,5,4,1,7,5,4,7	
Pz	<i>Vibrio harveyi</i>	88	Poslarva	TSAs	6,7,2,0,2,5,0,7,6,4,5,6,7,0,1,0,0,5,2,4,1,6,7,5,3,4,4,1,6,5,4,5	
M1**	<i>Vibrio proteolyticus</i>	96	Mysis	TCBS	6,7,3,6,2,7,0,7,4,0,6,7,7,0,7,0,5,2,4,5,7,7,5,3,2,5,1,7,1,4,7	
Mi	<i>Vibrio proteolyticus</i>	96	Mysis	TSAs	6,7,2,4,2,5,0,3,6,4,3,6,7,0,1,0,0,5,2,4,1,6,7,5,3,4,4,1,6,5,4,7	
A V	<i>Vibrio proteolyticus</i>	97	Artemia	TSAs	4,7,2,0,2,4,0,7,0,0,0,3,0,0,0,0,0,4,0,4,1,6,7,5,0,5,4,1,6,1,4,5	
A V	<i>Vibrio proteolyticus</i>	98	Zoea 1	TSAs	6,7,2,0,2,6,0,7,7,4,3,6,7,1,1,0,0,5,2,4,1,6,7,5,2,4,4,1,6,5,5,5	
LI	<i>Vibrio proteolyticus</i>	99	Larva	TCBS	6,7,2,4,2,6,0,7,4,0,3,0,0,0,1,2,0,4,0,4,0,4,7,5,0,5,6,1,6,1,0,4	
Pr **	<i>Vibrio proteolyticus</i>	99	Zoea 1	TCBS	6,7,2,4,2,6,0,7,7,0,3,6,7,0,1,1,0,5,2,4,1,6,7,6,3,4,4,1,6,5,5,7	
LIA **	<i>Vibrio proteolyticus</i>	100	Larva	TCBS	6,7,2,4,6,7,0,7,6,0,3,6,7,0,5,0,0,5,2,4,5,6,7,5,3,4,6,1,6,5,4,7	
Mn **	<i>Pseudomona creosotensis</i>	92	Mysis	TSAs	6,7,2,4,2,5,0,7,6,4,3,6,7,0,1,0,0,5,2,4,1,6,7,5,3,4,4,1,7,5,5,7	
Mr **	<i>Vibrio alginolyticus</i>	*	Mysis	TCBS	6,7,2,6,2,7,0,7,0,0,2,6,7,0,6,0,0,6,2,4,6,6,7,7,0,4,0,1,6,1,4,7	
PL**	<i>Vibrio carchariae</i>	*	Poslarva	TCBS	6,7,2,4,2,7,0,7,2,0,3,0,7,0,5,0,0,5,2,4,5,6,7,5,0,4,2,1,6,0,4,7	
Mz **	<i>Vibrio cholerae (no O1)</i>	*	Mysis	TSAs	6,7,2,4,2,7,2,5,6,2,2,4,6,7,0,5,4,4,5,2,4,5,6,4,5,0,4,2,1,6,7,4	
LI **	<i>Vibrio harveyi</i>	*	Larva	TCBS	5,7,2,2,2,7,0,7,2,3,3,0,7,0,5,0,0,5,2,4,5,6,7,5,0,4,2,1,4,5,4,7	
N1	<i>Kitococcus sedentarius</i>	*	Nauplio	TSAs	1,7,2,4,2,7,1,7,2,0,3,0,7,0,5,5,5,5,2,4,5,6,7,5,0,4,2,1,5,6,2,3	

% Probabilidad de una correcta identificación

* Sin porcentaje de identificación

Para el segundo muestreo se analizaron nuevamente las secuencias de las diferentes especies (Tabla 4), de las cuales se identificaron 2 cepas a nivel especie pertenecientes a: *Vibrio harveyi* y *Vibrio proteolyticus*; mientras que las cepas restantes no fueron identificadas, pero fueron tentativamente como *Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas sobria*, *V. fluvialis* y *Aeromonas verona*. Se observó que, a diferencia del primer muestreo, los nauplios presentaron tentativamente *Vibrios* y *Aeromonas* mientras que en el estadio de zoea se observó la presencia de *V. harveyi* y en el estadio de mysis *V. proteolyticus*. Un dato sobresaliente es que en el estadio de poslarva se presenta *Vibrio harveyi*, el cual se mantiene junto con *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* y *V. proteolyticus*.

Tabla 4. Análisis de secuencias del sistema multipuebas BIOLOG[®] a partir del estadio de nauplio.

Clave	Identificación (clave)	% ID	Muestra	Medio	Numero de acceso Biolog
1	<i>Vibrio alginolyticus</i> C1	*	Nauplio	AM	6,7,2,0,2,5,0,3,5,0,3,6,7,0,1,0,0,5,2,4,1,6,7,7,3,5,4,1,7,5,4,7
2	<i>Vibrio alginolyticus</i> C2	*	Nauplio	AM	6,7,2,0,2,5,0,7,6,4,5,6,7,0,1,0,0,5,2,4,1,6,7,5,3,4,4,1,6,5,4,5
3	<i>Aeromonas sobria</i> C3	*	Nauplio	AM	6,7,3,6,2,7,0,7,4,0,6,7,7,0,7,0,5,2,4,5,7,7,5,3,2,5,1,7,1,4,7
14	<i>Vibrio proteolyticus</i> C4	94	Nauplio	AM	6,7,2,4,2,5,0,3,6,4,3,6,7,0,1,0,0,5,2,4,1,6,7,5,3,4,4,1,6,5,4,7
19	<i>Vibrio harveyi</i> C14	72	Zoea	AM	4,7,2,0,2,4,0,7,0,0,0,3,0,0,0,0,4,0,4,1,6,7,5,0,5,4,1,6,1,4,5
61	<i>Vibrio proteolyticus</i> C94	*	Mysis	AM	6,7,2,0,2,6,0,7,7,4,3,6,7,1,1,0,0,5,2,4,1,6,7,5,2,4,4,1,6,5,5,5
63	<i>Vibrio harveyi</i> C100	85	Poslarva	TCBS	6,7,2,4,2,6,0,7,4,0,3,0,0,0,1,2,0,4,0,4,0,4,7,5,0,5,6,1,6,1,0,4
38	<i>Vibrio alginolyticus</i>	*	Poslarva	TCBS	6,7,2,4,2,6,0,7,7,0,3,6,7,0,1,1,0,5,2,4,1,6,7,6,3,4,4,1,6,5,5,7
95	<i>Vibrio fluviales</i> C115	*	Poslarva	TCBS	6,7,2,4,6,7,0,7,6,0,3,6,7,0,5,0,0,5,2,4,5,6,7,5,3,4,6,1,6,5,4,7
100	<i>Vibrio proteolyticus</i> C116	*	Poslarva	TCBS	6,7,2,4,2,5,0,7,6,4,3,6,7,0,1,0,0,5,2,4,1,6,7,5,3,4,4,1,7,5,5,7
117	<i>Vibrio fluvialis</i> C118	*	Poslarva	TCBS	6,7,2,6,2,7,0,7,0,0,2,6,7,0,6,0,0,6,2,4,6,6,7,7,0,4,0,1,6,1,4,7
119	<i>Aeromonas veroni</i> C119	*	Poslarva	TCBS	6,7,2,4,2,7,0,7,2,0,3,0,7,0,5,0,0,5,2,4,5,6,7,5,0,4,2,1,6,0,4,7

% Probabilidad de una correcta identificación

* Sin porcentaje de identificación

6.3.- Antagonismo

Una vez finalizadas las pruebas bioquímicas, se les aplicaron las correspondientes pruebas para evaluar el efecto antagónico sobre *Vibrio harveyi* (cepa ATCC 14126). De las 57 cepas bacterianas aisladas durante el primer periodo de muestreo, ninguna presentó efecto antagónico (Fig. 9 A). De

las 116 cepas bacterianas aisladas de la segunda corrida se lograron aislar 12 cepas con efecto antagónico (Fig. 10 B, tabla 5) sobre *V. harveyi*.

Tabla 5. Características generales de las bacterias con efecto antagónico aisladas de los cultivos larvarios de la granja de camarón APSA.

Numero	Clave	Gram	Forma	Tamaño (μm)
1	C 14	-	Bacilo corto	1.2x0.7
2	C 37	-	Bacilo	1.5x0.6
3	C 42	-	Coco	1.2x0.7
4	C 44	-	Bacilo	1.0x0.4
5	C 47	-	Bacilo	1.2x0.7
6	C 50	-	Bacilo corto	1.5x0.7
7	C 54	-	Bacilo	1.1x0.5
8	C 63	-	Bacilo	1.2x0.5
9	C 68	-	Bacilo corto	1.0x0.6
10	C 80	-	Coco	1.1x0.7
11	C 96	-	Bacilo corto	1.5x0.5
12	C 101	-	Bacilo	1.2x0.5

Una vez aisladas dichas bacterias con efecto antagónico, se les aplicó la prueba de identificación con el sistema de multipuebas BIOLOG[®]. Con esta no se pudo identificar a dichas bacterias debido a que no presentaron ninguna reacción positiva con ninguna de las 96 fuentes de carbono que contiene la placa GN2 o GP2 de dicho sistema.

De igual manera, en algunas no se pudo determinar el tamaño de halo de inhibición debido a lo intenso de su efecto, no permitieron el crecimiento de *V. harveyi* en la placa.

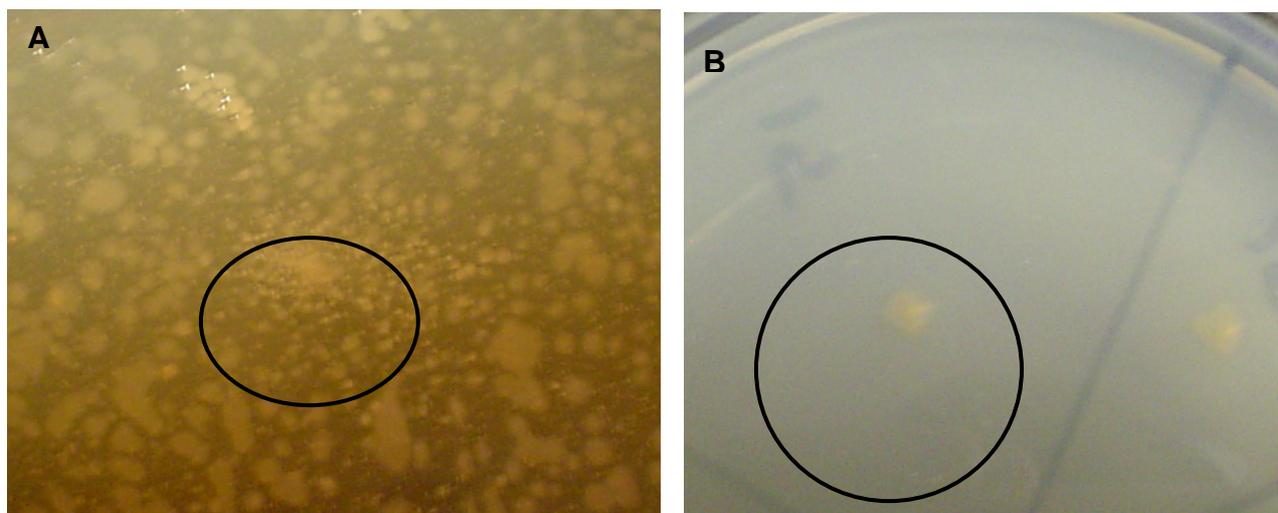


Figura 9. Ejemplos del efecto *in vitro* de las bacterias de la microflora de camarón sobre *V. harveyi*. **(A)** cepa C63 sin efecto antagonico; **(B)** cepa C80 con efecto antagonico.

6.4. Bacterias durante la eclosión de *Artemia*.

Se observó que la proliferación de vibrios ocurre entre las 12 y 24 horas a partir de que los quistes son puestos a eclosionar, lo cual coincide con los tiempos a los que ocurre la eclosión. El número de vibrios en las muestras de NABS® e INVE® sin bacterias antagónicas fue de 10^1 a 10^2 vibrios mL^{-1} a las 24 horas (Fig. 10).

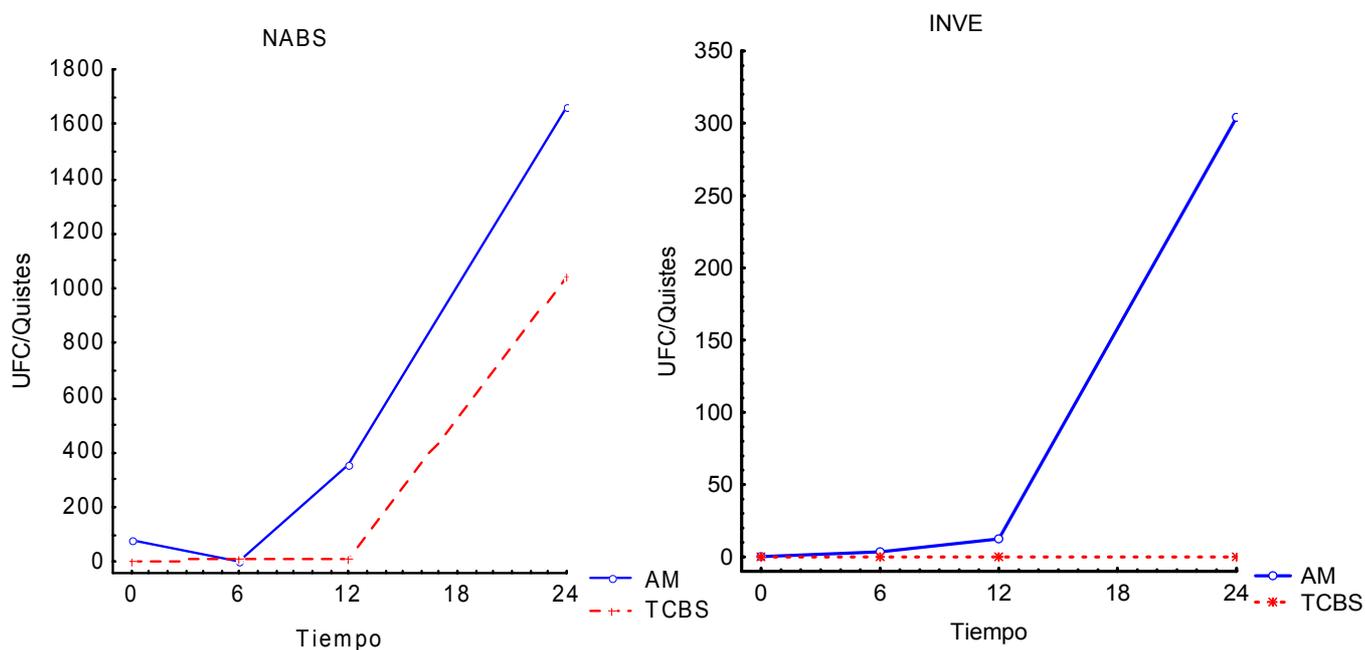


Figura 10. Proliferación de bacterias durante la eclosión de *Artemia*.

6.5. Efecto de las bacterias antagónicas (C37, C80 y C96) sobre *Vibrio harveyi* durante la eclosión de *Artemia*.

Se observó que la proliferación de vibrios ocurre entre las 12 y 24 horas a partir de que los quistes de *Artemia* son puestos a eclosionar, lo cual coincide con los tiempos a los que ocurre la eclosión. El número de vibrios en los eclosionadores sin bacterias antagónicas fue de 10^3 a 10^5 vibrios mL^{-1} a las 24 horas. Mientras que en los tratamientos a los que se agregaron bacterias antagónicas la proliferación de *Vibrio harveyi* fue menor; las cepas C37 y C96 inhibieron por completo su proliferación, mientras que con la cepa C80 sólo crecieron 10^3 vibrios mL^{-1} (Fig. 11).

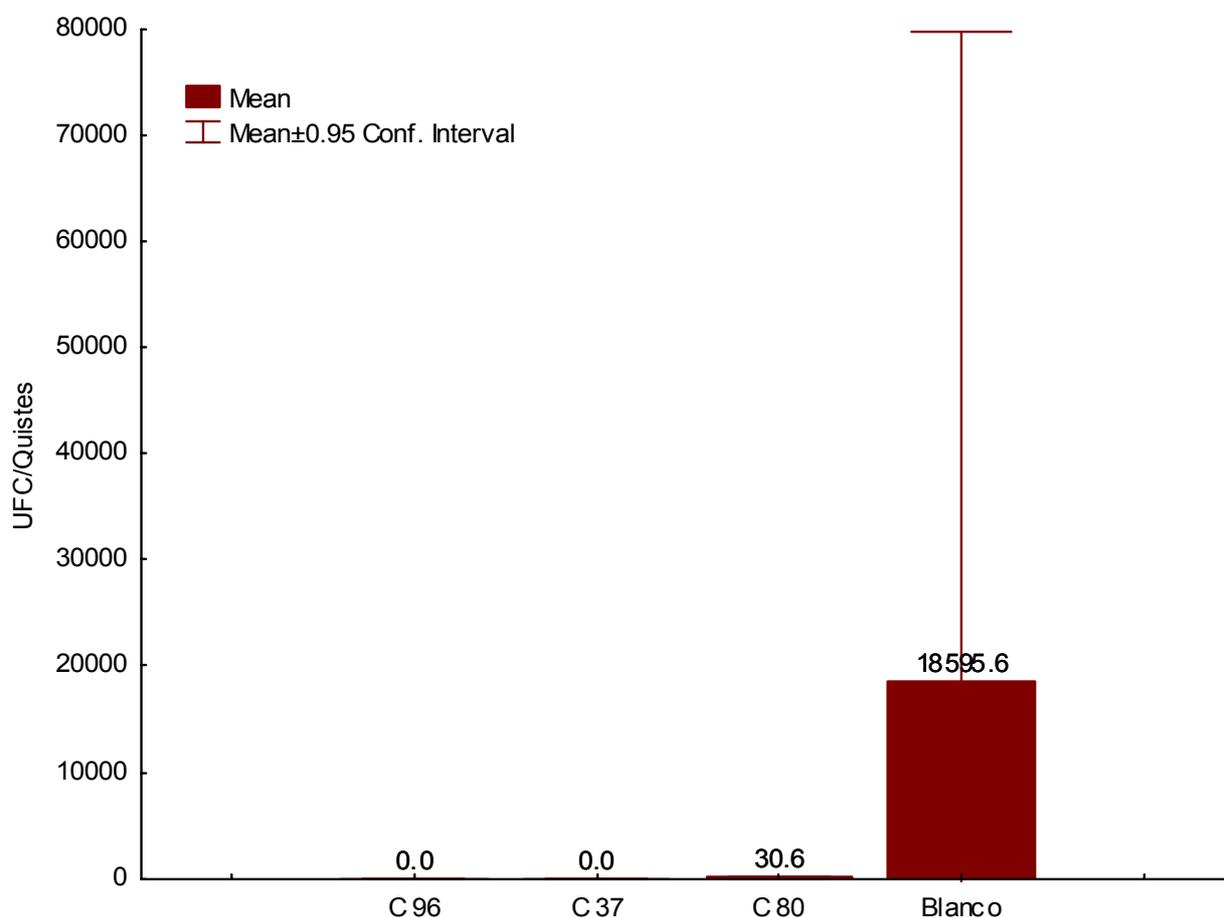


Figura 11. Efecto de las bacterias antagónicas sobre la proliferación de *Vibrio harveyi* en la eclosión de *Artemia*.

6.6. Aislamiento de fagos

En las 12 muestras obtenidas de los tanques 2, 6, 12, 25, 28 y de lugares aledaños a la granja APSA se lograron aislar vibriófagos, sin embargo, no se pudieron mantener; mientras que de las 45 muestras obtenidas de distintos puntos de la Ensenada y Bahía de La paz se obtuvieron un total de 90 pruebas positivas (tabla 6).

Tabla 6. Resultados del análisis de la presencia de vibriófagos en muestras tomadas de La Bahía y Ensenada de La Paz. “+” efecto lítico sobre bacterias blanco; (-) no causa lisis. (25916=*Vibrio (Listonella) pelagia*, 35084=*V. carchariae*, 14048=*V. natriegens*, 17802=*V. parahaemolyticus*, 25920=*Vibrio campbellii*, 14126=*Vibrio harveyi* y 15338=*Vibrio proteolyticus*).

Numero de muestra	Cepas de Blanco						
	25916	35084	14084	17802	25920	14126	15338
1	+	-	+	-	+	+	-
2	+	-	+	-	+	+	-
3	-	-	+	-	+	+	-
4	-	-	-	-	+	+	-
5	-	-	-	-	-	+	-
6	-	-	-	-	+	+	-
7	+	-	-	-	-	+	-
8	-	-	-	-	-	-	-
9	+	-	-	-	-	+	-
10	+	-	-	-	-	+	-
11	+	-	-	-	-	-	-
12	+	-	-	-	-	+	-
13	+	-	-	+	-	+	-
14	+	-	-	-	-	-	-
15	+	-	-	+	-	+	-
16	+	-	+	-	-	-	-
17	-	-	+	-	-	+	-
18	+	-	+	-	-	+	-
19	-	-	+	+	-	+	-
20	-	-	+	+	-	+	-
21	+	+	+	-	-	-	-
22	-	+	+	-	-	+	+
23	-	+	+	-	-	+	+

Tabla 6. Continuación

24	+	+	+	-	-	+	-
25	+	-	+	-	-	-	-
26	-	-	+	-	-	-	-
27	+	-	+	-	-	-	-
28	+	-	+	-	-	-	-
29	+	-	+	-	-	-	-
30	+	-	-	-	-	-	-
31	+	-	-	-	-	-	-
32	+	-	+	-	-	-	-
33	+	-	-	-	-	-	-
34	+	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-
36	+	-	-	-	-	-	-
37	+	-	-	-	-	-	-
38	+	-	-	-	-	-	-
39	+	-	-	-	-	-	-
40	+	-	-	-	+	-	-
41	+	-	-	-	-	-	-
42	+	-	-	-	-	-	-
43	+	-	-	-	+	-	-
44	+	-	-	-	+	-	-
45	+	-	+	-	+	-	-

6.7. Evaluación de la actividad de vibriófagos, método I.

Mediante este método se logró observar la actividad lítica de los fagos de *V. harveyi* en diecinueve placas; sin embargo, no se logró contabilizar el número de fagos presentes (Fig. 12).

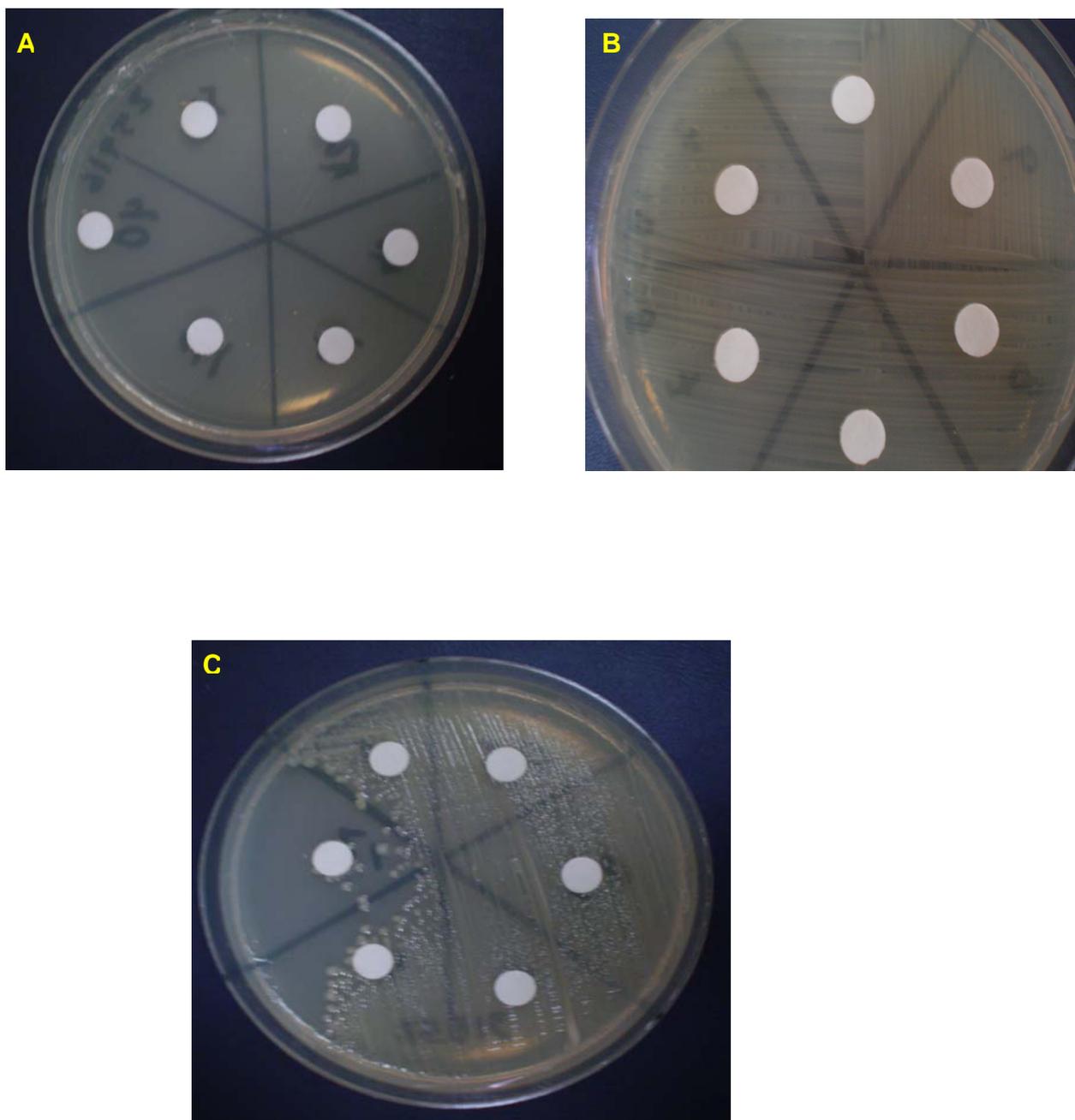


Figura 12. Evaluación en placa de la actividad de vibriófagos en muestras de la Ensenada y Bahía de La Paz **(A)** Placa con efecto inhibitorio en todas las muestras probadas, **(B)** Placa sin efecto inhibitorio en todas las muestras y **(C)** Placa con efecto inhibitorio en sólo una muestra (ver detalles en texto).

6.8. Caracterización de la actividad de los vibriófagos aislados.

a) Efecto de la salinidad

De las diferentes concentraciones de salinidad evaluadas en el presente estudio, se determinó que la salinidad adecuada para la expresión de los vibriófagos fue de 25 ‰ ya que ésta permitió tener una mayor actividad lítica (Fig. 13). El resto de las salinidades no permitieron tener una actividad lítica favorable para los vibriófagos (Apéndice 3).

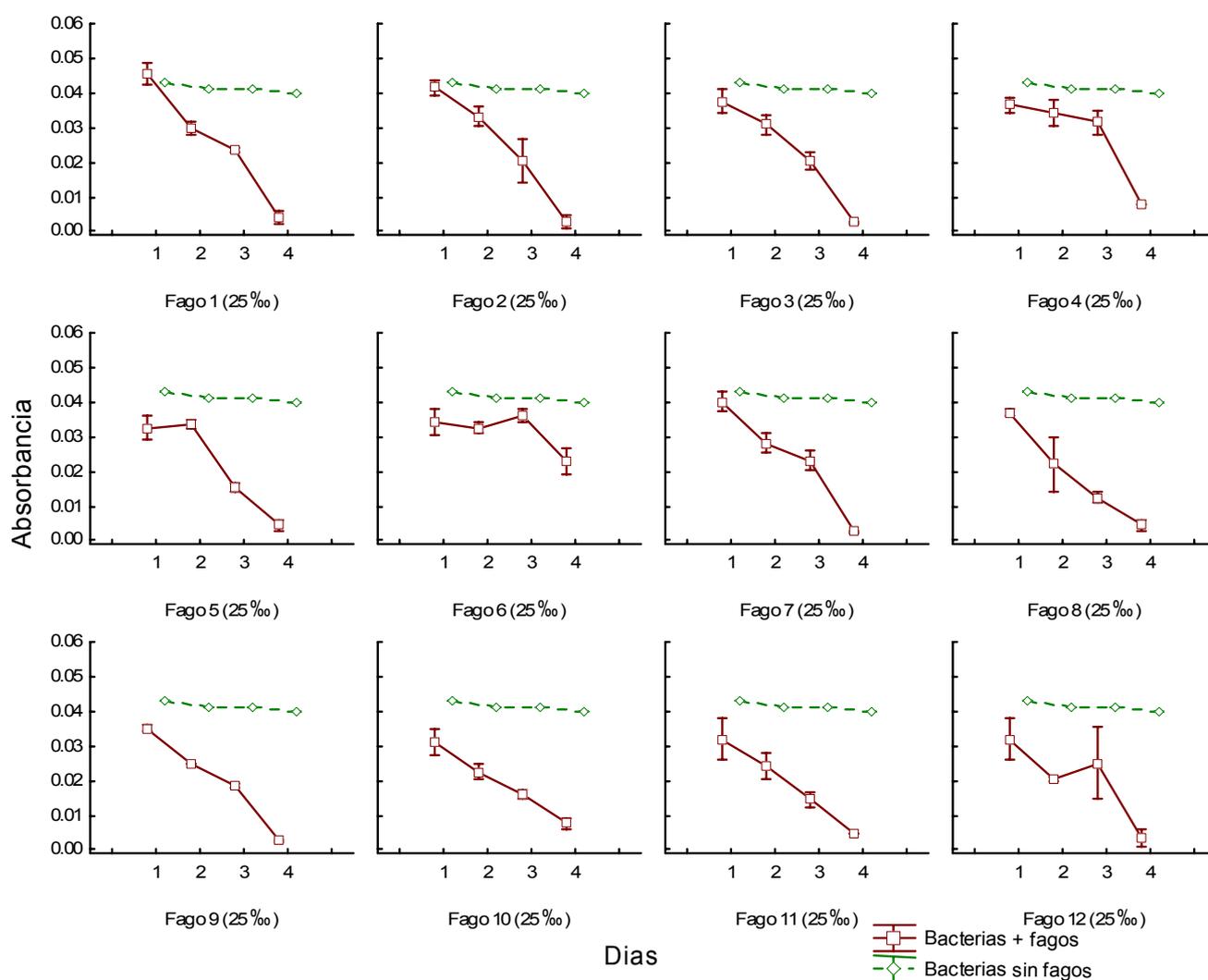


Figura 13. Ejemplo de la lisis causada por vibriófagos en diferentes concentraciones de NaCl.

b) Efecto de la temperatura

De las diferentes temperaturas evaluadas en el presente estudio, se determinó que la temperatura adecuada para la expresión de los vibriófagos fue de 30° C, permitiéndoles tener una mejor actividad lítica (Figs 14). En el resto de las temperaturas la lisis fue menos evidente (ver apéndice 3).

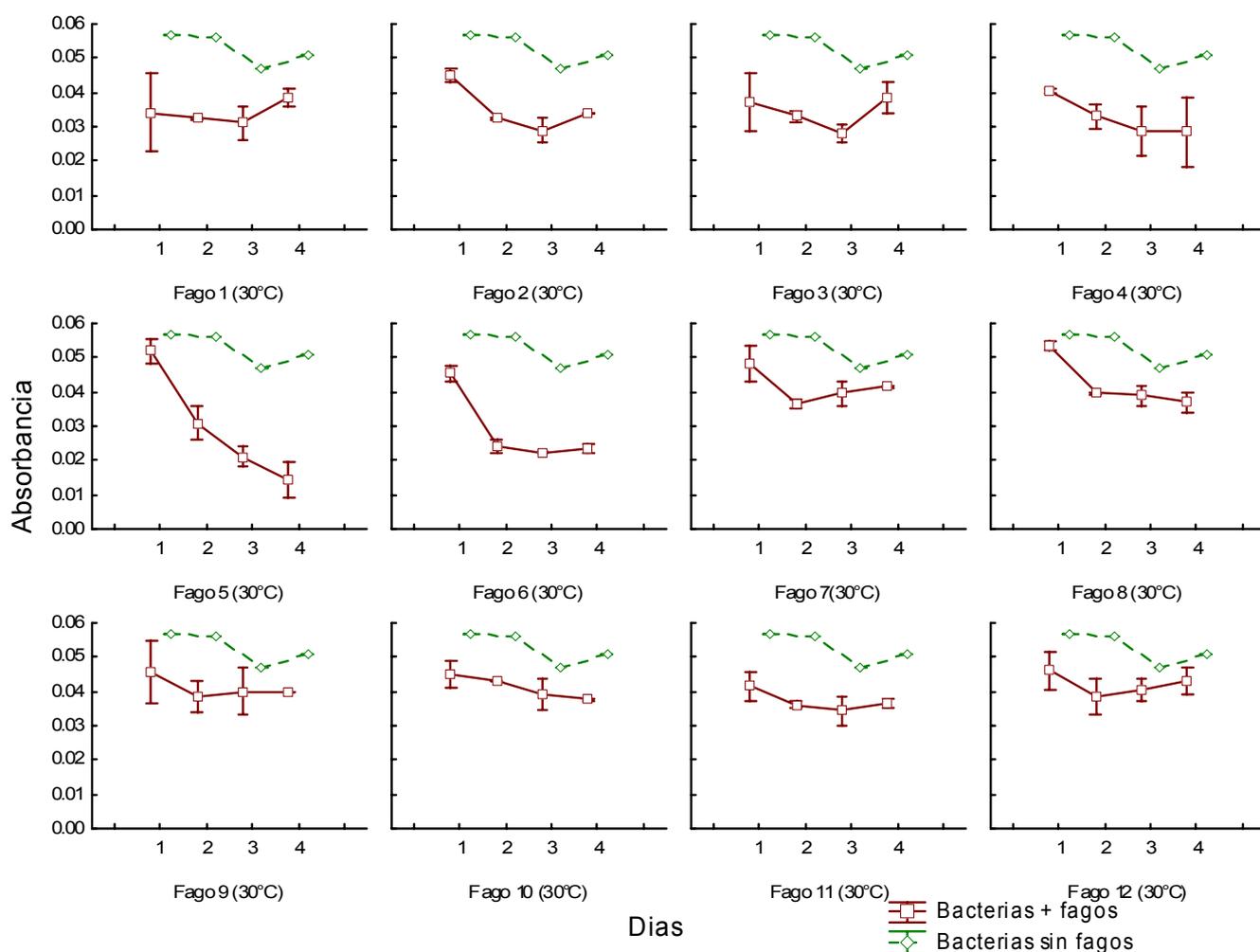


Figura 14. Ejemplo de la lisis causada por vibriófagos en diferentes temperaturas.

c) Efecto de la concentración del medio

De las diferentes concentraciones del medio de cultivo evaluadas en el presente estudio, se determinó que las concentraciones adecuadas para la expresión de los vibriófagos fueron diferentes para cada uno ya que su actividad varía en las distintas concentraciones de medio (Figs 15-18).

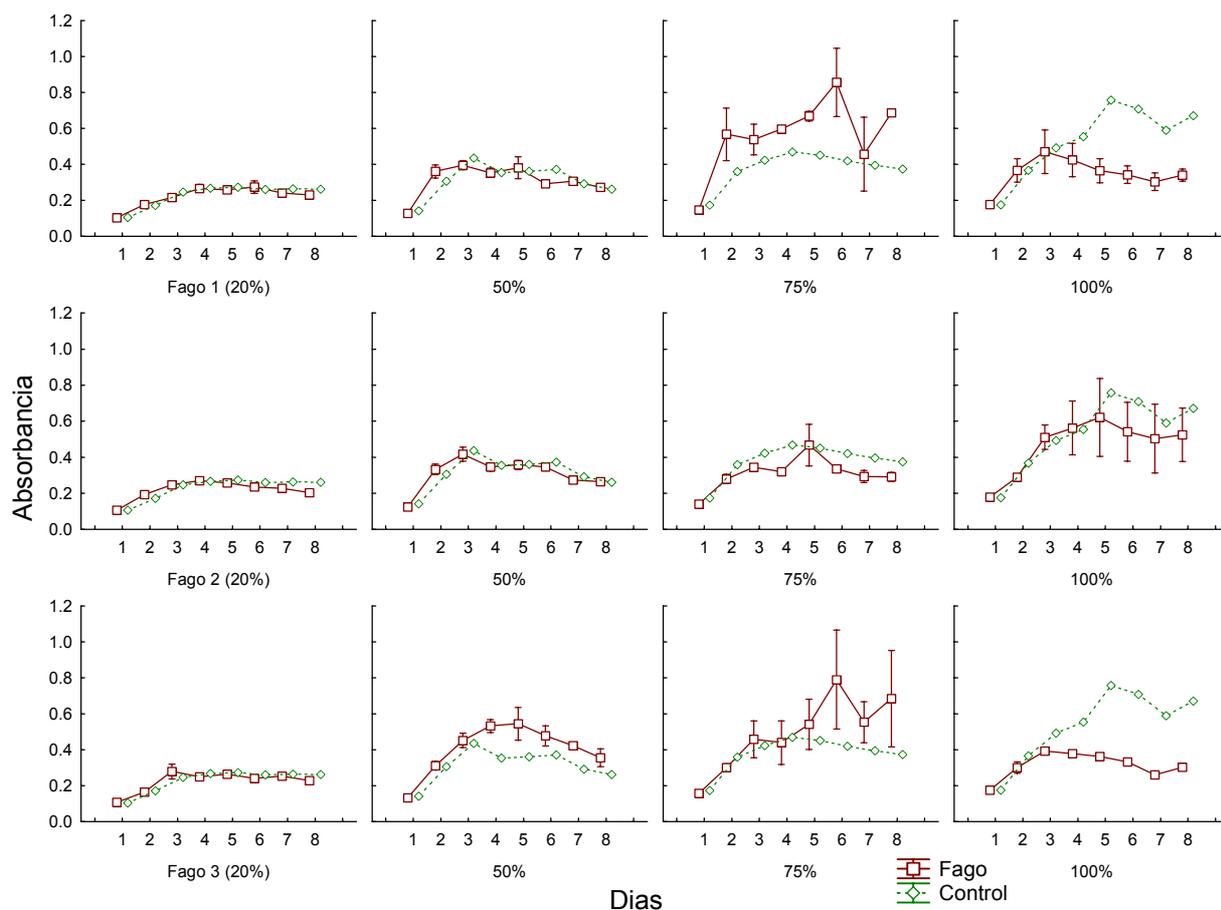


Figura 15. Comportamiento de la expresión de los vibriófagos 1, 2 y 3 en diferentes concentraciones de medio.

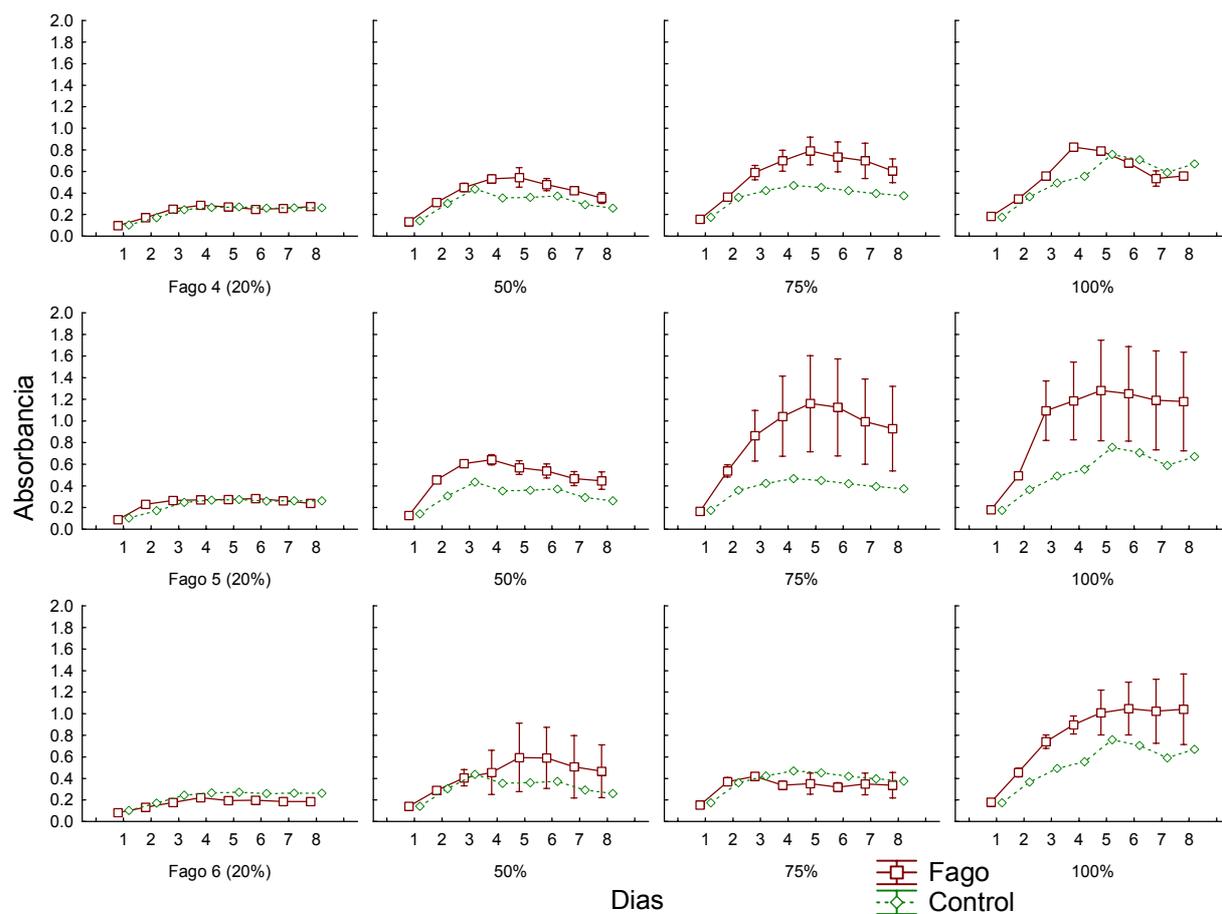


Figura 16. Comportamiento de la expresión de los vibriófagos 4, 5 y 6 en diferentes concentraciones de medio.

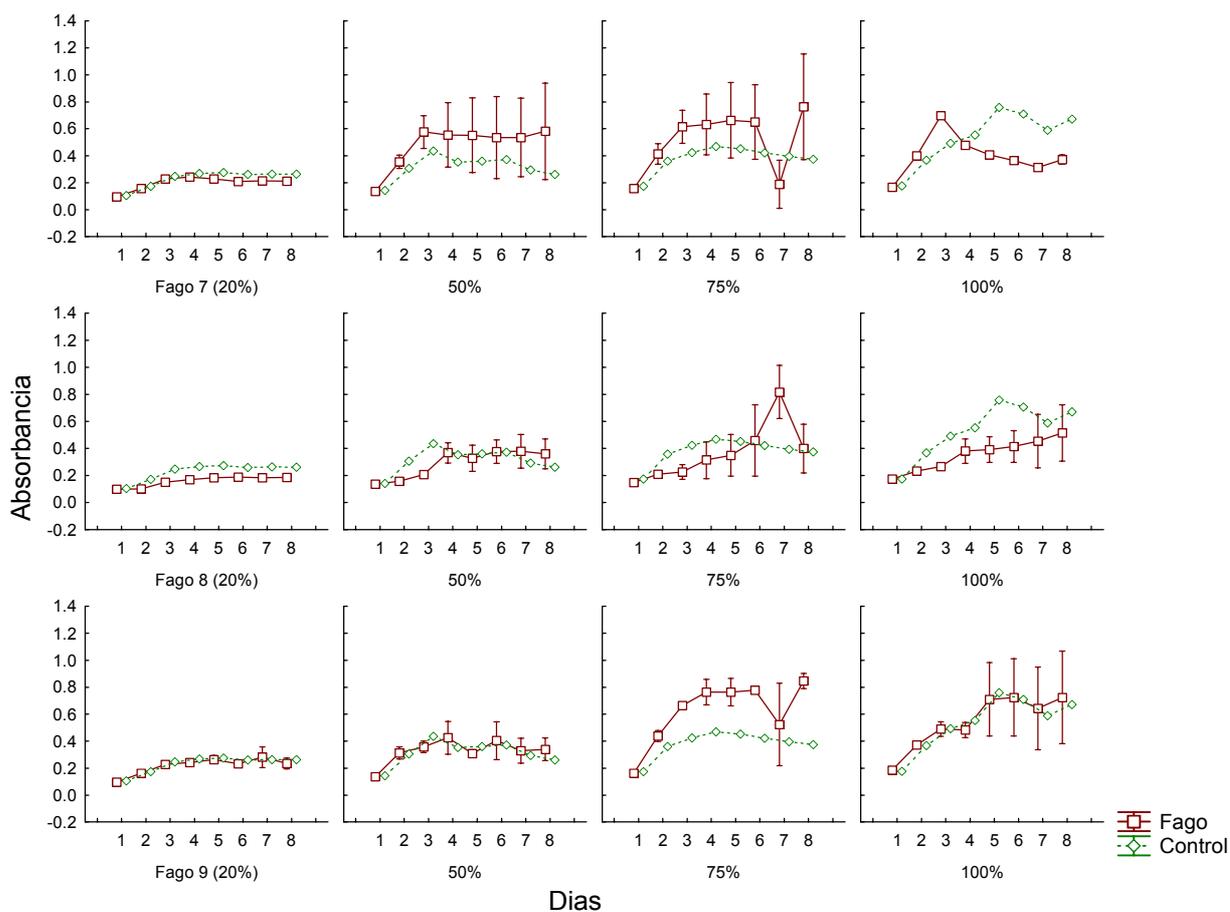


Figura 17. Comportamiento de la expresión de los vibriófagos 7, 8 y 9 en diferentes concentraciones de medio.

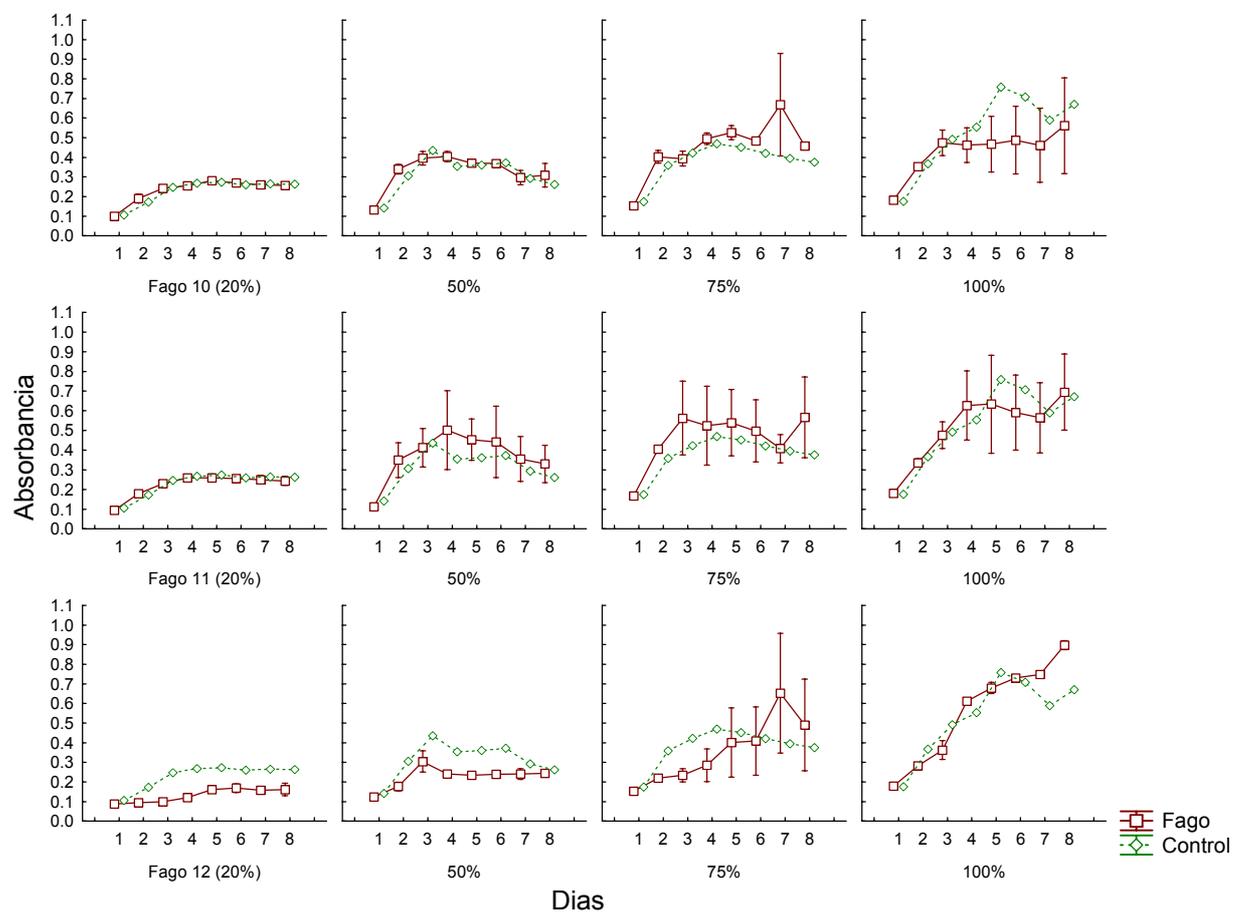


Figura 18. Comportamiento de la expresión de los vibriófagos 10, 11 y 12 en diferentes concentraciones de medio.

6.9. Aislamiento en placa, método II.

Mediante este método y con las condiciones óptimas de actividad de los fagos, se logró observar la actividad lítica sobre *Vibrio harveyi* (ATCC 14126). A diferencia de la otra técnica, esta resulta ser la más viable para realizar el conteo de los vibriófagos presentes en las muestras aisladas de la Ensenada y Bahía de La Paz, ya que es posible detectar las zonas de lisis las cuales son un indicador de la presencia de fagos; esto puede observarse en la Fig. 19.

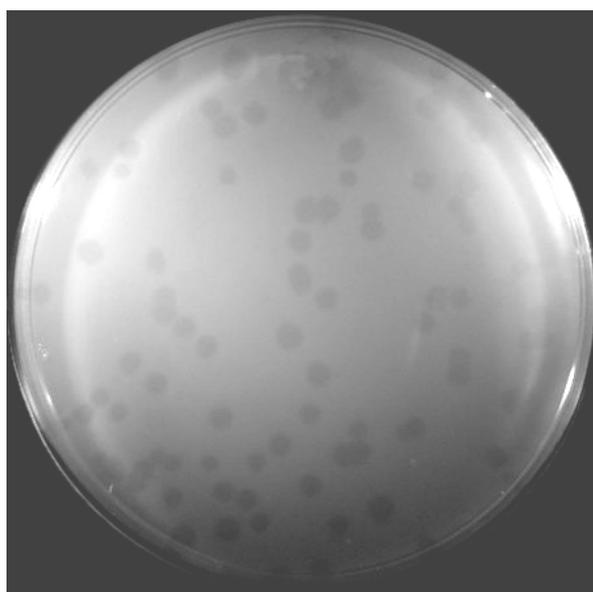


Figura 19. Placa con fagos de *V. harveyi* (ATCC 14126)

6.10. Evaluación de fagos durante la eclosión de *Artemia*.

Se observó que en los eclosionadores con quistes de *Artemia*, la proliferación de *Vibrio* sp ocurre a las 12 h a partir de la eclosión (Fig. 20). El número de *Vibrio harveyi* en los eclosionadores sin fagos fue de 10^3 UFC/quiste a las 12 horas, además de presentar dos incrementos a las 24 y 72 h después de la eclosión. En los tratamientos con el vibriófago F8 se observó que éste inhibió el crecimiento de *Vibrio harveyi*; sin embargo, permitió la proliferación de *Vibrio proteolyticus* el cual hipotéticamente estuvo presente antes de la eclosión de los quistes como microflora de éstos; el desarrollo de este último *Vibrio* fue menor a las 24 horas. Esto puede sugerir que este fago es específico contra *V. harveyi*. Finalmente en los tratamientos con el fago F12 se inhibió por completo la proliferación tanto de *Vibrio harveyi* como de otro tipo de vibrios durante y después de la eclosión de *Artemia* a partir de las 12 h, lo cual nos puede sugerir que éste no es específico (Fig. 21).

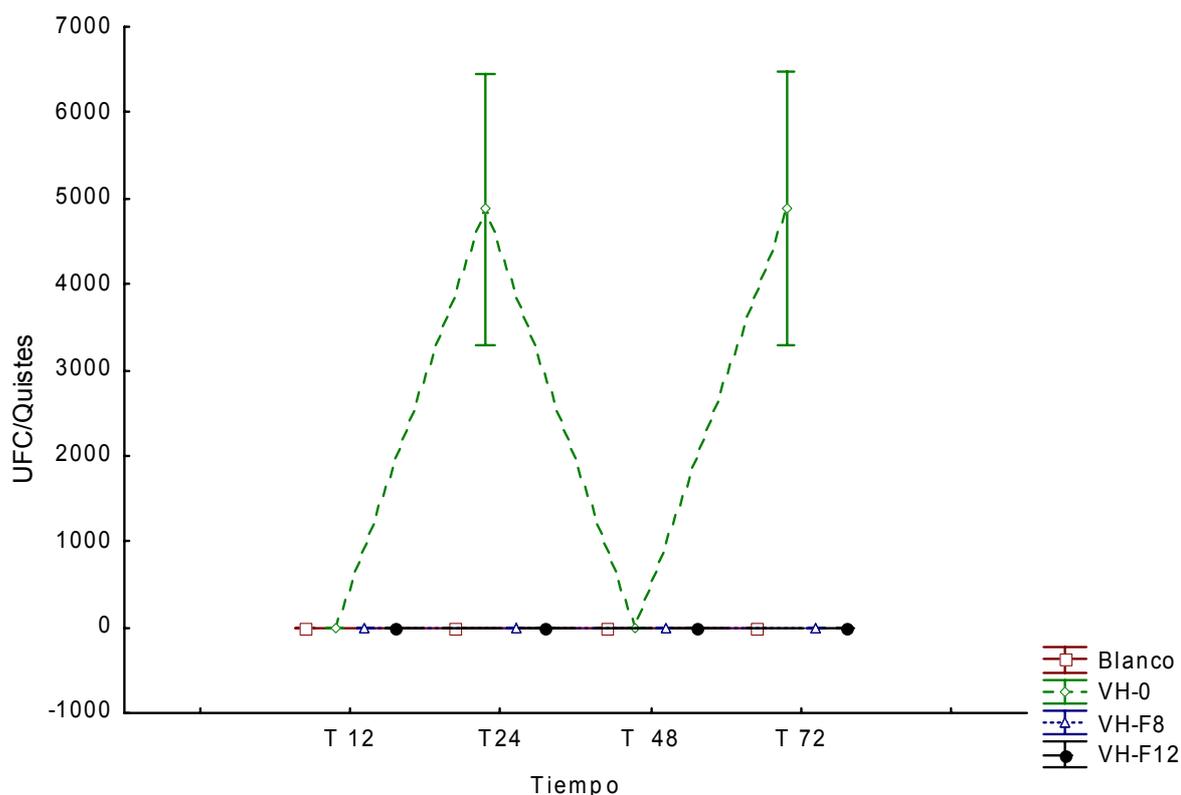


Figura 20. Comportamiento de la proliferación de *Vibrio harveyi* con y sin fagos en un periodo de 72 horas

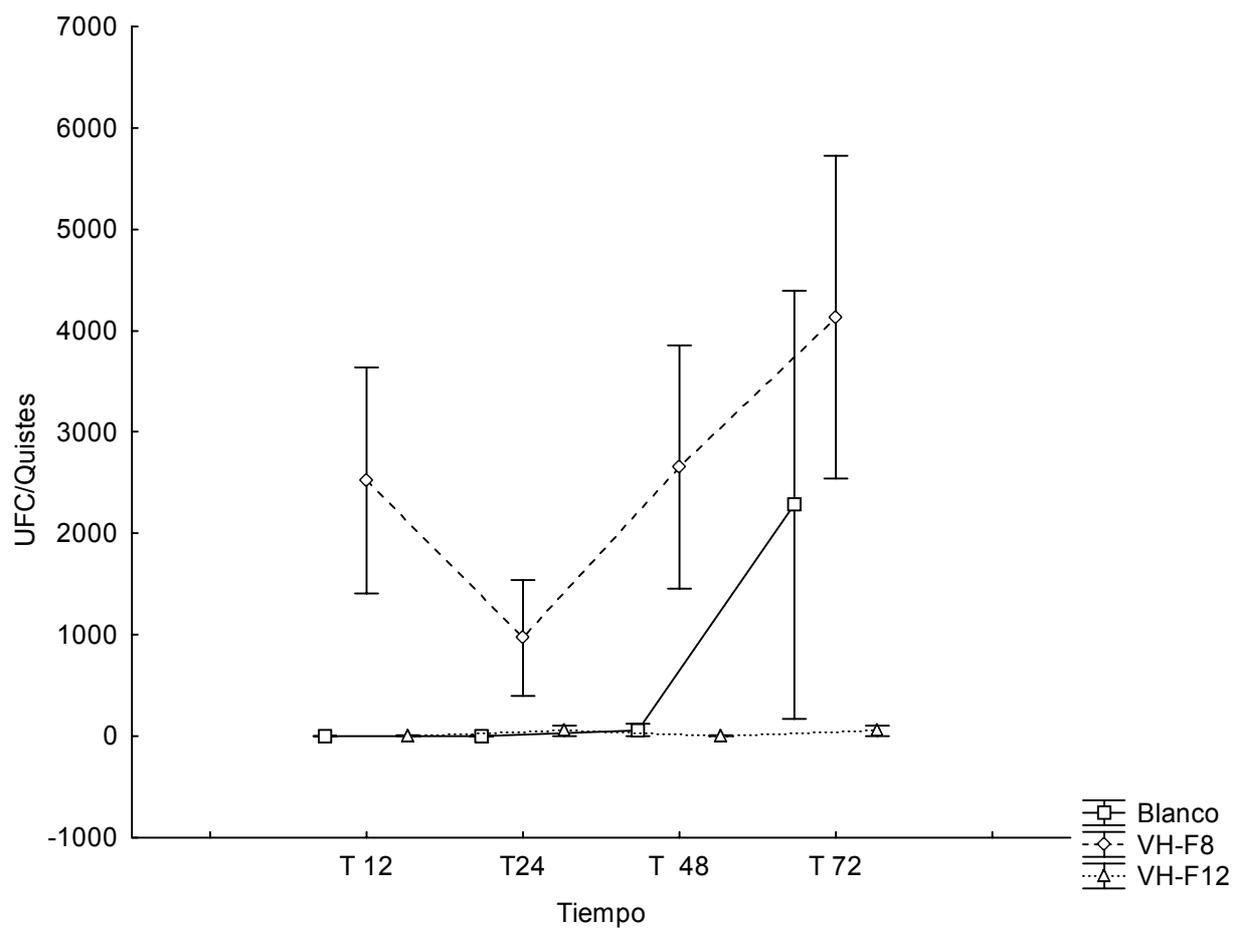


Figura 21. Comportamiento de los vibriófagos F8 y F12 sobre el crecimiento de *Vibrio* spp por un periodo de 72 horas

7. Discusión.

7.1. Aislamiento de bacterias del cultivo larvario.

En las muestras aisladas de la microflora del camarón durante el presente estudio se observó que la cantidad de bacterias con efecto antagónico a *Vibrio harveyi* es irregular. Durante los primeros estadios larvarios de camarón no son muy frecuentes debido, tal vez, al régimen alimenticio a base de microalgas. Mientras que en estadios posteriores ya con otro tipo de alimento, como *Artemia*, se registró un número considerable de bacterias patógenas, así como la presencia de bacterias con efecto inhibitorio contra *Vibrio harveyi*. Lo mismo observaron Garriques y Arévalo (1995), quienes realizaron el aislamiento de *V. alginolyticus* del agua de cultivo y de larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en donde la mayor incidencia de bacterias con efecto de inhibición fue ante patógenos oportunistas en los estadios de protozoa. En esta etapa existe un cambio de régimen alimenticio en los organismos por lo que se considera relevante un seguimiento de la temporalidad de la presencia de bacterias con efecto antagónico, sobre todo si se piensa en el desarrollo de la camaronicultura, en el que la estacionalidad de las enfermedades puede marcar periodos de pérdidas económicas. De igual manera, el aislamiento de bacterias con efecto inhibitorio contra *Vibrio* spp. dentro de los sistemas de cultivo de camarón fue semejante al indicado por Rosenfeld y Zobell (1947), quienes aún cuando no intentaron el aislamiento de antibióticos específicos de bacterias marinas encontraron que algunas de éstas producían sustancias antibacterianas inhibitorias para bacterias patógenas oportunistas; Bakker y Schippers (1987), analizaron la actividad competitiva de los compuestos liberados por *Pseudomonas* spp contra otro tipo de bacterias, encontrando bacteriocinas; las cuales producen componentes como sulfanilamida el cual es una coenzima esencial para la síntesis de aminoácidos, purinas y pirimidinas; además, de observar la liberación de colisinas que, al ser liberadas, las bacterias muertas fueron proporcionalmente a la cantidad de colisinas presentes, demostrando con ello que una molécula de colisina es suficiente para destruir una bacteria. Davis *et al.* (1979), encontraron que la competencia por las sustancias nutritivas es un mecanismo relacionado con los procesos de

antagonismo bacteriano en medios de cultivo el cual se comprende por la acción bacteriostática de las sulfamidas, que está relacionada con la formación del ácido fólico, el cual rivaliza con el ácido para-aminobenzoico para combinarse con el sustrato implicado en la formación del ácido fólico evitando así la multiplicación de los organismos.

En muchas ocasiones dentro de los sistemas de cultivo y dentro de la microflora de organismos marinos, la proliferación de bacterias con actividad antagónica ante patógenos oportunistas es abundante (Zherdman *et al.*, 1997). Horsley (1977), aisló bacterias de la microflora de organismos marinos durante diferentes estadios larvarios; Campbell y Buswell (1983), continúan con el aislamiento de bacterias en peces con compuestos inhibitorios en diferentes etapas del desarrollo larvario logrando aislarlas durante cada estadio.

7.2. Identificación de los vibrios presentes en la microflora de camarón.

Se identificaron la mayoría de las bacterias aisladas en TCBS, observando que la morfología celular de la mayoría de las cepas aisladas fueron bacilos o bacilos cortos Gram-negativos y una Gram-positiva, catalasa positivos (tabla 1). Con la prueba de oxidación-fermentación de sacarosa, todas las cepas presentaron fermentación hasta 4 días de incubación.

La mayoría de las cepas fueron identificadas como *Vibrio proteolyticus* por ser bacilos Gram negativos, catalasa positivos, desarrollarse en medio aerobio, presentar movilidad, y reaccionar positivamente a oxidasa (McFadin, 1980; Austin y Austin, 1987).

Las cepas 1, 2, 10,11, 12, 13, 14 y 15, a diferencia de las otras cepas, eran bacilos cortos o cocos Gram-negativos que, presentaron motilidad, por lo que fueron identificadas como *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio carchariae* (MacFadin, 1980). A pesar de que con los esquemas de identificación utilizados se pueden concluir las características entre bacterias, éstas pueden ser similares por lo que caerían en la misma identificación, por lo que ésta debe ser tomada con reserva. Por lo tanto, siendo la identificación de los agentes etiológicos, en el cultivo de organismos marinos una parte importante que puede determinar las medidas de control zoonosanitario aplicadas en una granja de producción acuícola a gran escala, el uso de las técnicas

tradicionales para la identificación no es práctico por el tiempo requerido para establecer un diagnóstico (Mialhe *et al.*, 1992). La necesidad de contar con técnicas de diagnóstico rápidas para dar respuesta inmediata a los problemas, plantea la posibilidad de implementar de nuevas técnicas de mayor precisión. Muchos autores sugieren el uso de técnicas inmuno-enzimáticas (Lewis, 1981; Alexandra, 1991; Mialhe *et al.*, 1992), inmunológicas (Paterson *et al.*, 1979) y de hibridación de ADN (Vivares y Guesdon, 1992; Mialhe *et al.*, 1992). En muchos casos, la identificación de las cepas bacterianas por los métodos tradicionales no conduce a identificación positiva, ya que la gran similitud entre las cepas en ocasiones hace difícil su diferenciación, a menos que se cuente con gran número de pruebas bioquímicas para establecer un diagnóstico.

En estudios recientes el uso del sistema Biolog[®] se ha empleado como una herramienta para numerosas pruebas con cierto número de caracteres fenotípicos. De igual manera, Biolog GN2 se ha empleado para la caracterización de fuentes de contaminación en sistemas de larvicultivo de camarón (Vandenberghe *et al.*, 1999) y sistemas de producción de rotíferos (Verdonck *et al.*, 1997), ya que las características fenotípicas de las bacterias muchas veces presentan severas dificultades debido a la alta diversidad bioquímica y descripción de nuevas especies, lo cual lleva a una nueva taxonomía en constante cambio (Alsina y Blanch, 1994). Sin embargo, el uso de esta prueba puede ser restringido a algunos grupos de patógenos, y su uso requiere una mayor evaluación, ya que por las fuentes de carbonos con que trabaja pueden presentar problemas al momento de la identificación. Por ejemplo, el distinguir los altos niveles de heterogeneidad que presentan las bacterias en muchas veces en el sistema Biolog GN2, puede ser debido a la similitud que pueden llegar a presentar (Pedersen *et al.*, 1998).

Se destaca la presencia de *Vibrio proteolyticus*, debido a que fue la especie más común del camarón blanco y que coloniza un mayor número de organismos.

En las larvas de camarón blanco fue posible observar un aislamiento diferencial de las bacterias durante los estadios larvarios. *Kitococcus sedentarius* fue aislado durante el estadio de nauplio I, *Vibrio alginolyticus*, *Pseudomonas creosotensis* y *V. cholerae* (no O1) fueron aislados de mysis I, *V. harveyi* de mysis III y *V. alginolyticus* y *V. harveyi* nuevamente de poslarva I

(tabla 3). Esto ha sido reportado también para otros casos de vibriosis en camarón y es considerado como criterio para establecer diferencias entre las patologías producidas por las especies de *Vibrio* (Harbell 1976; Funahashi *et al.*, 1974; Miyazaki y Kubota 1977; Miyazaki *et al.*, 1977). Por un lado, la distribución de las bacterias en los órganos puede ser el reflejo de los factores producidos por un patógeno, con los que sobreviven dentro de un portador y causan enfermedad y por otro lado, muestra el efecto selectivo que se ejercen sobre las poblaciones bacterianas. Sin embargo, esta distribución no debe ser tomada estrictamente como característica para diagnosticar una enfermedad, ya que dependerá de las condiciones ambientales en las que se desarrolle el proceso de infección, el estado de salud del organismo y el grado de avance de la infección al momento de hacer los aislamientos (Gómez-Gil *et al.*, 1998).

7.3. Antagonismo bacteriano.

Las bacterias por naturaleza presentan mecanismos antagónicos que les permiten subsistir en determinados ecosistemas. Así, varios investigadores, en pruebas *in vitro*, han utilizado la propiedad antagónica para la selección de cepas candidatas a control biológico. Dopazo *et al.* (1988), utilizando medios líquidos, observaron que una bacteria marina cepa FP6 inhibió el crecimiento de cepas patógenas como *Aeromonas hydrophila* B-32, *Aeromonas salmonicida* ATCC 14174 y *V. anguillarum* R-82, por la producción de una sustancia antibiótica. Tal es el caso de las cepas con efecto antagónico aisladas durante el presente estudio, las cuales al momento de ser probadas contra *V. harveyi* se hipotetiza que liberaron una sustancia inhibidora, además de que se verificó la capacidad antagónica de dicha sustancia bajo las mismas condiciones a los estudios realizados por Chythanya *et al.* (2001), quienes aislaron la bacteria marina, *Pseudomonas* I-2, la cual, al igual que las cepas aisladas del cultivo producen una sustancia de bajo peso molecular, estable al calor, soluble en cloroformo y resistente a enzimas proteolíticas que inhibe el crecimiento de *V. harveyi*, el cual es uno de los principales patógenos en larvas de camarón. Sin embargo, en el presente estudio no se identificaron los componentes inhibidores que producen las bacterias antagónicas.

De igual manera, se observó que la liberación de sustancia no es igual en todas las bacterias, ya que al momento de agregar las tres bacterias con acción inhibitoria, durante y después de la eclosión de *Artemia*, dos cepas (C36 y C96) inhibieron por completo el desarrollo de *V. harveyi* y una cepa (C80) permitió parcialmente el desarrollo de este patógeno, lo cual concuerda con los estudios realizados por Dhont y Lavens (1996), quienes demostraron que el agregar bacterias antagónicas a bacterias patógenas durante los cultivos de *Artemia*, en su mayoría permitieron tener una mejor tasa de crecimiento y sobrevivencia dentro de los cultivos axénicos, simultáneamente en un cultivo bajo condiciones no estériles. Douillet (1987), reportó que en estos tipos de cultivos, al igual que los axénicos, la tasa de sobrevivencia y desarrollo es similar, sin embargo, afirmó que el valor nutricional de *Artemia* depende de la colonización espontánea de las bacterias tanto patógenas como antagónicas.

Gorospe y Nakamura (1996), afirman que el uso de dichas bacterias dentro de los cultivos contribuye muchas veces al incremento del valor nutritivo del alimento, ya que la cantidad de proteínas y aminoácidos es mayor al ingresar las bacterias con efecto antagónico.

Douillet y Langdon (1994), afirman que el ingresar bacterias con efectos benéficos en el alimento a los sistemas de cultivo de crustáceos, moluscos y peces tiene el efecto de promover la supervivencia y/o crecimiento de éstos porque constituyen una fuente importante de antagonismo, dado que contienen los componentes bacteriostáticos o bactericidas sobre las bacterias patógenas oportunistas.

Los eventos que precedieron la condición del uso de bacterias antagónicas durante y después de la eclosión de *Artemia*, apoyan las observaciones en relación a que las bacterias patógenas oportunistas pueden llegar a ser controladas, en especial las del género *Vibrio*, las cuales muchas veces se presentan cuando los organismos se encuentran en estadios larvales puesto que en esta etapa de desarrollo sus defensas son bajas debido a la formación de su tracto digestivo.

Aunado a lo anterior, el uso de antibióticos para el tratamiento de bacterias patógenas debe ser evaluado en cuanto a efectividad y efectos adversos que su uso puede generar, de preferencia debe pensarse en un bactericida de amplio espectro, probado *in vivo* y que actúe rápido para que

existan pocas posibilidades de manifestarse resistencia en los patógenos (Stamm, 1989).

Lo anterior hace patente la necesidad de implementar medidas profilácticas que eviten la aparición de enfermedades causadas por bacterias patógenas, cuidando la calidad del agua y un buen régimen alimenticio durante la producción larvaria, el cual incluya estimuladores del sistema inmune durante el tiempo de desoves y posterior a éste (Hardie *et al.*, 1990; Obach y Laurencin, 1992). Ya que, como se ha visto, además de existir compuestos que pueden favorecer la resistencia a las enfermedades cuando son agregados a la dieta, la composición de la dieta influye de manera directa en la respuesta inmune, tanto de peces como de crustáceos,.

7.4. Aislamiento de fagos.

Los bacteriófagos son capaces de infectar una gran proporción de colonias bacterianas de los sistemas de producción acuícola. Al momento de aislarlos de la producción de camarón en la granja APSA se observó una actividad lítica al momento de ser probados contra cepas de *Vibrio harveyi*, de manera similar a lo reportado por Borsheim (1992), quien aisló vibriofagos de los sistemas de producción piscícola, demostrando la abundancia de éstos en los cultivos de peces y/o crustáceos.

En cuanto a los bacteriófagos del medio marino se han descrito una gran variedad, incluyendo su tipo de morfología y requerimiento de las concentraciones de NaCl del agua de mar para su desarrollo y proceso de infección de bacterias patógenas (Weibe y Liston., 1968; Keynan *et al.*, 1974; Zachary, (1974). La mayoría de los bacteriófagos suelen ser encontrados en las partes cercanas a la costa o en las superficie de ambientes marinos, ya que por lo regular es el sitio en el cual se encuentran la mayoría de las bacterias patógenas para humanos, peces y crustáceos como las del género *Vibrio* spp. (Spencer, 1963). Esto concuerda con las observaciones realizadas durante el presente estudio ya que los bacteriófagos aislados tanto de la Bahía como de la Ensenada de La Paz se encontraron en zonas cercanas a la costa y en la superficie del medio marino y al momento de analizar el aislamiento en el

laboratorio, presentaron una actividad lítica con las cepas de *Vibrio* spp. (ATCC).

Estas observaciones concuerdan con los trabajos realizados por Baross *et al.* (1978), quienes aislaron bacteriófagos de *Vibrio parahaemolyticus*; Wu *et al.* (1981). Al estudiar la diversidad de bacteriófagos en el mar del norte descubrieron un sin número de éstos, los cuales presentaron actividad lítica hacia bacterias patógenas del género *Vibrio* spp. Así mismo, DePaola *et al.* (1998), quienes analizaron la abundancia y diversidad de bacteriófagos en el Golfo de México observaron que la abundancia y la diversidad de éstos es mayor en las costas y en la superficie.

En cuanto a los ensayos de tolerancia *in vitro* a factores fisicoquímicos como temperatura del medio y la salinidad, los óptimos para la expresión de la actividad variaron entre los vibriófagos probados. Así se encontró que la temperatura de 30°C permite tener una actividad en un periodo de 18 horas, lo cual coincide con lo sugerido por Matsuzaki *et al.* (1992), quienes afirman que la temperatura de 30°C permite mantener y activar los fagos contra *Vibrio* spp., además de que la producción de éstos es muy rápida y que pueden llegar a ser específicos contra algunas bacterias. Dentro del intervalo de salinidad se observó que el óptimo fue de 25 ‰ ya que en ésta, junto con la temperatura óptima, el tiempo de producción de fagos fue muy rápida en agua de mar artificial; al igual que lo observado por Park *et al.* (2000), quienes aislaron un bacteriófago de los cultivos de *Plecoglossus altivelis*, que presentó una actividad lítica a una salinidad de 25 ‰. En cuanto al tiempo de actividad, éste concuerda con lo descrito por Stevenson y Airdrie (1984), quienes al analizar el tiempo de actividad de los fagos YerA41, Yer2AT y YerL62 de *Yersina ruckeri* observaron que la actividad de estos fagos es a partir de las 18 horas a una temperatura de 30°C y a salinidades de 25 y 30 ‰ lo cual, al igual que los nuestros, presentan diferencias en cuanto a los requerimientos para su actividad litica.

7.5. Fagoterapia.

Actualmente se dispone de medios adecuados para conseguir preparaciones de fagos y los países occidentales han comenzado a mirar con interés el empleo de los fagos en terapia clínica y en el tratamiento de los alimentos.

Aunque se trata sólo de una alternativa terapéutica en lo concerniente a la emergencia global de resistencias en patógenos bacterianos ha llevado a reevaluar el potencial de los bacteriófagos en el tratamiento de múltiples infecciones (Biswas *et al.*, 2002).

Aún cuando en la acuicultura no se han realizado tantos trabajos de fagoterapia como en humanos, está demostrado, en el presente trabajo como en otros recientes, que ésta puede poner a punto métodos que permiten evaluar la capacidad de los fagos como agentes terapéuticos en acuicultura (Nakai *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2000). Ejemplo de esto son los primeros trabajos sobre aislamiento y caracterización de bacteriófagos aislados de bacterias que infectan a los peces y crustáceos, realizados por Nakai y Park (2000), quienes logran aislar dos tipos de bacteriófagos para *Pseudomonas plecoglossicida* y observan que al momento de ingresar éstos a los sistemas de cultivos de *Plecoglossus altivelis* la actividad lítica inició a partir de las 24 horas de la infección, obteniendo así un índice alto de crecimiento y sobrevivencia de los organismos.

En el presente experimento con fagos para la eliminación de vibrios durante y después de la eclosión de *Artemia* se observó que, al momento de ingresar a los cultivos, eliminan dichas bacterias patógenas en un tiempo relativamente corto. Aunque al momento de la eclosión no se registró la presencia de *V. harveyi* (ATCC 14126), se presentó el crecimiento de *Vibrio proteolyticus* que fue identificado mediante la utilización del MicroLog Release 4.01B I (Ver apéndice 1) a partir de la eclosión, sólo en tubos que contenían al fago F8 mientras que en los tubos con el fago F12 no se observó la presencia de este *Vibrio* o de cualquier otro tipo de bacteria. Esto concuerda con lo descubierto por Nakai y Park (2000), quienes al utilizar el bacteriofago PLg-16 en *Seliara quinqueradiata* descubrieron la presencia de *Pseudomonas plecoglossicida*, que fue responsable de hemorragias internas en los organismos; para ello se dieron a la tarea de aislar un fago del agua de cultivo

de este organismo logrando aislar dos fagos, uno de la familia Myoviridae y otro de la familia Podoviridae. Al ser analizados, los fagos de Podoviridae eliminaron la presencia de 27 cepas de *Pseudomonas* mientras que los de la familia Myoviridae solo infectaron *Pseudomonas plecoglossicida* permitiendo el desarrollo de las demás cepas de *Pseudomonas*.

Por otra parte se ha descubierto en recientes estudios que muchas veces los fagos en vez de ayudar a la eliminación de bacterias patógenas pueden incrementar su virulencia, por ejemplo, los resultados obtenidos por Austin *et al.* (2003), quienes al realizar estudios sobre el control de la virulencia de *V. harveyi*, con el bacteriófago VHML en salmón del atlántico, encontraron que a los 14 días de la infección los organismos presentaron una alta tasa de mortalidad; al momento de reanalizar el aislamiento bacteriano encontraron que *V. harveyi* presentó una duplicación de los genes de haemolisina. Ello concuerda con lo reportado con Oakey y Owens (2000); ellos reportaron que, al momento de agregar el vibriófago VHML, hubo un cambio en la estructura genómica de *V. harveyi*, en trucha arcoiris, donde, a diferencia del salmón del atlántico, la mortalidad se dio a partir de los diez días debido al incremento de la virulencia por efecto del fago.

Por lo anterior, el uso de este tipo de vibriófago requiere de más estudios, ya que aún se desconoce su distribución en el medio ambiente, además de que es posible que a *V. harveyi* le transfiera la capacidad de ser más virulentas, a otro tipo de vibrios (Munro *et al.*, 1999). La información obtenida puede indicar que tanto en acuicultura, como en otros campos de la biología, se deben ampliar los detalles de los límites auténticos del uso de los fagos como agentes terapéuticos frente a las infecciones bacterianas.

8. CONCLUSIONES.

8.1. Aislamiento de bacterias antagónicas.

Con los procedimientos usados en el presente estudio, se observó que la intensidad con la que las bacterias inhiben a *Vibrio* varía entre las cepas aisladas. Con una adecuada selección pueden ser usadas como agentes de control biológico en granjas de cultivo, para reducir la presencia de vibrios en los sistemas de producción acuícola.

8.2. Bacterias antagónicas en *Artemia*.

Los microorganismos administrados durante el presente estudio demostraron poder competir con los patógenos oportunistas, ya que éstos si presentaron la capacidad de sustituirlos y, en el mejor de los casos, poder permanecer en el huésped. Por tal motivo, el seleccionar cepas que producen y excretan bactericidas, antibióticos u otros metabolitos que sean capaces de inhibir y/o antagonizar a la microflora de algunos géneros patógenos, serían una herramienta útil en la acuicultura de crustáceos y/o peces.

8.3. Aislamiento de vibriófagos.

Es posible el aislamiento de fagos, los cuales son abundantes en el medio marino e incluso dentro de los sistemas de producción acuícola, además de la especificidad que llegan a tener éstos ante las bacterias patógenas que están presentes en el medio ambiente o en los cultivos de camarón. Así mismo, se puede conocer el tipo de condiciones con la cual pueden activar su función lítica contra *Vibrio* spp., así se puede saber cómo y de qué manera trabajar con ellos, puesto que pueden ser una herramienta útil para reducir el uso excesivo de los químicos dentro de los sistemas acuícolas.

8.4. Fagoterapia.

El empleo de fagos en el control de enfermedades bacterianas en acuicultura parece prometedor según los datos que se obtuvieron. No obstante, es preciso aislar un mayor número de fagos para conseguir entidades más agresivas frente a las bacterias que mejoren los resultados terapéuticos obtenidos hasta el momento.

9. RECOMENDACIONES.

1) Con la experiencia lograda en el presente estudio se recomienda:

a) Identificar las cepas antagónicas aisladas con herramientas moleculares.

b) Conservarlas como cepas antagónicas de referencia.

2) Respecto a la naturaleza de los compuestos antagónicos:

a) Identificar el grupo químico al que pertenecen los compuestos liberados por las cepas, los cuales pueden ayudar a entender los mecanismos de antagonismo bacteriano.

3) Fagos:

a) Es necesario realizar más estudios sobre su distribución en los sistemas de cultivos de organismos marinos o dulceacuícolas para así tener una mejor idea sobre su papel dentro de dicho sistema.

b) Realizar más pruebas cruzadas para así poder determinar la especificidad de éstos a las bacterias patógenas además de tener una mejor idea de las condiciones en las cuales se expresan.

c) Obtener imágenes fotográficas de los fagos.

4) Finalmente aunque las cepas antagónicas usadas en el presente estudio fueron aisladas como parte de la microflora de camarón y los vibriófagos de la Bahía de La Paz, es necesario realizar estudios para descartar efectos secundarios de las cepas antagónicas a *Vibrio* en el cultivo de *Artemia*.

10. BIBLIOGRAFIA.

- Aguirre G. G. 1994. Evaluación Nutricional de Diferentes Levaduras como Fuentes de Proteína y/o Probiótico en la Alimentación de Camarón Blanco *P. vannamei*. F.C.B. U.A.N.L. Tesis de maestría. pp 1- 110.
- Alabi, A. O., Yudiati, E., Jones, D.A., 1997. Bacterial Levels in Penaeid Larval Cultures. Manila: Asian Fisheries Society. 181, 25-36.
- Alday. V. 1999. Diagnóstico y prevención de enfermedades del punto blanco. El mundo acuícola 5: 3-7.
- Alexandra, A., 1991. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* biotype alginolyticus in penaeid shrimps using an amplified enzyme-linked immunosorbent assay. Aquaculture, 93:101-108.
- Alfonso, E., L. Martínez, R. Gelabert y S. L. (1988): Alimentación de larvas del camarón *Penaeus schmitti*. I. Diatomeas y flagelados. Revista Investigación Marina. 9 (1):47-58.
- Alsina, M., Blanch, A.R., 1994. Improvement and update of a set of keys for biochemical identification of *Vibrio* species. Journal of Applied Bacteriology. 77, 719– 721.
- Angelo DePaola, Miles L. Motes, Amy m. Chan, y Curtis A. Suttle. 1998. Phages Infecting *Vibrio vulnificus* Are Abundant and Diverse in Oysters (*Crassostrea virginica*) Collected from the Gulf of Mexico. Applied and Environmental Microbiology. 64: 346-351.
- Austin B., 1988. Marine Microbiology Cambridge University. Press, Gran Britain. 222 pp.
- Austin B., A. C. Pride y G. A. Rhodie. 2003 Association of a bacteriophage with virulence in *Vibrio harveyi*. Journal of Fish Diseases. 26: 55-58.
- Austin B., Austin D.A. 1987. Bacterial Fish Pathogens, disease in farmed and wild fish. Ellis Horwood Limited Publishers. New York. pp 23: 34-38.
- Austin B., L.F. Stuckey L.F., P. Robertson, I. Effendi y D. Griffith, 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. Journal of Fish Diseases 18. 93-96.

- Austin B., Stuckey F., Robertson P., Effendi, I., Griffiths D., 1995, A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalli*. *Journal Fish Diseases*. 18, 93-96
- Bakker, A. W., and B. Schippers. 1987. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp.-mediated plant growth stimulation. *Soil Biological Biochemistry*. 19:451-457.
- Baross A. John, Liston John, Morita Y. Richard. 1978. Incidents of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophages and other *Vibrio* bacteriophages in marine samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 36: 492-499.
- Barrow P., Novell M., Berchieri Jr. 1998. Use of lactic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves, *Clinic Diagnostic Laboratory Immunology*. 5:294-298.
- Biswas, B., S. Adhya, P. Washart, B. Paul, A. N. Trostel, B. Powel, R. Carlton, C.R. Merrill. (2002). Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immunology* 70, 587-598
- Borsheim, K. Y. 1992. Growth and mortality of bacteria in aquatic environment. Ph.D. thesis. University of Trondheim, Trondheim, Norway.
- Brocks JA, Lea Master B, 1992 A look at the principal bacterial, fungal and parasitic diseases of farmed shrimp. In: Wyban J (Ed) *Proceedings of the special session on shrimp farming*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, p 212-226.
- Burboa-Zazueta, M.G., 1997. Efecto de la vitamina C bioencapsulada en *Artemia* sobre camarón blanco *Penaeus vannameii* Boone durante el cultivo larvario. MS tesis, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada CICESE, Ensenada, México, 66 pp.
- Campbell, A.C. and Buswell, J.A., 1983. The intestinal microflora of farmed Dover sole (*Solea solea*) at different stages of fish development. *Journal Applied Bacteriol*. 55: 215-223.
- Chaina P.M. 1965. Some recent studies of marine bacteriophages. *Journal Genetic of Microbiology*. 41
- Chythanya R., Karunasagar I., Karunasagar I., 2001 Inhibition of shrimp pathogenic *Vibrios* a marine *Pseudomonas* I-2 strain, *Aquaculture* 208: 1-10.

- Darryl E. Jory, PH.D., M.B.A. 2001 Manejo integral del alimento de camarón, de estanques de producción camaroneros, y principios de bioseguridad, Curso lance en acuicultura, Monterrey Nuevo León, México.
- Davis Bernard, Dulbecco Renato, Eisen Herman, Ginsberg Harold, Wood Barry, McCarty Maclyn. 1979. Tratado de microbiología. Slavat Editores S.A. Barcelona. 1559 pp.
- De Wolf, T., Candreva, P., Dehasque, M., Coutteau, P., 1998. Intensification of rotifer batch culture using an artificial diet. In: Grizel, H., Kestemont, P. Eds., Aquaculture and water: fish culture, shellfish culture and water usage. Abstracts of contributions presented at the International Conference Aquaculture Europe '98, October 7–10, 1998, Bordeaux, France. European Aquaculture Society, Oostende, pp. 68–69.
- Dehasque, M., De Wolf, T., Candreva, P., Coutteau, P., Sorgeloos, P., 1998. Control of bacterial input through the live food in marine fish hatcheries. In: Grizel, H., Kestemont, P. Eds., Aquaculture and water: fish culture, shellfish culture and water usage. Abstracts of contributions presented at the International Conference
- Dhont, J., and P. Lavens. 1996. Tank production and use of on grown *Artemia*, p. 164–195. In P. Lavens and P. Sorgeloos (ed.), Manual of the production and use of live food for aquaculture. Food and Agriculture Organization Fisheries Technical Paper No. 361. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.
- Dixon, B.A., VanPoucke, S.O., Chair, M., Dehasque, M., Nelis, H.J., Sorgeloos, P., DeLeenheer, A.P., 1995. Biocapsulation of the antibacterial drug sarafloxacin in naupli of brine shrimp *Artemia franciscana*. Journal Aquatic Animal Health. 7, 42–45.
- Dopazo, C., M. Lemos, C. Lodeiros, J. Bolinches, J. Barja, y A. Toranzo (1988). Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. Journal of Applied Bacteriology. 65:97-101
- Douillet, P. 1987. Effect of bacteria on the nutrition of the brine shrimp *Artemia* fed on dried diets, p. 295–308. In P. Sorgeloos, D. A. Bengston, W. Declair, and E. Jaspers (ed.), *Artemia: research and its applications*. Ecology, culturing and use in aquaculture, vol. 3. Universa Press, Wetteren, Belgium.
- Douillet, P. A., Langdon, C. J., 1993. Effect of marine bacteria on the culture of axenic oyster *Crassostrea gigas*. Biological Bulletin 184, 36-51.

- Douillet, P. A., Langdon, C. J., 1994. Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 119, 25-40.
- FAO. 2003. Manual on the production and use of live food for aquaculture.
- Fuller, R. 1989. A review. Probiotics in man and animals. *Journal Applied. Bacteriology*. 66:365–378.
- Funahashi, N., Miyazaki, T., Koder K. & Kubota S., 1974. Histopathological studies of vibriosis of ayu (*Mecoglossus alfiivelis*). *Fish pathology*, 8: 136-143.
- Garriques D., Arevalo G., 1995, An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. In: Browdy, C.L., Hopkins J.S., (Eds), *Swimming Trough troubled water. Proceedings of the special session on shrimp farming, Aquaculture 95 World Aquaculture Society, Baton Rouge*, pp 53-59.
- Garriques, D., Arevalo, G., 1995. An Evaluation of the Production and Use of a Live Bacterial Isolate to Manipulate the Microbial Flora in the Commercial Production of *Penaeus Vannamei Postlarvae* in Ecuador. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society.
- Gatesoupe F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180: 147-165.
- Gómez-Gil, B., L. Tron-Mayen, A. Roque, J. F. Turnbull, V. Inglis y A. L. Guerra-Flores. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 163:1-9.
- Goren, E., De Jong, W.A., Doornenbal, P., Koopman, J.P., Kennis, H.M., 1984. Protection of chicks against *Salmonella* infection induced by spray application of intestinal microflora in the hatchery. *Veterinary Quarterly* 6, 73–79.
- Gorospe, J., and K. Nakamura. 1996. Associated bacterial microflora in *Artemia*-rice bran culture. *Isr. Journal Aquaculture Bamidgah* 48:99–107.
- Hameed, A. S. 1993. A study of the aerobic heterotrophic bacterial flora of hatchery-reared eggs, larvae and post-larvae of *Penaeus indicus*. *Aquaculture* 17:195–204.
- Harbell, S.C., 1976. The pathology of vibriosis in coho salmon. Tesis de maestría Universidad de Washington, Seattle, USA.
- Hardie, L. J., Fletcher T.C. & Secomers, C. J., 1990. The effect of vitamin E on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 87: 1-13.

- Hines, H.B., Middleditch, B.S., Lawrence, A.L., 1980. The effect of temperature on the biochemistry of the brine shrimp *Artemia* during development. In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. Eds. ,The Brine Shrimp *Artemia*, Vol. 2, Physiology, Biochemistry, Molecular Biology. Universa Press, Wetteren, Belgium. pp. 169–183.
- Horsley, R.W., 1977. A review of the bacterial flora of teleosts and elasmobranchs, including methods for its analysis. *Journal Fish Biology*. 10: 529-553.
- Hsu C.H., Lo C.Y., Liu J.K., Lin C.S., 2000, Control of the eel *Anguilla japonica* pathogens *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* by bacteriophages, *Journal of the fisheries society of Taiwan*, 27:21-31.
- Irianto, A; Austin, B. 2000. Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases* Vol. 25, no. 11, pp. 633-642.
- J.S. Soothill. 1992. Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. *Journal Medical Microbiology*. 37:258-261
- Jiravanichpaisal P. Miyazaki T. Limsuwan C. 1994. Histopatology, biochemistry, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infected black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Journal Aquatic Animals Healt* 6:27-35.
- Jones, D. A., Yule, A. B., Holland, D. L., 1997. Larval nutrition. In: *Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture* (Ed. by L.R.D'Abramo, D.E.Conclin & D.M.Akiyama) World Aquaculture Society.
- Jones, D.A., Kamarudin, M.S., Le Vay, L., 1993. The potential for replacement of live feeds in larval culture. *Journal World Aquaculture Society*. 24, 199-210.
- Karunasagar I, Pair R, Malathi GR, Karunasagar I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 128:203-209.
- Keynan, A., K., Nealson, H. Sideropoulos, J. W. Hastings. 1974. Marine transducing bacteriophage attacking a luminous bacterium. *Journal Virology*. 14:333-340
- Lavilla-Pitogo CR, Baticados MCL, Cruz-Lacierda ER. 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Peneus* shrimp in the Philippines. *Aquaculture*. 91 4-13.
- Leger, P., Bengtson, D.A.A., Simpson, K.L., Sorgeloos, P., 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as food source. *Oceanographic Marine Biology*. 24, 521–623.

- Lewis, D.H., 1981. Immunoenzyme microscopy for differentiating among systemic bacteria¹ pathogens of fish. *Canadian Journal Fish Aquatic Society*. 38:463-466.
- Lightner DV, 1988 *Vibrio* disease of Penaid shrimp. Disease diagnosis and control in North America marine aquaculture. In: Sinderman CJ, Ligthner DV (Eds) *Developments in aquaculture and fishers science*. Elsevier, Amsterdam, p 42-47.
- Lightner, D. V. 1993. Diseases of cultured shrimp, p. 393–486. *In* P. V. McVey (ed.), *CRC handbook of mariculture*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Liu P.C. Lee K.K. Yii K.C. Kou G.H. Chen S. N. 1996. Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased Kuruma prawns *Penaeus japonicus*. *Microbiology*. 33:129-132.
- Lloyd, A.B., Comming, R.B., Kent, R.D., 1977. Prevention of *Salmonella typhimurium* infection in poultry by pretreatment of chickens and poultry with intestinal extracts. *Australian Veterinary Journal* 53, 82–87.
- López Torres M.A, Lizárraga-Partida M.L., 2001 Bacterial isolated on TCBS media associated with hatched *Artemia* cysts of commercial brands. *Aquaculture* 194, 11-20
- Mac-Fadin, J.F., 1980. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Medie. Panamericana, Argentina, 301 pp.
- Maeda, M., Liao, I.C., 1992. Effect of bacterial population on the growth of a prawn larva, *Penaeus monodon*. *International Aquaculture*. 21, 25– 29.
- Majack, T. J., K. C. Masee, G. W. Kissil, R. W. Hardy y M. E. Peterson. 2000. Bioencapsulation of erythromycin using adult brine shrimp, *Artemia franciscana* (Latreille). *Journal of Fish Diseases* 23:71-76.
- Matsuzaki S, Tanaka S, Koga T, y Kawata T., 1992 A broad-host-range Vibriophage KVP40, isolated sea water, *Microbiology Immunology*. 36, 93-97.
- Mialhe, D., Boulo, V., Hervio, D., Cousin, K., Noel, T., Ohresser, M., le Deuff, R.M., Despres B. & Gendreau, S., 1992. Development of new methodologies for diagnosis of infection diseases in mollusc and shrimp aquaculture. *Aquaculture*, 107:155-164.
- Miyazaki, T. & Kubota, S.S., 1977. Histopathological studies on vibriosis of the salmonids. *Fish Pathology*, 12: 93-98.

- Miyazaki, T., Yashuhiko, J., Kubota, S.S. & Egusa, S., 1977. Histopathological studies on vibriosis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*). Natural infection. *Fish Pathology*, 12: 163-170.
- Mohney LL, Lightner DV, Bell TA, 1994 An epizootic of vibriosis in Ecuador pond-reared *Penaeus vannamei* *Journal World Aquaculture Soc.* 25: 116-125
- Munro, P.D., Henderson, R.J., Barbour, A., Birkbeck, T.H., 1999. Partial decontamination of rotifers with ultraviolet radiation: the effect of changes in the bacterial load and flora of rotifers on mortalities in start-feeding larval turbot. *Aquaculture* 170, 229–244.
- Nakai, T., R. Sugimoto, K.H. Park, S. Matsuoka, K. Mori, T. Nishioka, K. Maruyama. 1999. Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garviae* infection in yellowtail. *Diseases Aquatic Organism* 37, 33-41
- Nakai, T., S.C. Park. 2002. Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Reserch Microbiology*. 153:13-18.
- Nakanishi, H., Iida Y., Maeshima K., Teramoto T., Hosaka Y., Ozaki M. 1966. Isolation and properties of bacteriophages of *Vibrio parahaemolyticus*. *Biken Journal* 9:149-157
- Newman S. 2000. Prevención de enfermedades del camarón de cultivo. *Panorama acuícola* 5: 22-23.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S., Bylund, G., 2001. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture* 198, 229–236.
- Nogami, K., Hamasaki, K., Maeda, M., Hirayama, K., 1997. Biocontrol method in aquaculture for rearing the swimming crab larvae *Portunus trituberculatus*. *Hydrobiology* 358, 291–295.
- Nogami, K., Maeda, M., 1992. Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49, 2373-2376.
- Nuno S, David J, Soto S R, Roque A. y Gomez-Gil B. 2000. Las bacterias en el inicio de la alimentación exógena en larvas de camarones peneidos: Efectos de la calidad del agua, tasa de ingestión y rutas de colonización del tracto digestivo. *Avances en nutrición acuícola* VI.244-276.

- Oakey H.J. y Owens L. 2000. A new bacteriophage VHML, Isolated from a toxin-producing strain of *Vibrio harveyi* in tropical Australia. *Journal of Applied Microbiology*. 89: 702-709.
- Obach, A. & Laurencin, B., 1992. Effect of dietary oxidized fish oil and deficiency of antioxidants on the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*, 107: 221-228.
- Otero J., Cols R., 2000. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 65, no. 3, pp. 969-973.
- Ozkizilcik, S., Chu, F.E., 1994. Evaluation of omega-3 fatty acid enrichment of *Artemia* nauplii as food for striped bass *Morone saxatilis* Walbaum larvae. *Journal World Aquaculture Society*. 25 1 , 147–154.
- Pantoja, C. R., Lightner, D. V., Redman, R. M., 1997. Morphological pathology of the Zoea-II syndrome of penaeid shrimp. Alston, D. E., Green, B. W., and Clifford, H. C. IV symposium on aquaculture in Central America: focusing on shrimp and tilapia. 184-186. 1997. Latin American chapter of the World Aquaculture Society and the Asociación Nacional de Acuicultores de Honduras.
- Park S.C., Shimamura I., Fukunaga M., Mori K.I. Nakai T., 2000, Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen *Pseudomonas plecoglossicida* as a candidate for disease control, *Applied Environmental Microbiology*, 66:1416-1422.
- Parker, R.B., 1974. Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition Health*. 29, 4-8.
- Paterson, W.D., Gallant, C. & Desautels, D., 1979. Detection of Bacteria1 Kidney disease in wild salmonids in the Margaree River System and adjacent waters using an indirect fluorescent antibody technique. *Journal Fish Research board Canadian*. 36: 1464-1 469.
- Pavlos Makridis, Anders Jon Fjellheim, Jorunn Skjermo, Olav Vadstein. 2000. Control of the bacterial flora of *Brachionusplicatilis* and *Artemia franciscana* by incubation in bacterial suspensions. *Aquaculture* 185: .207–218

- Pedersen, K., Verdonck, L., Austin, B., Austin, D.A., Blanch, A.R., Grimont, P.A.D., Jofre, J., Koblavi, S., Larsen, J.L., Tiainen, T., Vigneulle, M., Swings, J., 1998. Taxonomic evidence that *Vibrio carchariae* Grimes et al., 1985 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk, 1936) Baumann et al., 1981. *International Journal System Bacteriology*. 48, 749– 758.
- Peeters M. y Rodríguez J. 1999 Problemas bacterianos en la industria camaronera ecuatoriana, prácticas del manejo y alternativas. *El mundo acuícola*. 6: 45-51
- Pérez Benavente, G., Gatesoupe, F., 1988. Bacteria associated with cultured rotifers and *Artemia* are detrimental to larval turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture Engineering*. 7, 289–293
- Pérez F. y Gómez L. 2000. Programa de genética promogen-cenaim. *El mundo acuícola* 7:62.
- Pizzuto M. Hirts R.G. 1995. Clasification of isolates of *Vibrio harveyi* virulent to *Penaeus monodon* larvae by protein profile analysis and M13 DNA finger printing *Diseases Aquatic Organism* 21: 61-68.
- R. M. W. Stevenson y D. W. Airdrie. 1984. Isolation of *Yersinia ruckeri* Bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*. 47:1201-1205
- Riquelme, C., Araya, R., Escribano, R., 2000. Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. *Aquaculture* 181, 25-36.
- Riquelme, C., Araya, R., Vergara, N., Rojas, A., Guaita, M., Candia, M., 1997. Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 154, 17-26.
- Riquelme, C., Haayashida, G., Araya, R., Uchida, A., Satomi, M., Ishida, Y., 1996. Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic *Vibrios*. *Journal of Shellfish Research* 15, 369.
- Riquelme, C., Jorquera, M. A., Rojas, A. I., Avendano, R. E. Reyes, N., 2001. Addition of inhibitorproducing bacteria to mass cultures of *Argopecten purpuratus* larvae (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 192, 111-119.
- Ronda C., Vázquez M., López R. 2003. Los bacteriófagos como herramienta para combatir infecciones en acuicultura. *Aquatic*, 18: 3-10.

- Roque A. Turnbull J.F. Escalante G. Gómez-Gil B. Alday-Sanz M.V. 1999. Development of a bath challenge for the marine shrimp *Penaeus vannameii* (Boone 1931). *Aquaculture* 169: 283-290
- Roque, A., A. Mazari y B. Gómez-Gil. 2000. Infección oral experimental de postlarvas de *Litopenaeus vannamei* a través de bioencapsulación de *Vibrio parahaemolyticus* en *Artemia franciscana*. *Ciencias Marinas* 26(1):65-77.
- Rosenfeld, W. D., y Zobell C. E. 1947. Antibiotic production by marine microorganisms. *Journal Bacteriology*, 54: 393-398
- Ruangpan, L., y T. Kitao. 1991. *Vibrio* bacteria isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. *Journal Fish Diseases*. 14:383–388.
- Sahul Hameed, A.S., Balasubramanian, G., 2000. Antibiotic resistance in bacteria isolated from *Artemia* nauplii and efficacy of formaldehyde to control bacterial load. *Aquaculture* 183, 195–205
- Schroeder, G.L., 1987. Carbon pathways in aquatic detrital systems. In: D.J.W. Moriarty and R.S.V. Pullin, (Editors). *Detritus and Microbial Ecology in Aquaculture*, ICLARM Conference Proceedings 13. International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines, pp. 217-236.
- Skjermo, J., Salvesen, I., Oie, G., Olsen, Y., Vadstein, O., 1997. Microbially matured water: a technique for selection of a non-opportunistic bacterial flora in water that may improve performance of marine larvae. *Aquaculture International*. 5, 13– 28.
- Smith, H.W., M.B. Huggins, K.M. Shaw. (1987). The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages. *Journal Genetic. Microbiology*. 133, 1111-1126.
- Sogerloos, P., Dhert, P., Candevra, P., 2001. Use of brine shrimp, *Artemia* spp. in marine fish larviculture. *Aquaculture* 200, 147–159.
- Sorgeloos, P. 1972. The influence of light on the growth rate of larvae of the brine shrimp, *Artemia salina* L. *Biol. Jb. Dodonaea* 40:317-322.
- Sorgeloos, P., Leger, P., Lavens, P., 1988. Improved larval rearing of European and Asian seabass, seabream, mahi-mahi, sigonid and milk fish using enrichment diets for *Brachionus* and *Artemia*. *World Aquaculture*. 19 (4), 78–79.
- Spencer, R. 1963. Bacterial viruses in the sea, p. 350-365. In C. H. Oppenheimer (ed.), *Symposium on marine microbiology*. Charles C Thomas, Publisher, Springfield, Ill.

- Stamm, J.M., 1989. In vitro resistance by fish pathogens to aquaculture antibacterial including the quinolones difloxacin (A-56619) and sarafloxacin (A-56620). *Journal of Aquatic Animal Health*, 1:135-141.
- Sugita, H., Hirose, Y., Matsue, N., Degudri, Y., 1998. Production of antibacterial substance by *Bacillus* spp. strain NM12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture* 165, 269–280.
- Sulakvelidze, A., A.Z., J.G. Morris Jr. (2001). Bacteriophage therapy Antimicrobial. *Agents Chemother.* 208, 649-659
- Sunaryanto A. Mariom A. 1986. Occurrence of a pathogenic bacteria causing luminescence in penaeid larvae in Indonesian hatcheries. *Bull Brackishwater Aquaculture*.8:105-112.
- Touraki, M., Mourelatos, S., Kraramanlidou, G., Kalaitzopoulou, S., Kastritsis, C., 1996. Biocapsulation of chemotherapeutics in *Artemia* as a means of prevention and treatment of infectious diseases of marine fish. fry. *Aquaculture Engineer*. 15 2, 133–147
- Touraki, M., Niopas, I., Kastritsis, C., 1999. Bioaccumulation of trimethoprim, sulfamethoxazole and N-acetylsulfamethoxazole in *Artemia nauplii* and residual kinetics in seabass larvae after repeated oral dosing of medicated nauplii. *Aquaculture* 175, 15– 30.
- Vandenbergh, J., Li, Y., Verdonck, L., Li, J., Sorgeloos, P., Xu, H.S., Swings, J., 1998. Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. *Aquaculture* 169, 121– 132.
- Vandenbergh, J., Verdonck, L., Robles-Arozarena, R., Rivera, G., Bolland, A., Balladares, M., Gomez-Gil, B., Calderon, J., Sorgeloos, P., Swings, J., 1999. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock and hatchery probionts. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 2592– 2597.
- Verdonck, L., Grisez, L., Sweetman, E., Minkoff, G., Sorgeloos, P., Ollevier, F., Swings, J., 1997. Vibrios associated with routine productions of *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* 149, 203– 214.

- Verpraet, R., Chair, M., Leger, P., Nelis, H., Sogeloo, P., De Leenheer, A., 1992. Live-food mediated drug delivery as a tool for disease treatment in larviculture. The enrichment of therapeutics in rotifers and *Artemia nauplii*. *Aquaculture Engineer*. 11, 113– 139.
- Verschuere Laurent, Heang Hanglamong, Criel Godelieve, Sorgeloo Patrick y Verstraete Willy. 2000. Selected Bacterial Strains Protect *Artemia* spp. from the Pathogenic Effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 1139-1146.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Huys, G., Dhont, J., Sorgeloo, P., Verstraete, W., 1999. Microbial control of the culture of *Artemia* juveniles through preemptive colonization by selected bacterial strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 2527– 2533.
- Vivares, C.P. & Guesdon, J.L., 1992. Nucleic acid probes in aquatic bacteriology. *Aquaculture*, 107: 147-154.
- Weibe, W. J., and J. Liston. 1968. Isolation and characterization of a new bacteriophage. *Marine Biology*. 1:244-249.
- Wouters, R., L. Gómez, P. Lavens y J. Calderón. 1999. Feeding enriched *Artemia* biomass to *Penaeus vannamei* broodstock: its effect on reproductive performance and larval quality. *Journal of Shellfish Research* 18(2):651-656.
- Wu J.L., Chao W.J., 1987, The epizootic of milkfish vibriosis and its biological control by bacteriophages AS10 In Kou K.S., Wu J.L., Hsu Y.L., Chen S.N., Tung M.C., Liao I.C. and Chung H.Y. (eds), *The memoir of virology and pharmacology in fish disease*. 3. Taipei.
- Wu J.L., Lin H.M., Jan L., Hsu Y.L., Chang L.H., 1981, Biological control of fish bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila* by bacteriophage, *Fish Pathology* 15:271-276.
- Zachary A. 1974 Isolation of bacteriophage of the marine bacterium *Beneckeia natriegens* from coastal SALT marshes. *Applied Microbiology*. 27: 980-992.
- Zherdman, M.T., San Miguel, L., Serrano, J., Donoso, E., Miahle., 1997. Estudio y utilización de probióticos en el Ecuador. *Panorama Acuicola* 2,28.

APENDICE 1: Composición de los Medios de cultivo, pruebas bioquímicas y sustancias empleadas.

Medios sólidos:

a) TCBS

Se utilizó el medio TCBS Difco conforme las indicaciones del producto.

b) Medio de Agar Marino

Extracto de Levadura	1 g/l
Peptona de Carne	5g/l
Fe ₃ S0 ₄	0.002 g / l
Agar agar	15g/l
Agua de mar artificial	1 l

c) Formulación del Agua de Mar Artificial

Agua destilada y desionizada	1 l Salinidad
ajustada con sal de Instant Ocean, Aquarium Systems	27 Vw

El medio se esterilizó en autoclave a 120°C y 15 lb/pulg² durante 20 minutos

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

a) Rojo de Metilo

Medio empleado: Caldo RM-VP (Bioxon)

Preparación: Se preparó en tubos de ensaye 2.5 ml por tubo

Salinidad: Ajustada a 25 %, NaCl

Esterilización: Autoclave 121°C, 15 lbs por 15 min.

Inoculación: A partir de un cultivo de 24 horas en Medio

TSA-20 %, NaCl.

Incubación: 35°C x 48 h.

Revelado: A las 48 h se agregó solución de rojo de metilo

Composición de la solución de rojo de metilo:

Rojo de Metilo 0.1 g

Alcohol Etílico 95" 300 ml

Agua Destilada 200 ml

Resultados

+ Rojo

- Amarillo

b) Citrato

Medio empleado: Agar Citrato de Simmons (Bioxon)

Preparación: Se preparó en tubos de ensaye 4 ml por tubo de agar inclinado.

Salinidad: Ajustada a 25 %0 NaCl

Esterilización: Autoclave 121 °C, 15 lbs por 15 min.

Inoculación: A partir de un cultivo de 24 horas en Medio

TSA-20 %, NaCl.

Incubación: 35° x 24 h.

Resultados

+ Azul y crecimiento

- Verde sin crecimiento

c) Agar Hierro Triple Azúcar TSI

Medio empleado: Agar Hierro Tres Azucares (Merck)

Preparación: Se preparó en tubos de ensaye 5 ml por tubo de agar inclinado.

Esterilización: Autoclave 121 OC, 15 lbs por 15 min.

Inoculación: A partir de un cultivo puro de 24 horas en Medio TSA-20 %0 NaCl. Por picadura.

Incubación: 35°C x 18-24 h.

Resultados

1.- Sólo fermentación de glucosa WA

2.- Fermentación de Glucosa y Lactosa A/A

3.- No fermentación de Glucosa ni Lactosa WK

K Alcalino (Rojo); A Ácido (Amarillo)

d) Agar Kligler

Medio empleado: Agar Kligler (Merck)

Preparación: Se preparó en tubos de ensaye 5 ml por tubo de agar inclinado.

Salinidad: Ajustada a 25 ‰ NaCl

Esterilización: Autoclave 121°C, 15 lbs por 15 min.

Inoculación: A partir de un cultivo puro de 24 horas en Medio TSA.

Por picadura.

Incubación: 35°C x 18-24 h.

Resultados

1.- Sólo fermentación de glucosa KIA

2.- Fermentación de Glucosa y Lactosa A/A

3.- No fermentación de Glucosa ni Lactosa WK

K Alcalino (Rojo); A Ácido (Amarillo)

e) Reacción de Oxidación-Fermentación de Sacarosa

Medio empleado: Medio Basal O-F (Difco)

Preparación: Se preparó y esterilizó el medio basal en autoclave 121 °C, 15 lbs por 15 min. Se dejó enfriar a 40-45°C en baño María. Se agregaron 10 ml/l de solución acuosa de Sacarosa 10 %, esterilizada por filtración con membrana millipore 0.45

La mezcla se vació en tubos de ensaye estériles (3.5 ml por tubo).

Salinidad: Ajustada a 25 ‰ NaCl

Inoculación: A partir de un cultivo puro de 18-24 horas en Medio TSA-20, NaCl. 2%

Tubos por cepa por picadura. Uno de los tubos de cada cepa se cubrió con aceite mineral esterilizado por filtración con membrana millipore 0.45 ~1.

Incubación: 35°C x 48 h.

Resultados

Metabolismo	Tubo Tapado	Tubo Abierto
1.- Oxidativo	Verde	Amarillo
2.- Fermentativo	Amarillo	Amarillo
3.- Neutro	Verde	Verde

f) Motilidad

Medio empleado: Medio de prueba de motilidad (Difco)

Preparación: Se preparó en tubos de ensaye 3.5 ml por tubo conforme indicaciones del producto.

Salinidad: Ajustada a 25 % NaCl

Esterilización: Autoclave 121°C, 15 lbs por 15 min.

Inoculación: A partir de un cultivo de 24 horas en Medio TSA-20 %, NaCl.

Por picadura.

Incubación: a) 35°C por 24-48 h y 25 °C por 7 días.

Resultados

+ El crecimiento migra de la línea de siembra y produce turbiedad en el medio.

- (Sin motilidad) Se mantiene claro el medio, crecimiento solo en la línea de siembra

g) Reacción de Voges Proskauer

Medio empleado: Caldo RM-VP (Bioxon)

Preparación: Se preparó en tubos de ensaye 4 ml por tubo

Salinidad: Ajustada a 25 %, NaCl

Esterilización: Autoclave 121 °C, 15 lbs por 15 min.

Inoculación: A partir de un cultivo de 24 horas en Medio TSA-20 %, NaCl.

Incubación: 35°C x 24-48 h.

Revelado: Posterior al tiempo de incubación se agregó 0.6 ml de solución de O-naftol al 5% y 0.2 ml de solución KOH al 40%.

Solución de O-Naftol (Intensificador de color)

O-Naftol (1 -naftol) 5 g

Alcohol Etílico (absoluto) 100 ml

Solución de Hidróxido de Potasio (Agente Oxidante)

KOH 40 g

Agua Destilada y Desionizada 100 ml

Resultados

+ Presencia Acetoína: color rojo en la superficie

- Amarillo en la superficie

APENDICE 2: Las siguientes tablas muestran las 96 fuentes de carbonos contenidas en Biolog GN MicroPlate para la detección de *Vibrio proteolyticus*.

Numero de Cepa		1	2	3
A 1	AGUA	-	-	-
A 2	A- CICLODEXTRINA	-	-	-
A 3	DEXTRINA	+	-	+
A 4	GLICOGENO	+	+	+
A 5	TWEEN 40	+	+	+
A 6	TWEEN 80	+	+	+
A 7	N- ACETIL GALACTOSAMINA	-	+	-
A 8	N- ACETIL-D-GLUCOSAMINA	+	-	+
A 9	ADONITOL	-	+	-
A 10	L- ARABINOSA	-	-	-
A 11	D- ARABITOL	-	-	-
A 12	D- CELOBIOSA	+	-	+
B 1	I- ERITRITOL	-	-	-
B 2	D- FRUCTOSA	+	+	+
B 3	L- FUCOSA	-	-	-
B 4	D- GALACTOSA	-	-	-
B 5	GENTIOBIOSA	-	-	-
B 6	A-D- GLUCOSA	+	+	+
B 7	M- INOSITOL	+/-	-	-
B 8	A-D- LACTOSA	-	-	-
B 9	LACTULOSA	+/-	-	-
B 10	MALTOSA	+	+	+
B 11	D- MANITOL	+	+	+
B 12	D- MANOSA	+	+	-
C 1	D- MELIBIOSA	-	-	+
C 2	B- METIL-D-GLUCOSA	-	+	+
C 3	D- PSILOSINA	+	-	+/-
C 4	D- RAFINOSA	-	-	+
C 5	L- RAMNOSA	-	+	+
C 6	D- SORBITOL	+	+	-
C 7	SUCROSA	-	-	-
C 8	D- TREALOSA	+	+	+
C 9	TURANOSA	+	-	+/-
C 10	XYLITOL	-	-	-
C 11	METIL PYRUVATO	+	+	+/-
C 12	METIL SUCCINATO	+	+	-

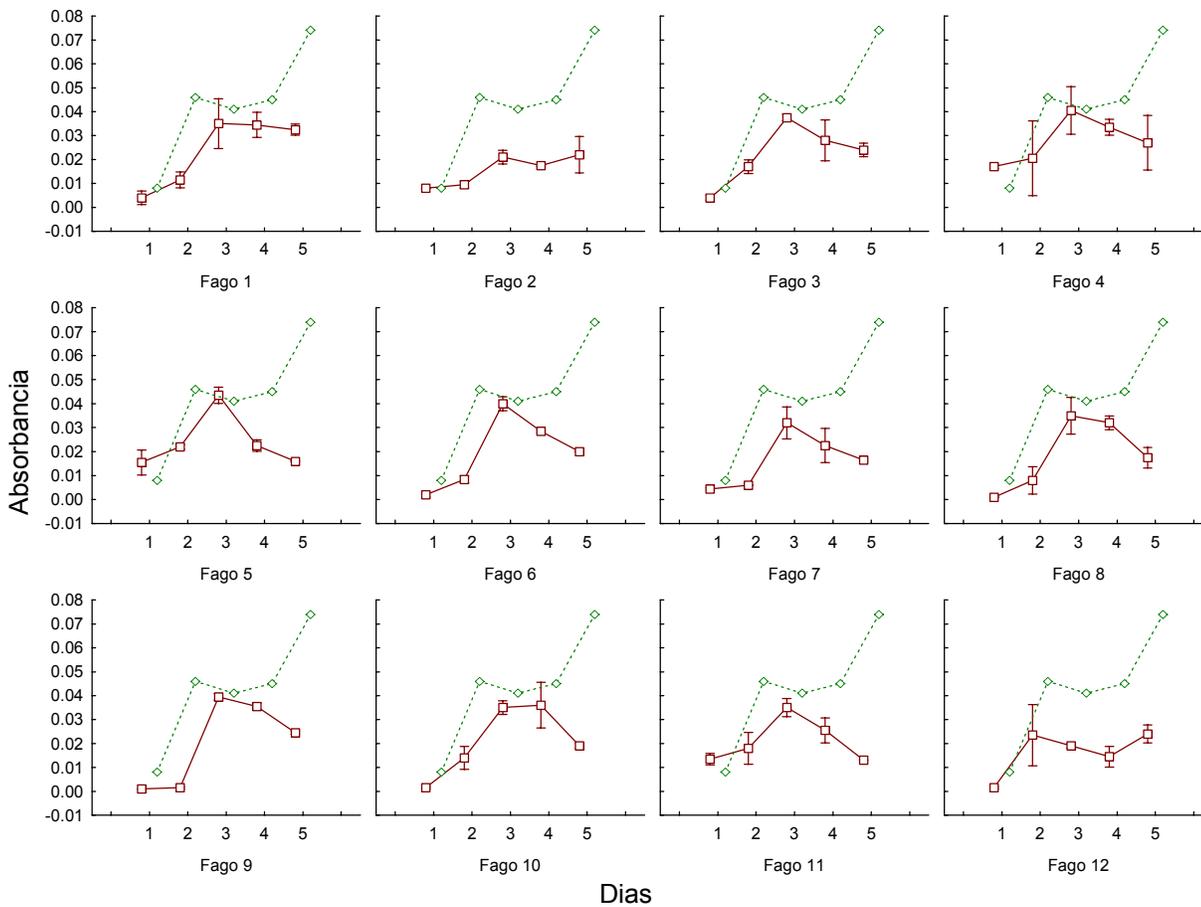
Numero de Cepa	1	2	3
D 1 ACIDO ACETICO	+	+/-	-+
D 2 CIS- ACIDO ACONITICO	+	+/-	+/-
D 3 ACIDO CITRICO	+	+/-	+
D 4 ACIDO FORMICO	+	+	+
D 5 D- GALACTOSA ACIDO LACTOSA	-	-	-
D 6 D- ACIDO GALACTURONICO	+/-	-	-
D 7 D- ACIDO GLUCONICO		+	+
D 8 D- ACIDO GLUCOSAMINICO	+	-	+/-
D 9 D- ACIDO GLUCORONICO	+/-	-	-
D 10 A- ACIDO HIDROXIBUTRICO	+	+/-	+/-
D 11 B- ACIDO HIDROXIBUTRICO	-	-	-
D 12 G- ACIDO HIDROXIBUTRICO	+/-	-	-
E 1 P- ACIDO HIDROXIPENIL ACETICO	-	-	-
E 2 ACIDO ITACONICO	-	-	-
E 3 A- ACIDO KETO-BUTIRICO	+	+/-	+/-
E 4 A- ACIDO KETO-GLUTARICO	+	+	+
E 5 A- ACIDO KETO-VALERICO	-	-	-
E 6 D,L- ACIDO LACTICO	+	+	+
E 7 ACIDO MALONICO	+/-	-	-
E 8 ACIDO PROPIÓNICO	+	+	+
E 9 ACIDO QUINICO	-	-	-
E 10 D- ÁCIDO SACÁRICO	+/-	-	-
E 11 ÁCIDO SEBÁCICO	-	-	-
E 12 ÁCIDO SUCCÍNICO	+	+	+
F 1 ÁCIDO BROMO SUCCÍNICO	+	+	+
F 2 ÁCIDO SUCCINÁMICO	+/-	-	-
F 3 GLUCURONAMIDA	-	-	-
F 4 ALANINAMIDA	+	+	+
F 5 D- ALANINA	+	+	+
F 6 L- ALANINA	+	+	+
F 7 L- ALANIL-GLICINA	+	+	+
F 8 L- ASPARAGINA	+	+	+
F 9 L- ÁCIDO ASPÁRTICOD	+	+	+
F 10 L- ÁCIDO GLUTÁMICO	+	+	+
F 11 ÁCIDO GLICIL-L-ASPÁRTICO	+	-	+/-
F 12 ÁCIDO GLICIL-L-GLUTÁMICO	+	+	+

Número de Cepa	1	2	3
G 1 L- HISTIDINA	+	+	+
G 2 HIDROXI-L-PROLINA	+	+	+/-
G 3 L- LEUCINA	+/-	-	-
G 4 L- ORNITHINA	+	-	+/-
G 5 L- FENILALANINA	+	-	-
G 6 L- PROLINA	+	+	+
G 7 L- ÁCIDO PIROGLUTÁMICO	-	-	-
G 8 D- SERINA	+/-	-	-
G 9 L- SERINA	+		+
G 10 L- TREONINA	+	+	+
G 11 CARNITINA	-	+	-
G 12 G- ÁCIDO AMINO BUTÍRICO	-	-	-
H 1 ÁCIDO UROCÁNICO	+/-	-	-
H 2 INOSINA	+	+	+
H 3 URIDINA	+	+	+
H 4 TIMIDINA	+	+	+
H 5 FENILETILAMINA	-	-	-
H 6 PUTRESCINA	+	+	+
H 7 2- AMINO ETANOL	+	-	-
H 8 2,3- BUTANODIOL	+	-	-
H 9 GLICEROL	+	+	+
H 10 D,L-A- GLICEROL FOSFATO	+	+	+
H 11 GLUCOSA-1-FOSFATO	+	+	+
H 12 GLUCOSA-6-FOSFATO	+	+	+

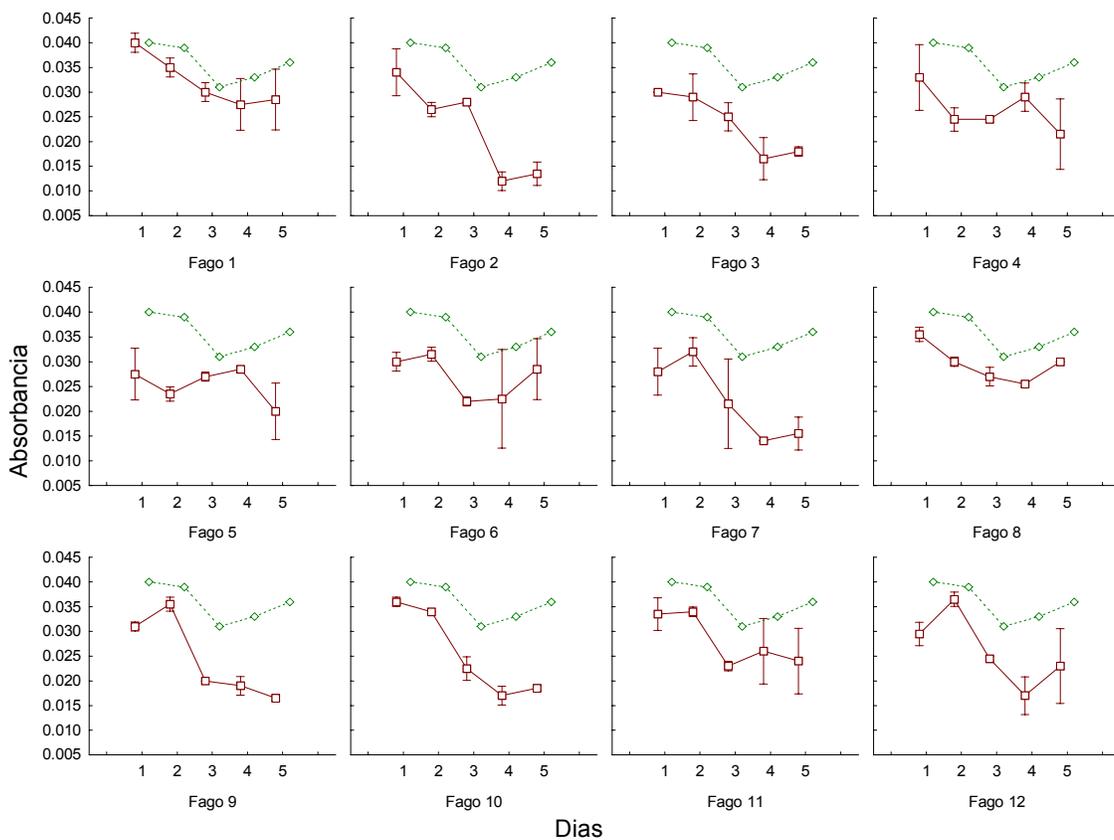
Apéndice 3: Intervalos de tolerancia

1. Salinidades no favorables para la actividad litica.

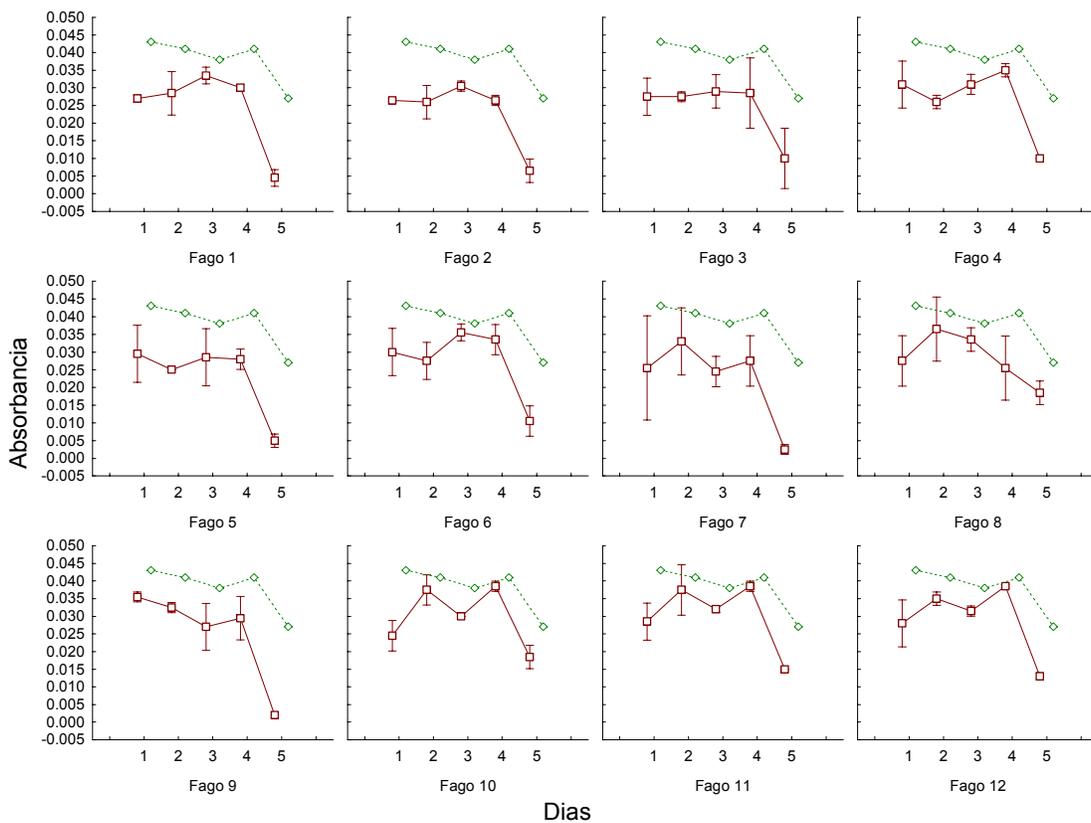
a) Salinidad 35 ‰.



b) Salinidad 15 ‰

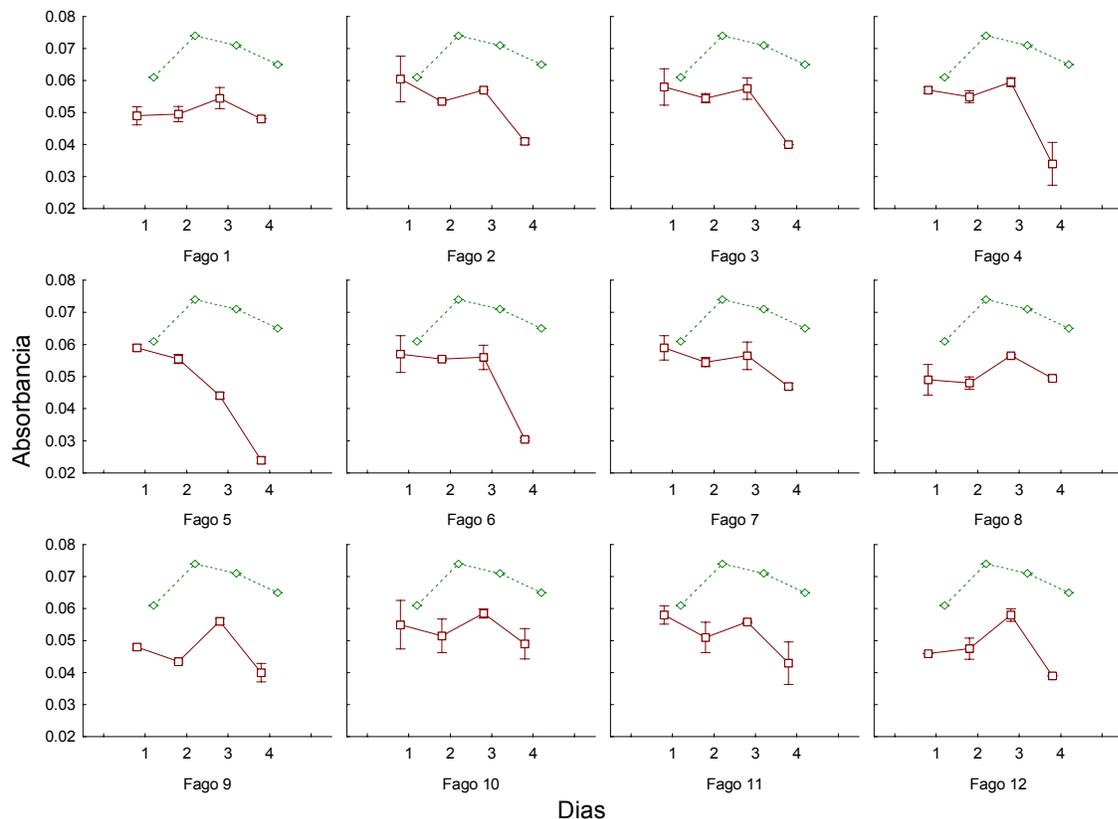


c) Salinidad 5 ‰

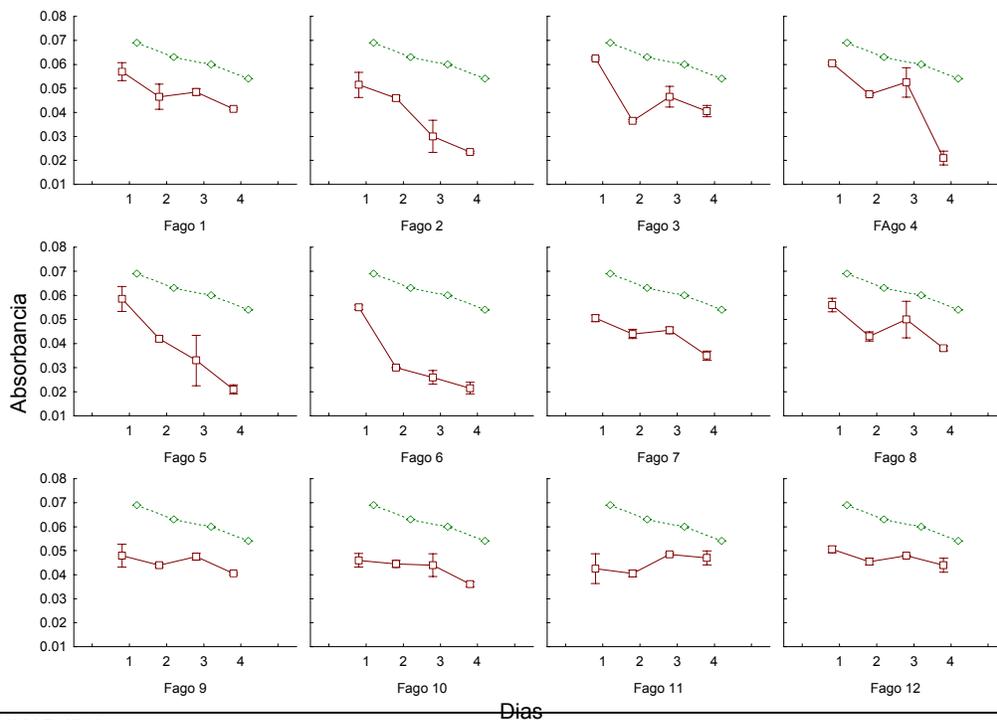


2. Temperaturas no favorables para la actividad litica.

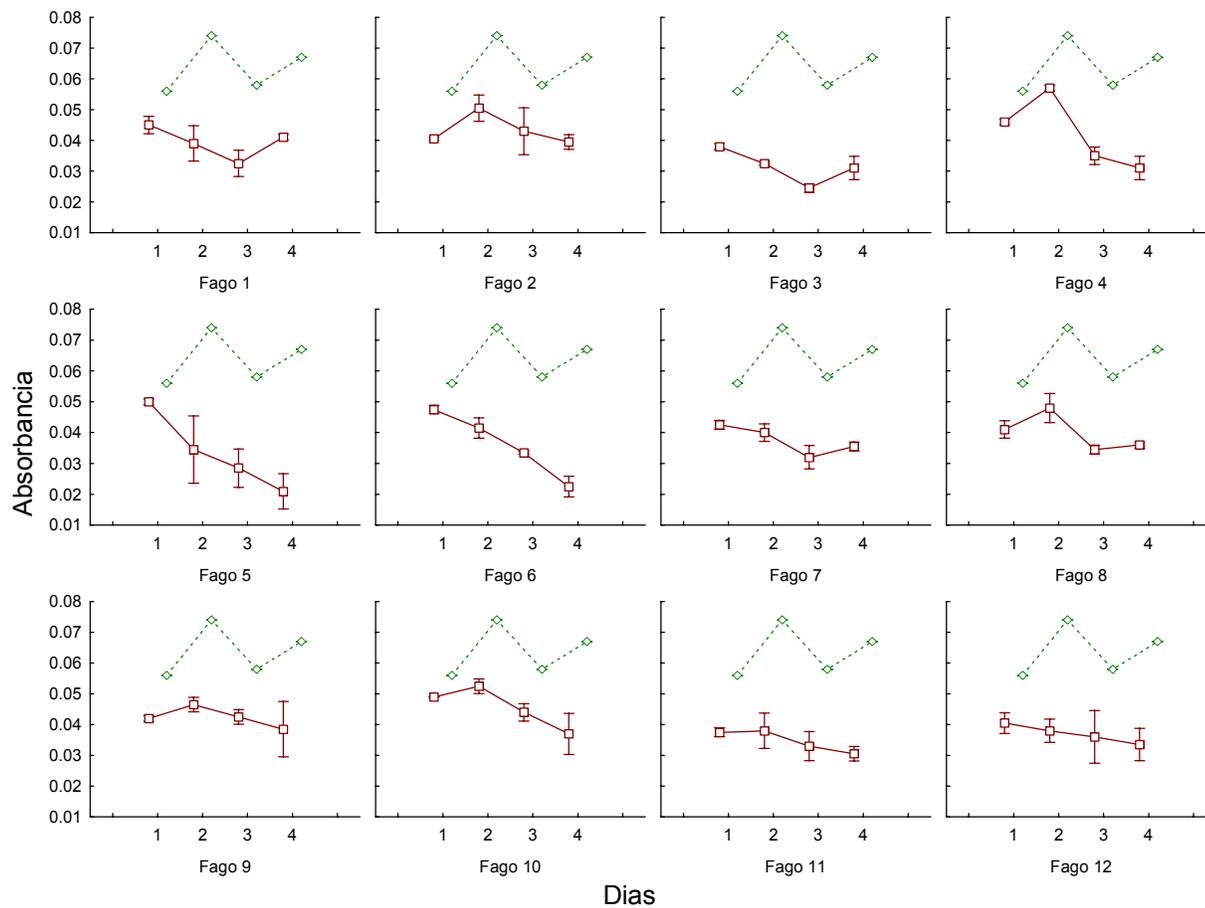
a) Temperatura ambiente.



b) Temperatura de 28°C.



c) Temperatura de 35 %.



Apéndice 4: Trabajos expuestos en congresos derivados de la tesis

- XI Congreso Latinoamericano de Acuicultura (ALA) México 2004 con la ponencia oral del trabajo “Control biológico de *Vibrio* durante la eclosión de *Artemia*” y los carteles “Aislamiento de fagos para el control biológico de *Vibrio* spp”.
- 5ª Semana del Posgrado en Baja California Sur con la ponencia “Evaluación de bacterias y fagos para el control biológico de *Vibrio* spp. durante la eclosión de *Artemia*”.