



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**VIBRIOFAGOS EN EL CULTIVO LARVARIO DEL
CAMARÓN Y SU RELACIÓN CON LA
INCIDENCIA Y VIRULENCIA DE VIBRIO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN
MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

PRESENTA

ROMAN MAKAROV

LA PAZ, B.C.S., JUNIO 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 30 del mes de Mayo del 2011 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 titulada:

"VIBRIOFAGOS EN EL CULTIVO LARVARIO
DEL CAMARÓN Y SU RELACIÓN CON LA INCIDENCIA Y VIRULENCIA DE VIBRIO"

Presentada por el alumno:

MAKAROV
Apellido paterno

materno

ROMAN
nombre(s)

Con registro:

A	0	9	0	1	3	4
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

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

LA COMISIÓN REVISORA

Director(a) de Tesis

DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ

DR. AIDA MARTÍNEZ LÓPEZ

DR. RENATO PEÑA MARTÍNEZ

DR. JESÚS VÁN MÚRILLO ÁLVAREZ

DR. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE



IPN
CICIMAR
DIRECCION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 07 del mes Junio del año 2011
el (la) que suscribe BM. ROMAN MAKAROV alumno(a) del
Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS
con número de registro A090134 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:
DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ

y cede los derechos del trabajo titulado:

"VIBRIOFAGOS EN EL CULTIVO LARVARIO DEL CAMARÓN Y SU RELACIÓN
CON LA INCIDENCIA Y VIRULENCIA DE VIBRIO"

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. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: rimvc@live.com.mx - sdiaz@ipn.mx

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


BM. ROMAN MAKAROV

nombre y firma

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al director de esta tesis, Dr. Sergio F. Martínez Díaz ya que sin su apoyo la realización de la misma no hubiera sido posible. Tanto por confianza como por apoyar con todo el equipo y material necesario.

A Bárbara González Acosta por ayudarme con la tediosa parte de PCR que fue de mucha importancia y por permitirme acabar casi todos sus reactivos (incluyendo los 2 “litros” de Taq). También por sus consejos, amistad y críticas constructivas.

A Alicia Márquez por ayudarme de una manera muy eficiente con la extensiva parte de muestreos y experimentos relacionados. Lástima que se terminó el período de servicio social antes de empezar con la otra serie de experimentos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a PIFI por las becas otorgadas.

Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas CICIMAR-IPN por proporcionar las instalaciones y el equipo para la realización de la parte experimental de la tesis.

Al Instituto Politécnico Nacional por el apoyo otorgado al proyecto SIP por la beca PIFI y el apoyo COFFAA.

Al personal de la granja de producción larvaria Acuacultura Mahr por haber proporcionado muestras y larvas que fue esencial para la obtención de resultados.

A Juliana Jerónimo Balcázar (Yuyus) por ayudarme con la parte de redacción y bibliografías (lo más enfadoso) y por ser una buena amiga aunque a veces un poco enfadosa y medio insoportable, lo que es parte de su gracia. A mis compañeros de maestría: Alejandra Aguillón (que envió al inframundo mi traje de neopreno...en pedazos), a Daniel Quijano por ser un buen amigo, por ayudar a conseguirme un semestre de PIFI y por apoyar y defender a COD y WEIZEN. A Citlalli Sánchez Robles, por ser buena amiga y por estar en los momentos cuando se requiere de una situación cómica para subir los ánimos, y por soportarme.

A mis compañeros de laboratorio: Carlos, Lalo, Diana y Lina por ayudarme en numerosas ocasiones (con material de laboratorio, experimentos, consejos) y apoyar los intereses del “sindicato” para la “obtención” de la beca alimenticia de laboratorio (“Beca Gercio”), sin la cual hubiera sido complicado sobrevivir algunos experimentos extensivos. En especial a Eduardo Quiroz (Lalo) y su familia por ayudarme con los trámites de mi cédula profesional.

A Infinity Ward por haber creado el software MW2 que fue de gran ayuda para bajar el estrés acumulado (gracias a los respectivos “noobs”) lo que ayudo a refrescar las ideas y realizar de una manera más eficiente algunas partes de la tesis.

ÍNDICE GENERAL

RELACIÓN DE TABLAS.....	VII
RELACIÓN DE FIGURAS.....	IX
GLOSARIO.....	XI
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Características generales de los bacteriófagos.....	1
I.2. Biología básica.....	1
I.2.1. Estructura y composición.....	1
I.2.2. Clasificación de los bacteriófagos.....	2
I.3. Replicación.....	4
I.3.1. Ciclo lítico y ciclo lisogénico.....	5
I.4. Vibrios y su importancia en acuicultura.....	6
I.5. Relación de los bacteriófagos con la virulencia de Vibrio.....	7
I.6. Importancia de las interacciones entre las poblaciones de vibrios y fagos.....	8
II. ANTECEDENTES.....	9
II.1. Vibriofagos marinos y su importancia ecológica.....	9
II.2. Problemas que causa Vibrio en acuicultura y camaronicultura.....	11
II.3. Fagoterapia en acuicultura.....	12
II.4. Evidencias de la relación de vibriofagos lisogénicos con la virulencia de Vibrio.....	12
III. JUSTIFICACIÓN.....	13
IV. OBJETIVOS.....	14
IV.1. Objetivo general.....	14
IV.2. Objetivos específicos.....	14
V. HIPÓTESIS.....	14
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15

VI.1.	Evaluación de la incidencia de vibrios y sus fagos durante la producción intensiva de larvas de camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i>	15
VI.1.1.	Aislamiento de vibrios y fagos.....	15
VI.1.1.1.	Muestreos.....	15
VI.1.2.	Aislamiento e identificación de vibrios.....	15
VI.1.2.1.	Aislamiento.....	15
VI.1.2.2.	Identificación molecular.....	16
VI.1.3.	Aislamiento de fagos.....	17
VI.1.3.1.	Obtención de lisados crudos.....	17
VI.1.4.	Aislamiento de fagos líticos y lisogénicos.....	17
VI.2.	Incidencia de vibrios y sus fagos.....	18
VI.2.1.	Incidencia de vibrios.....	18
VI.2.2.	Incidencia y purificación de fagos.....	18
VI.3.	Caracterización de fagos.....	19
VI.3.1.	Determinación del rango de especificidad.....	19
VI.3.2.	Selección de fagos líticos y lisogénicos.....	20
VI.3.3.	Evaluación de la estabilidad del ciclo de replicación.....	21
VI.4.	Evaluación de la capacidad de fagos lisogénicos para inducir virulencia en vibrios en experimentos controlados.....	21
VII.	RESULTADOS.....	22
VII.1.	Incidencia de vibrios y presencia de fagos en el cultivo larvario del camarón blanco <i>L. vannamei</i>	22
VII.1.1.	Cepas identificadas y ocurrencia de vibrios en las larvas del camarón.....	22
VII.1.1.1.	Cepas identificadas mediante el método de multipuebas BIOLOG.....	22
VII.1.1.2.	Cepas identificadas mediante la secuenciación parcial del gen 16s.....	23
VII.1.1.3.	Ocurrencia de vibrios en las larvas del camarón.....	26
VII.1.2.	Bacteriófagos aislados.....	26

VII.1.3.Incidencia de vibrios y presencia de fagos.....	27
VII.1.3.1.Ciclo 1.....	28
VII.1.3.2.Ciclo 2.....	33
VII.2. Caracterización de los fagos.....	42
VII.2.1.Especificidad de los fagos y susceptibilidad de las cepas a infección por fagos.....	42
VII.2.1.1.Ciclo 1.....	43
VII.2.1.2.Ciclo 2.....	43
VII.2.2.Rango de hospederos de los fagos aislados y tipos de fagos.....	45
VII.2.2.1.Ciclo 1.....	45
VII.2.2.2.Ciclo 2.....	46
VII.2.2.3.Resumen de especificidad de los fagos.....	47
VII.3. Evaluación de la capacidad de los fagos lisogénicos para inducir virulencia en vibrios en experimentos controlados.....	47
VIII. DISCUSIÓN.....	52
VIII.1.Incidencia de vibrios y presencia de fagos en el cultivo larvario del camarón.....	52
VIII.2.Caracterización de los bacteriófagos.....	71
VIII.3.Evaluación de la capacidad de los fagos lisogénicos para inducir virulencia en vibrios en experimentos controlados.....	74
IX. CONCLUSIONES.....	77
X. RECOMENDACIONES.....	78
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	79
XII. APÉNDICES.....	91
XIII. ANEXOS.....	140

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla I.	Ocurrencia de diferentes especies de vibrios en los estadios de desarrollo larvario.....	26
Tabla II.	Bacteriófagos aislados en el primer y segundo ciclo de producción.....	27
Tabla III.	Resumen de la lista de especies de bacterias encontradas en cada ciclo de producción y cantidad de fagos a los que son susceptibles.....	44
Tabla IV.	Rango de hospederos de los fagos aislados en el primer ciclo de producción.....	45
Tabla V.	Rango de hospederos de los fagos aislados en el segundo ciclo de producción.....	46
Tabla VI.	Resumen de especificidad de los fagos encontrados en ambos ciclos.....	47
Tabla VII.	Fagos y cepas de bacterias seleccionados para las pruebas de reto en larvas de camarón.....	48
Tabla VIII.	Datos generales sobre el primer ciclo de producción larvaria.....	93
Tabla IX.	Datos generales sobre el segundo ciclo de producción larvaria.....	94
Tabla X.	Cepas aisladas durante el primer ciclo de producción larvaria.....	95

Tabla XI. Cepas aisladas durante el segundo ciclo de producción larvaria.....	96
Tabla XII. Lista de bacterias susceptibles a infección por distintos fagos.....	98
Tabla XIII. Lista de bacterias susceptibles a infección por distintos fagos en el segundo ciclo de producción.....	99

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura de un bacteriófago.....	2
Figura 2.	Clasificación de los bacteriófagos con base en su genoma y ultra-estructura	3
Figura 3.	Replicación de los bacteriófagos.....	4
Figura 4.	Dendograma de similitudes entre las cepas identificadas usando BIOLOG.....	23
Figura 5.	Árbol filogenético de cepas secuenciadas.....	25
Figura 6.	Incidencia de vibrios y presencia de vibriofagos con distinto ciclo de replicación en larvas de camarón en el tanque 7.....	28
Figura 7.	Incidencia de vibrios y presencia de vibriofagos con distinto ciclo de replicación en larvas de camarón en el tanque 9.....	29
Figura 8.	Incidencia de vibrios y presencia de vibriofagos con distinto ciclo de replicación en larvas de camarón en el tanque 12.....	30
Figura 9.	Incidencia de vibrios en las larvas de camarón en los tres tanques del primer ciclo.....	31
Figura 10.	Incidencia de vibrios y fagos en las larvas de camarón durante el primer ciclo.....	32
Figura 11.	Comparativa de incidencia de vibrios en larvas y en agua en el tanque 1.....	33
Figura 12.	Incidencia de vibrios y presencia de vibriofagos con distinto ciclo de replicación en larvas de camarón en el tanque 1.....	34

Figura 13.	Comparativa de incidencia de vibrios en larvas y en agua en el tanque 2.....	35
Figura 14.	Incidencia de vibrios y presencia de vibriofagos con distinto ciclo de replicación en larvas de camarón en el tanque 2.....	36
Figura 15.	Comparativa de incidencia de vibrios en larvas y en agua en el tanque 6.....	37
Figura 16.	Incidencia de vibrios y presencia de vibriofagos con distinto ciclo de replicación en larvas de camarón en el tanque 6.....	38
Figura 17.	Incidencia de vibrios en el agua de los tres tanques del segundo ciclo.....	39
Figura 18.	Incidencia de vibrios en larvas de los tres tanques del segundo ciclo.....	40
Figura 19.	Incidencia general de vibrios en larvas y en agua en el segundo ciclo.....	41
Figura 20.	Incidencia de vibrios y fagos en las larvas de camarón durante el segundo ciclo.....	42
Figura 21.	Resultados de los experimentos de inducción de virulencia en vibrios.....	50
Figura 22.	Daños observados en las larvas de camarón que pueden ser considerados como signos de vibriosis.....	51

GLOSARIO

Antibiótico: sustancia química producida por un ser vivo o derivado sintético, capaz de inhibir en pequeñas cantidades los procesos de ciertos microorganismos sensibles, destruyendo e impidiendo su desarrollo y reproducción.

Bacteriófago: virus que infecta y se replica en las células bacterianas. Puede contener ADN o ARN de doble o simple cadena.

Ciclo lítico: ciclo de replicación de un bacteriófago en el cual la maquinaria metabólica de la célula es aprovechada para el ensamble de nuevas partículas víricas liberándose éstas por lisis (o muerte) de la célula hospedera.

Ciclo lisogénico: ciclo de replicación de un bacteriófago en el cual el material genético del virus se integra al cromosoma bacteriano y se replica junto con la célula sin destruirla. Sin embargo, bajo condiciones desfavorables para la célula hospedera se puede activar la ruta lítica.

Conversión lisogénica: expresión por la bacteria de genes transferidos por un fago lisogénico.

Cepa bacteriana: colonia o conjunto de bacterias que tienen mismo patrimonio genético.

Hospedero (célula): célula bacteriana que puede ser infectada efectivamente y utilizada por un bacteriófago.

Lisógeno: se le denomina a la unidad de fago lisogénico y bacteria (lisogenizada), cuando el bacteriófago se encuentra en estado de profago.

Patógeno: es aquel elemento o medio capaz de producir algún tipo de enfermedad o daño al organismo, cuyas condiciones estén predispuestas a las ocasiones mencionadas.

Probiótico: microorganismos vivos que cuando son suministrados en cantidades adecuadas promueven beneficios en la salud del organismo huésped.

Profago: estado intracelular de un bacteriófago. Cuando éste se encuentra integrado en el genoma del hospedero.

Pseudolisógeno: cepa bacteriana o bacteria lisogénica que después de cierto número de generaciones pierde el profago pero retiene algunas de las características adquiridas.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): técnica molecular empleada para amplificar un fragmento de ADN. Sus aplicaciones principalmente se enfocan a la identificación y descripción de fragmentos del genoma el organismo de interés.

Vibriofago: bacteriófago que infecta bacterias del genero *Vibrio*.

Vibriosis: serie de infecciones de carácter bacteriano ocasionadas por bacterias del género *Vibrio*. Común en acuicultura de peces y crustáceos.

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la incidencia de vibrios y fagos en el cultivo larvario de camarón durante dos ciclos de producción. Las mayores incidencias se registraron al inicio del 1er ciclo y a finales del 2do. Se aislaron un total de 45 bacterias en el primer ciclo y 36 en el segundo, de las cuales se identificaron mediante herramientas moleculares 8 especies de vibrios: *V. alginolyticus*, *V. azureus*, *V. brasiliensis*, *V. harveyi*, *V. natriegens*, *V. parahaemolyticus*, *V. proteolyticus* y *V. tubayashi* y 14 cepas de *Vibrio* sp. De éstas, la especie más recurrente fue *V. alginolyticus* que se observó en la mayoría de los estadios de desarrollo de las larvas seguido de *V. harveyi* que se observó en algunos estadios.

Se aislaron 38 fagos en el primer ciclo y 31 fagos en el segundo. La mayoría de los fagos del primer ciclo fueron líticos y capaces de infectar más de dos hospederos (hasta un máximo de 5) mientras que en el 2do ciclo fueron más abundantes los fagos lisogénicos, siendo la mayoría específicos de su cepa blanco. Se registró la mayor cantidad de fagos para las cepas de *V. alginolyticus* y *V. harveyi*. Se encontró que, generalmente, la presencia de fagos líticos corresponde a una disminución en cantidad de vibrios y que parece tener relación con la cantidad de fagos observados (a mayor número de fagos la disminución es más pronunciada). En el caso de fagos lisogénicos no se observa una relación consistente con la fluctuación numérica de los vibrios, sin embargo, el aumento en la incidencia durante los últimos días de muestreos en el 2do ciclo coincide con el aumento en el número de fagos lisogénicos.

Para evaluar la capacidad de los fagos con ciclo lisogénico de inducir virulencia en vibrios, se realizaron 4 experimentos con un total de 19 vibriofagos y sus cepas que incluyen a *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. harveyi*. Se utilizó el modelo de infección de larvas de camarón blanco *L. vannamei*. Se registraron dos casos particulares (fago 34 con *V. harveyi* y fago 41 con otra cepa de *V. harveyi*) donde se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) en la mortalidad inducida por la bacteria en estado de lisogeno respecto al control y tratamientos con *V. harveyi* sin fago. Por lo que se presume que el aumento en la virulencia de *V. harveyi* se debe a la presencia del fago lisogénico. Debido a esto, se puede considerar que la virulencia de otros vibrios que son patógenos en los cultivos de camarón puede estar relacionada a la presencia de fagos lisogénicos.

Palabras clave: bacteriófagos, ciclo lítico, ciclo lisogénico, patogénesis, vibrios.

ABSTRACT

In this study, the incidence of vibrios and their phages in cultured shrimp larvae was evaluated during two cycles of larvae production. Higher incidence values were recorded at the beginning of the first cycle and at the end of second cycle. A total of 45 bacteria were isolated in the 1st cycle and 36 in the 2nd cycle. Using molecular techniques, 8 species of vibrios were identified: *V. alginolyticus*, *V. azureus*, *V. brasiliensis*, *V. harveyi*, *V. natriegens*, *V. parahaemolyticus*, *V. proteolyticus* and *V. tubayashi*. Also 14 strains were identified as *Vibrio* sp. *V. alginolyticus* was the most common and observed in almost every stage of larvae development followed by *V. harveyi*, which was observed in few stages.

38 phages were isolated in the 1st cycle of production and 31 in the 2nd cycle. The majority of the phages of the first cycle were found to be of lytic type and infecting more than 2 hosts (or as much as 5 in few cases). In the second cycle, lysogenic phages were more abundant and found to be specific and restricted to their host bacterium. A major number of phages were found infecting *V. alginolyticus* and *V. harveyi*. The presence of lytic phages matches a point of low vibrio incidence values. In the case of lysogenic phages, no consistent relation with fluctuations in vibrio numbers was observed, however, the raise in the incidence during the last days of the 2nd cycle matches the augmentation in number of lysogenic phages.

In order to evaluate the ability of lysogenic phages to induce virulence in vibrios, 4 experiments were performed with a total of 19 vibriophages and their target strains, including *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* and *V. harveyi*. An experimental model of infection of white shrimp larvae *L. vannamei* was used. Two particular cases were registered (phage 34 with *V. harveyi* and phage 41 with other *V. harveyi* strain) to produce a significant ($p < 0.05$) decrease in survival rates compared to the control group and treatments with phage-free *V. harveyi*. Thus, the increase in the virulence of *V. harveyi*, is apparently phage mediated. It also suggests that virulence of other *Vibrio* pathogens of shrimp may be influenced by the presence of lysogenic bacteriophages.

Keywords: bacteriophages, lytic cycle, lysogenic cycle, pathogen, vibrios.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Características generales de los bacteriófagos

Los microorganismos son la mayor fuerza detrás de los ciclos de energía y nutrientes en los océanos, constituyendo aproximadamente el 90% de la biomasa viva. Se estima que los virus, como los bacteriófagos, se encargan de destruir aproximadamente el 20% de esta biomasa diariamente. Los virus bacterianos o bacteriófagos son las partículas más abundantes en el medio marino, y se estima que existen hasta 10^7 fagos por mililitro de agua (Suttle, 2007). Esta observación, acompañada de la evidencia de que los virus son los agentes sustanciales de la mortalidad del plancton heterótrofo y autótrofo, no explica completamente su importancia debido a la enorme subestimación de los efectos que tienen las infecciones virales que se producen en el océano, pero sugiere que los bacteriófagos juegan el papel más importante en la mortalidad de microorganismos marinos, y, consecuentemente afectan los ciclos de nutrientes, la estructura y composición de las comunidades microbianas (Ronda *et al.*, 2003; Suttle, 2007).

I.2 Biología básica

I.2.1 Estructura y composición

Los bacteriófagos, o fagos, son virus que contienen ADN o ARN y se replican en las células bacterianas. Poseen un estado intracelular y uno extracelular. En el estado extracelular se denominan viriones y pueden ser considerablemente complejos, mientras que en el estado intracelular su material genético forma parte del genoma del hospedero y se denominan profagos. Los viriones son partículas submicroscópicas que contienen material genético de cadena simple o doble (que varía en tamaño desde 40,000 hasta 480,000 pares de bases) rodeado de una estructura proteica llamada cápside. La cápside está formada por cierto número de moléculas individuales o subunidades estructurales denominadas capsómeros, los cuales se organizan de un modo preciso y repetitivo alrededor del ácido nucleico reconociéndose dos tipos de simetría: helicoidal (semejante a forma de resorte, característica del virus mosaico del tabaco) e icosaédrica, característica de los bacteriófagos (Madigan *et al.*, 1999).

Algunos bacteriófagos son estructuralmente más complejos, poseen cabezas icosaédricas y colas helicoidales relacionadas con la forma en la que infectan a sus bacterias hospederas. Se componen de seis partes estructurales (Figura 1): cabeza, collar (que une la cabeza con la cola), cola (consta de un tubo hueco rodeado de una vaina helicoidal contráctil), placa basal (al final de la cola, con forma hexagonal), fibras de la cola (fibras largas que salen de la placa) y ganchos (fibras cortas que salen de la placa) (Madigan *et al.*, 1999; Guttman *et al.*, 2005).

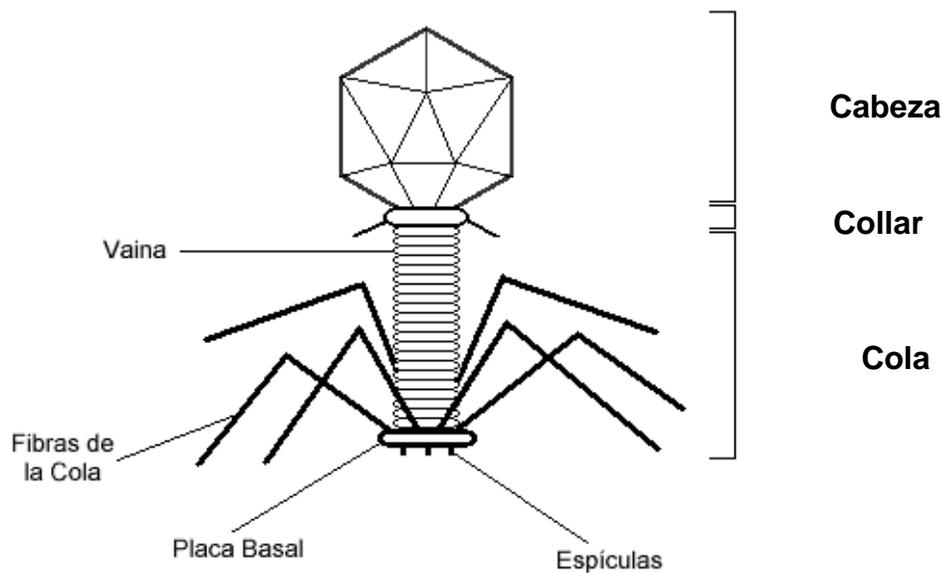


Figura 1. Estructura de un bacteriófago. Tomado de <http://www.microbiologia.com.ar/virologia/procariontes.php>

I.2.2 Clasificación de los bacteriófagos

La mayoría de los fagos son virus desnudos, aunque algunos poseen una envoltura membranosa en forma de una bicapa lipídica con proteínas insertadas en ella. En estos bacteriófagos la envoltura sirve, entre otras cosas, para la especificidad de la infección vírica y controla algunos aspectos de la penetración del virus. En estos fagos la envoltura no se toma en cuenta para la simetría sino el virión que se encuentra dentro. La clasificación de los fagos se basa principalmente en el

tipo de material genético considerando si éste es monocatenario o bicatenario, en segundo lugar, la presencia de la envoltura, y por último la complejidad morfológica. Con base en estas tres características se clasifican en 13 familias (Figura 2) de las cuales solamente tres presentan envoltura (Plasmaviridae, Lipothrivirus y Cystoviridae) y las restantes se separan según su morfología (además de la naturaleza del material genético) y pueden ser de arquitectura de cabeza-cola, (incluye tres grandes familias: Myoviridae, con colas contráctiles y complejas que poseen collares, placas basales y fibras; Siphoviridae, de cola larga no contráctil; y Podoviridae, de cola corta); sin cola (Corticoviridae, Tectiviridae, Fuselloviridae, Leviviridae y Microviridae) y de aspecto de bastón (Rudiviridae y Inoviridae) (Madigan *et al.*, 1999; Guttman *et al.*, 2005).

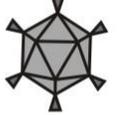
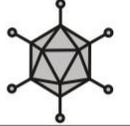
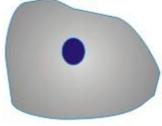
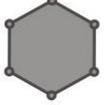
Familias de bacteriófagos			
ADN bicatenario. Sin envoltura		ADN bicatenario Con envoltura	
   	   	 	
ADN monocatenario		ARN	
		Monocatenario	Bicatenario
 			

Figura 2. Clasificación de los bacteriófagos con base a su genoma y ultra-estructura. (Redibujado y modificado de Ackermann, 2006)

I.3 Replicación

Cuando los fagos entran en contacto con bacterias susceptibles, se fijan en su superficie e introducen el material genético, una vez en el interior de la célula se inicia la fase intracelular, durante la cual tiene lugar la replicación viral. En términos generales, la replicación consiste en que el genoma del virus coordina la síntesis de todos los componentes necesarios para las nuevas partículas víricas, estos componentes luego son ensamblados y los nuevos viriones salen rompiendo la célula para establecer infecciones paralelas. En el caso de los bacteriófagos las diferentes fases de este proceso se resumen en siete etapas: 1) Fijación o absorción, 2) Penetración, 3) Fases tempranas de la replicación, 4) Replicación, 5) Síntesis de proteínas para subunidades estructurales, 6) Ensamblaje y 7) Liberación (Figura 3; Madigan *et al.*, 1999).

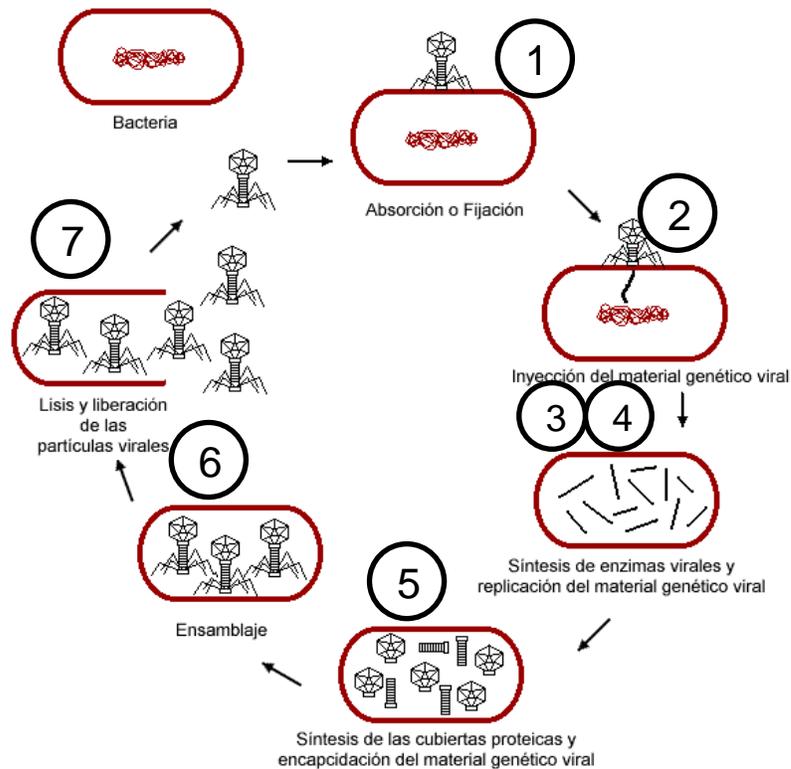


Figura 3. Replicación de bacteriófagos. Modificado de <http://www.microbiologia.com.ar/virologia/procariontes.php>

I.3.1. Ciclo lítico y ciclo lisogénico

Los bacteriófagos presentan una peculiaridad relacionada con su ciclo de replicación lo cual los divide en dos grupos: fagos con ciclo lítico y lisogénico (Madigan *et al.*, 1999; Guttman *et al.*, 2005). El ciclo lítico lo tienen la mayoría de los fagos y consiste en la multiplicación del virus en el interior de la bacteria que termina con la lisis (muerte) del hospedero y liberación de la progenie del fago. Generalmente se consideran dos aspectos importantes para el ciclo lítico: el periodo de latencia y periodo de eclipse. El periodo de latencia es el tiempo que transcurre desde la infección hasta la liberación de la progenie, mientras que el periodo de eclipse, que es parte del periodo de latencia, es el tiempo que necesita el fago para producir la primera progenie intracelular. La duración de este ciclo, basado en el modelo del fago T4, es de 20 a 30 minutos, donde aproximadamente 10 minutos corresponden al periodo de eclipse. El resultado es un aumento exponencial de partículas víricas acompañado por la eliminación total de las bacterias susceptibles (Abedon, 1989; Guttman *et al.*, 2005).

Los bacteriófagos con el ciclo lisogénico también provocan lisis, pero en la mayoría de los casos establecen otro tipo de relación con su hospedero ya que una vez que el genoma del virus ha entrado en la bacteria, no se forman nuevas partículas víricas, sino que el genoma del virus se duplica dentro de la bacteria en sincronía con su cromosoma y es transferido de una generación de bacterias a la siguiente. En cuanto al ciclo en sí, tomando como ejemplo el bacteriófago lambda, al introducir el material genético del virus, éste se vuelve circular y se integra en el genoma bacteriano por entrecruzamiento, linealizándose nuevamente. Una vez incorporado, el genoma del virus se replica junto con el cromosoma bacteriano. En algunos casos, como el fago P1, el profago se encuentra en calidad de plásmido y se segrega a células hijas con exactitud. A la unidad profago-bacteria se le denomina lisógeno o célula lisogénica. El ciclo lisogénico, en algunos casos puede pasar al ciclo lítico mediante un proceso de inducción provocada por estímulos externos que generalmente son desfavorables para el hospedero (generalmente, al grado de daño al ADN) donde el genoma vírico activa la lectura de genes líticos, se ensamblan los

viriones y se produce el ciclo lítico. A este tipo de virus se les denomina fagos atemperados o lisogénicos. Uno de los aspectos más importantes del ciclo lisogénico es el fenómeno de la conversión lisogénica y transducción. Esto significa que en algún momento del ciclo de replicación del fago, éste es transcrito con genes adicionales pertenecientes al hospedero. Posteriormente estos genes son introducidos en otro hospedero distinto donde pueden ser expresados cambiando algunas características importantes. Como resultado el metabolismo de la célula puede cambiar y/o la célula puede obtener capacidad de producir algún compuesto nuevo, inclusive toxinas. (Breitbart *et al.*, 2005; Calendar & Inman, 2005; Guttman *et al.*, 2005).

Debido a sus características, los fagos con ciclo lítico se han utilizado como agentes de biocontrol para bacterias patógenas para el humano y recientemente en organismos cultivados. Entre éstas bacterias, las de familia Vibrionaceae se consideran de mayor interés (Brock & LeaMaster, 1992; Ronda *et al.*, 2003).

I.4. Vibrios y su importancia en acuicultura.

Las bacterias que pertenecen a la familia Vibrionaceae (Gram-negativas) son de considerable importancia por su relación con procesos patológicos en la producción acuícola. El grupo comprende ocho géneros: *Allomonas*, *Beneckeia*, *Enhydrobacter*, *Listonella*, *Lucibacterium*, *Photobacterium*, *Salinivibrio* y *Vibrio*; donde los géneros *Vibrio* y *Photobacterium* son bacterias marinas (salvo unas excepciones como *Vibrio cholerae*, que se encuentra en aguas dulces y es el responsable de la enfermedad del cólera); que requieren sodio para su crecimiento. El género *Vibrio* es el más estudiado y es considerado el de mayor importancia debido a que muchas especies son patógenas para humanos y para los organismos marinos, incluyendo crustáceos, peces y moluscos que son cultivados para el consumo humano. Por otro lado, la incidencia de vibrios patógenos en organismos de cultivo y en organismos extraídos del medio natural (como peces y moluscos) es un problema sanitario que ha propiciado numerosos estudios al respecto (Madigan *et al.*, 1999; Ronda *et al.*, 2003).

En acuicultura, los vibrios se han reportado en numerosos casos de mortalidades en cultivos de peces, crustáceos y moluscos (Brock & LeaMaster, 1992). Entre las especies más reportadas se encuentran *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. natriegens*, *V. campbelli*, *V. alginolyticus* y *V. carchariae*. *V. harveyi* es una bacteria luminosa que se asocia a los crustáceos y peces, y en las granjas de cultivo también se puede encontrar en el agua de los estanques. Esta bacteria en particular es responsable de mortalidades masivas ya que invade el hepatopáncreas del hospedero y provoca la muerte de larvas de camarones peneidos como respuesta a una severa inflamación, se propaga muy rápido y una vez que ocurre la infección es sumamente difícil controlar (Johnson, 1989; Vinod *et al.*, 2006). *V. parahaemolyticus*, junto con otros vibrios (*V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *V. anguillarum*) infecta a los cultivos de camarones en sus estadios de larva, postlarva, juvenil, subadulto e incluso adulto. La infección empieza de manera superficial, en la cutícula, subcutícula y apéndices o branquias manifestándose en puntos de tonalidades cafés a negras. Sin tratamiento adecuado la cutícula se degrada poco a poco y puede producirse lo que se conoce como vibriosis sistémica, que es el caso más severo y mortal (causando la mortalidad del 100% de los animales en 24 horas); se caracteriza por una infección generalizada severa que involucra varios sitios provocando estrés, comportamiento errático, necrosis de apéndices, anorexia, inflamación y finalmente la muerte (Brock & LeaMaster, 1992; Brock & Main, 1994; Lightner & Redman, 1998).

Recientemente se ha empezado a considerar la posibilidad de que la virulencia de vibrios que causan la vibriosis puede estar relacionada con la presencia de bacteriófagos lisogénicos filamentosos (Flegel *et al.*, 2005).

I.5. Relación de los bacteriófagos con la virulencia de *Vibrio*

La presencia de los bacteriófagos lisogénicos se ha visto como un problema serio, ya que se ha comprobado que en estado lisogénico las bacterias pueden incrementar su virulencia. En el caso específico de *Vibrio* se han aislado fagos filamentosos de las cepas de *Vibrio cholerae* y se ha confirmado que dichos fagos son responsables de la virulencia de la bacteria ya que codifican la toxina de cólera

(Waldor & Mekalanos, 1996). De la misma manera se han encontrado fagos lisogénicos en las cepas de *V. harveyi*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* y otras bacterias que se consideran patógenas para el humano y/u organismos cultivados; los cuales se han asociado a la virulencia de sus respectivas cepas. Debido a esto, los fagos lisogénicos generalmente se consideran como vectores de genes indeseables. Inclusive, en trabajos recientes se sugiere que la virulencia de las bacterias que se han reportado altamente patógenas se debe exclusivamente a la presencia de los fagos lisogénicos (Keynan *et al.*, 1974; Faruque *et al.*, 1999; Nasu *et al.*, 2000; Oakey & Owens, 2000).

I.6. Importancia de las interacciones entre las poblaciones de vibrios y fagos.

Aunque se sabe que en un ambiente determinado existen poblaciones de fagos líticos y lisogénicos, apenas se está considerando la importancia de las interacciones de los mismos con las bacterias residentes. Los bacteriófagos presentes en un sistema, generalmente dependen de la diversidad y abundancia de bacterias susceptibles a la infección, que a su vez, dependen de las condiciones del medio, tales como temperatura, salinidad, pH, cantidad de materia orgánica, entre otras (Bossi *et al.*, 2003; Breitbart *et al.*, 2005). Se ha encontrado cierta tendencia en cuanto a la ocurrencia de fagos líticos y lisogénicos en distintos ambientes (Jiang & Paul, 1994, Breitbart *et al.*, 2005). Sin embargo las interacciones entre los vibrios y sus fagos en un ecosistema son complejas y se tiene poco conocimiento al respecto.

Sin embargo, podemos esperar que los fagos líticos actúen como reguladores de las poblaciones de vibrios más exitosos y abundantes mediante lisis, mientras que los fagos lisogénicos aporten genes a sus hospederos y formen lisógenos, algunos de los cuales pueden tener características que les proporcionen ciertas ventajas asegurando la preservación de ambos (Jiang & Paul, 1994; Breitbart *et al.*, 2005; Suttle, 2007). Se ha reportado que las poblaciones de vibrios marinos varían dependiendo de las condiciones del medio, principalmente en función de la temperatura. Por lo consiguiente, se espera que las poblaciones de los vibriofagos

varíen de manera similar en cuanto a la diversidad, tipo y abundancia (Koga *et al.*, 1982; Chibani-Chenoufi *et al.*, 2004).

En los sistemas de cultivo, las condiciones ambientales son más controladas pero se puede esperar patrones de comportamiento similares a los observados en los sistemas naturales, y es posible que los cambios en las condiciones de éstos sistemas afecten la composición de las poblaciones de vibrios y sus fagos, así como la posibilidad de que algunos fagos pueden ser vectores de virulencia. Sin embargo no se han realizado estudios en acuicultura acerca de las interacciones entre los vibrios y fagos. Por lo que en el presente trabajo se pretende evaluar la incidencia de ambos durante el cultivo larvario de camarón blanco *L. vannamei* con el fin de entender el papel que juegan los vibriofagos en la camaronicultura.

II. ANTECEDENTES

II.1. Vibriofagos marinos y su importancia ecológica.

Uno de los primeros trabajos y de mayor importancia sobre vibriofagos marinos, se atribuye a Baross *et al.* (1978), quienes aislaron fagos de *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. anguillarum* a partir de las ostras, almejas, cangrejos, camarones, de agua de mar y de sedimentos del noroeste del Océano Pacífico. De este estudio concluyeron que las fuentes con mayor incidencia de vibriofagos son moluscos bivalvos y crustáceos, debido a que presentan altas concentraciones de vibrios. Poco tiempo después, Koga *et al.* (1982), aislaron 18 bacteriófagos líticos de agua de mar contra *V. parahaemolyticus*, y los caracterizaron en cuanto a variantes morfológicas, rango de especificidad, resistencia a temperaturas elevadas y sensibilidad a solventes, obteniendo solamente fagos de tipo *Myovirus* y *Siphovirus* con rango estrecho de especificidad y sensibles a diversos solventes.

Chibani-Chenoufi *et al.* (2004), realizaron un estudio sobre interacciones de fagos y sus hospederos desde un punto de vista ecológico. Un aspecto interesante de este trabajo es la consideración del papel de los fagos lisogénicos en los ecosistemas. Hambly & Suttle (2005), publicaron resultados de una investigación

acerca de la viriósfera y el intercambio genético entre comunidades de fagos dando mayor importancia a las interacciones fago-hospedero y concluyen que el papel principal de las poblaciones de hospederos en la ecología y evolución de los fagos, es de servir como vectores de intercambio genético. Otro trabajo interesante sobre la importancia de virus marinos y bacteriófagos fue realizado por Suttle (2007), donde remarca la influencia de virus marinos en la composición de las comunidades marinas y en los ciclos biogeoquímicos, especialmente el ciclo de carbono, donde la contribución se debe a los efectos de lisis bacteriana mediada por fagos. Al presentarse un evento de lisis, se liberan cantidades considerables de materia orgánica que es utilizada por otras bacterias y/o depositada en el fondo. Se estima que en el océano profundo, debido a la lisis bacteriana, se producen de 0.37 a 0.67 giga toneladas de carbono.

II.2 Problemas que causa *Vibrio* en acuicultura y camaronicultura.

Wong *et al.* (1979), aislaron el agente causante de mortandades en cultivos de salmón que fue identificado como *Vibrio anguillarum*. Posteriormente Chong *et al.* (1983), reportaron casos de vibriosis identificando a vibrios como *V. anguillarum* y *V. parahaemolyticus* como responsables de provocar mortandades. Más tarde, Egidius *et al.* (1986), identificaron y describieron un nuevo *Vibrio*, *V. salmonicida* como agente etiológico de la “vibriosis de agua fría”. Yong & Seng (1990), realizaron un estudio sobre vibrios que causan infecciones serias y mortandades en granjas de peces y designan a *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* como patógenos de mayor importancia. Finalmente, Reed & Francis-Floyd (1996) reportan que existen siete especies de vibrios que son patógenos para los peces, entre estos, *V. damsela*, *V. charchariae* y *V. vulnificus*.

Uno de los primeros trabajos complejos acerca de enfermedades en camaronicultura se atribuye a Brock & LeaMaster (1992), quienes revisaron las principales enfermedades de etiología bacteriana, fúngica y parasitaria de camarones afectados y concluyen que las enfermedades causadas por bacterias son de importancia considerable debido a los altos índices de mortandad. Baticados *et al.*

(1990), reportaron a *V. harveyi* y *V. splendidus* como causantes de vibriosis en *Penaeus monodon*. Poco tiempo después Ishimaru *et al.* (1995), describieron una nueva especie de *Vibrio*, *V. penaeicida*, al cual consideran patógeno para *Penaeus japonicus*. Otro trabajo que se puede considerar de suma importancia fue realizado por Vandenberghe *et al.* (1999), donde reportaron las especies de vibrios asociados al cultivo de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, en diferentes estadios de desarrollo. En este trabajo observaron que *V. alginolyticus* y *V. harveyi* son los vibrios más comunes en camarones sanos y enfermos, teniendo mayor incidencia de *V. harveyi* en camarones enfermos comparado con otros vibrios. *V. parahaemolyticus* se reporta en tercer lugar en incidencia, pero solamente en estadios juveniles. Gómez-Gil *et al.* (2001), describieron las enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México, resaltando la importancia de las infecciones bacterianas, especialmente la vibriosis. En su trabajo reportaron a *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. damsela* como principales causantes de vibriosis en tanques de engorda y a *V. harveyi* y *V. splendidus* como dominantes y responsables de vibriosis durante el cultivo larvario. Un aspecto interesante de este trabajo es la mención del aumento en la resistencia bacteriana como respuesta al uso de antibióticos para tratar las infecciones. Un trabajo similar fue realizado por Karunasagar *et al.* (2005), donde describieron a la vibriosis como un problema serio en la camaronicultura y consideran a *V. harveyi* como un patógeno primario y de mayor importancia. Goarant *et al.* (2006), describieron a *Vibrio nigripulchritudo* como agente causante del síndrome de “verano”. En su estudio demuestran que cepas patógenas de *V. nigripulchritudo* son responsables del desarrollo de un nuevo tipo de vibriosis sistémica.

II.3 Fagoterapia en acuicultura

Recientemente el aislamiento y uso de fagos ha ganado mucho interés en la acuicultura. Wu & Chao (1982) examinaron los efectos del fago Φ ET-1, aislado del agua de estanques de cultivo en Taiwan específico de *Edwardsiella tarda*. En los experimentos *in vitro*, los fagos mataron 25 de 27 cepas de *E. tarda* en ocho horas. Park *et al.* (1997), demostraron que los bacteriófagos son capaces de controlar

infecciones con *Lactococcus garviae* en cultivos de peces. Nakai *et al.* (1999), aislaron dos fagos de *Lactococcus garviae* que infectan el pez limón de Japón (*Seriola quinqueradiata*); los aplicaron en inyecciones y como parte del alimento y tuvieron excelentes resultados durante pruebas de reto. Posteriormente, Park *et al.* (2000), trabajaron con peces Ayu infectados con *Pseudomonas altivelis* y aislaron dos fagos específicos de esta bacteria y los aplicaron exitosamente para su control. Payne *et al.* (2004), describieron la habilidad de dos diferentes vibriofagos aislados de organismos enfermos para infectar *V. harveyi*, *V. cholerae* y *V. mimicus*. Karunasagar *et al.* (2005), aislaron bacteriófagos de camarones infectados y los evalúan como alternativa de control de infecciones de *V. harveyi* obteniendo resultados superiores a los generados por una mezcla de antibióticos. Vinod *et al.* (2006), aislaron un bacteriófago de los cultivos de camarón capaz de infectar *V. harveyi* con marcado potencial para el biocontrol. Shivu *et al.*, (2007), reportaron a seis fagos de *Vibrio harveyi* que tienen un amplio espectro lítico por lo que proponen su uso para el control de dicha bacteria en camaronicultura. Phumkhachorn & Rattanachaikunsopon (2010), aislaron un bacteriófago a partir de camarones infectados y caracterizaron su capacidad de lisar cepas patógenas de *Vibrio harveyi*.

II.4 Evidencias de la relación de vibriofagos lisogénicos con la virulencia de Vibrio.

Los primeros reportes acerca de la relación de fagos de ciclo lisogénico con la patogénesis en vibrios corresponden a una serie de estudios sobre fagos de *V. cholerae*. El primer trabajo fue realizado por Waldor & Mekalanos (1996), quienes aislaron el fago filamentoso CTX ϕ como responsable de codificar la toxina del cólera. Kar *et al.* (1996), aislaron otro fago filamentoso, VSK, de *V. cholerae* que induce menos virulencia. Unos años más tarde, Ikema & Honma (1998), aislaron otro fago lisogénico de la cepa 0139 de *V. cholerae*. Al poco tiempo Faruque *et al.* (1999), reportaron la capacidad del fago CTX ϕ de infectar *V. mimicus* confiriéndole virulencia. Nasu *et al.* (2000), aislaron un fago lisogénico de una cepa altamente virulenta de *V. parahaemolyticus* y determinaron que la toxicidad de la bacteria se debe a la presencia del fago. Austin *et al.* (2003), reportaron la asociación del fago lisogénico VHML con la virulencia de *V. harveyi*. Khemayan *et al.* (2006), examinaron

el efecto lítico de un fago tipo *Siphoviridae* aislado de *V. harveyi* y concluyen que este es inestable registrándose inducción de lisogenia y formación de lisógenos.

III. JUSTIFICACIÓN

Recientemente se ha puesto un mayor interés en el uso de bacteriófagos por la necesidad de controlar poblaciones de bacterias resistentes a los antibióticos donde los fagos específicos para dichas cepas pueden ser aislados en pocos días, lo cual es una ventaja ante los antibióticos que tardan más tiempo en desarrollarse.

En la camaronicultura, se ha sugerido el uso de los fagos para controlar las poblaciones de bacterias oportunistas, como *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* entre otras que causan pérdidas drásticas durante la producción. En este caso el uso de los bacteriófagos constituye una alternativa más saludable comparada con los antibióticos convencionales. Sin embargo, no se ha evaluado la abundancia de fagos en los cultivos larvarios de camarón y en consecuencia tampoco se han realizado estudios acerca de la interacción de las poblaciones de vibrios con sus fagos. De este modo, la importancia del presente trabajo radica en que es uno de los primeros análisis de la presencia de fagos en los cultivos larvarios de camarón como primer paso para entender el papel que juegan éstos en los tanques de cultivo mediante el análisis de las interacciones entre sus respectivas poblaciones, lo anterior es muy importante ya que ello puede ser un factor determinante de la viabilidad técnica y legal de la terapia de fagos en acuicultura.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo general.

Evaluar la incidencia de vibriofagos y su capacidad para inducir virulencia en vibrios durante el cultivo intensivo de larvas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

IV.2 Objetivos específicos.

- Evaluar la incidencia de vibrios y sus fagos durante la producción intensiva de larvas de camarón blanco *L. vannamei*
- Caracterizar el proceso de replicación de los fagos aislados así como la especificidad de los mismos
- Evaluar la capacidad de fagos de ciclo lisogénico para inducir la virulencia en experimentos controlados.

V. HIPÓTESIS:

En sistemas naturales existen interacciones entre vibrios y sus fagos que reflejan la estabilidad del sistema que depende de las perturbaciones a las que se somete. En los tanques de cultivo larvario de camarón se espera que existan poblaciones de vibrios interactuando con fagos específicos donde en condiciones de mayor perturbación del sistema los fagos estén regulando el crecimiento bacteriano mediante lisis (mayor incidencia de fagos con ciclo lítico) y que algunos sean responsables del aumento en la virulencia de vibrios. Por otro lado en condiciones de menor perturbación del ambiente se espera una tendencia hacia la dominancia de fagos con ciclo lisogénico y relativamente pocos vibrios.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Evaluación de la incidencia de vibrios y sus fagos durante la producción intensiva de larvas de camarón blanco *L. vannamei*.

VI.1.1. Aislamiento de vibrios y fagos

VI.1.1.1 Muestreos.

Se realizaron muestreos durante dos ciclos de producción larvaria en la granja Acuicultura Mahr (Pichilingue, B.C.S., México). En cada caso se seleccionaron tres tanques al azar (de la misma sala) y se tomaron muestras de larvas (y nauplios) de camarón y muestras de agua en bolsas estériles. Los nauplios de camarón fueron recolectados utilizando un tamiz de 200 μm y las larvas utilizando una de luz de malla mayor. Estas fueron trasladadas en refrigeración y procesadas en el laboratorio.

Cada vez se contaron 1000 larvas por muestra, se concentraron en un volumen de 3 mL y se homogeneizaron con un disruptor de tejidos para ser procesadas para el aislamiento de fagos y vibrios. Posteriormente el número de larvas por muestra fue reducido a 500 y luego a 50 en función del aumento de talla de los organismos.

VI.1.2. Aislamiento e identificación de vibrios.

VI.1.2.1 Aislamiento

Se tomaron 20 μl del homogeneizado de larvas y se sembraron en medio de cultivo TCBS que es selectivo para bacterias del género *Vibrio*. Las colonias que crecieron se examinaron y se aislaron diferenciando las mismas con base en su morfología colonial (Gomez-Gil & Roque, 2006). A las colonias aisladas se les realizó la tinción de Gram y posteriormente se caracterizó su perfil de uso de fuentes de carbono mediante el sistema de multipuebas BIOLOG-GN2. Con los resultados obtenidos se construyó un árbol de similitud de patrones bioquímicos en el software Statistica 8 usando método de Ward y distancias Manhattan.

VI.1.2.2. Identificación molecular

La identificación de las cepas se realizó mediante la amplificación del ácido desoxirribonucleico ribosomal (ADNr), utilizando la reacción en cadena de la polimeras (PCR) y su posterior secuenciación mediante el siguiente protocolo:

Aislamiento del ADN de las bacterias

Se utilizó el protocolo de extracción de ADN conocido como Fenol-Cloroformo mostrado en el anexo 1 (Ausubel *et al.*, 2002; Sambrook & Russell, 2001).

Amplificación del fragmento del gen 16s ADNr mediante PCR.

Se utilizaron dos pares de oligonucleótidos para amplificar una región del gen 16s 27F/1385R (GAGTTTGATCCTGGCTCA/CGGTGTGTRCAAGGCC) y 27F/1525R (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG/TTCTGCAGTCTAGAAGGAGGTCWTCCAGCC) con el fin de obtener un fragmento relativamente grande.

La reacción se realizó en tubos Eppendorf de 200 µl de capacidad con 50 µl de la mezcla de reacción. La reacción de amplificación contenía 100 ng de ADN, 0.25 µM de cada oligo, 5 µL de buffer PCR 10X, 10 mM de dNTP's, 1 U de Taq polimerasa y agua mili-Q estéril para tener un volumen final de 50 µL. Las reacciones se amplificaron en un termociclador BIORAD MJ Mini con el programa mostrado en el anexo 2.

Los productos de PCR se evaluaron en geles de agarosa al 1% en buffer TBE teñidos con SYBR Gold. De cada reacción se tomaron 5.0 µL y se mezclaron con 2 µL de buffer de carga (50% glicerol, 0.1 M EDTA pH 8.0, 0.25% de azul de bromofenol) (Sambrook *et al.*, 2001). Como estándar se utilizaron 2 µL del marcador de 10 Kb DNA Ladder (INVITROGEN). La electroforesis se corrió a 70 V durante 60 minutos. Los resultados fueron documentados como se mencionó anteriormente.

Los productos fueron enviados para su secuenciación a los laboratorios de MacroGen (<http://www.macrogen.com>) en Seul, Korea. Una vez obtenidas las

secuencias se depuraron y alinearon utilizando el software Codon Code Aligner. Para esto, se eliminaron bases de baja calidad al inicio y al final de cada secuencia, se alinearon los fragmentos de secuencias para construir el consenso y finalmente se analizaron las discrepancias y se corrigieron donde fuera necesario. Adicionalmente se efectuaron análisis de alineamiento Blast entre las secuencias obtenidas en el presente estudio y aquellas reportadas en el National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Se construyó el árbol filogenético usando método de Neighbor-Joining (modelo de distancias: p-distance, gaps: pairwise deletion) incluido en el paquete Codon Code Aligner.

VI.1.3. Aislamiento de fagos.

VI.1.3.1. Obtención de lisados crudos

Para el aislamiento de fagos se utilizó el procedimiento descrito por Carlson (2004), que consiste en el enriquecimiento en medio líquido (ver anexo 3).

VI.1.3.2. Aislamiento de fagos líticos y lisogénicos

Los lisados crudos que mediante la prueba de puntos mostraron actividad lítica detectable se procesaron según el siguiente procedimiento:

Se repitió la prueba de puntos con el lisado para comprobar actividad, el área de inóculo sin colonias resistentes se recortó con un asa previamente esterilizada y se colocó en tubos con caldo marino estéril previamente inoculados con la bacteria susceptible, se incubaron a 35°C por 24 hrs. Los tubos se centrifugaron a 3,000 rpm a 4°C durante 20 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se realizó la prueba de puntos para comprobar actividad lítica. Las colonias resistentes, en caso de ser detectadas, se sembraron en caldo marino estéril y se incubaron a 35°C por 24 hrs. Al término de la incubación los tubos fueron expuestos a radiación UV durante 30 segundos. Se incubaron a temperatura ambiente durante una hora y posteriormente se centrifugaron a 3,000 rpm a 4°C durante 20 min. Con el sobrenadante se realizó nuevamente la prueba de puntos, con el fin de determinar el ciclo de replicación del fago, lo que depende de la intensidad del efecto lítico y de la

capacidad de formar lisógenos. Al obtener un resultado positivo en la prueba de puntos usando el sobrenadante proveniente del cultivo de las colonias resistentes, el lisado se considera de tipo lítico estricto. Por otro lado, si el resultado es negativo, significa que el lisógeno está formado y no es susceptible a la infección con el mismo fago, lo que es una de las características clave para detectar fagos lisogénicos.

Éste método fue modificado omitiendo el paso de adición de cloroformo (para romper las células y liberar la progenie de fagos) debido a que se ha reportado que puede inactivar o destruir ciertos fagos filamentosos debido a su capacidad de degradar algunos de sus componentes estructurales.

VI.2. Incidencia de vibrios y sus fagos

VI.2.1. Incidencia de vibrios

Se estimó el número de vibrios por larva y por mililitro de agua mediante la determinación de unidades formadoras de colonias (UFC). Para esto se hicieron diluciones decimales de las muestras (en solución salina estéril (NaCl 2%). Posteriormente se hizo la siembra de las mismas por triplicado en agar TCBS poniendo 13 µl de cada muestra y las placas se incubaron a 35°C, al término del período de incubación se contaron las colonias.

VI.2.2. Incidencia y purificación de fagos

El método descrito por Carlson (2004) y otros autores se basa en la expresión de la ruta lítica para poder detectar y contabilizar los fagos por lo que no se puede aplicar con los lisados de fagos lisogénicos debido a la alta probabilidad de obtener un sesgo importante en el número de fagos (en el caso de ser detectados). Tomando en cuenta dicha limitante, para los fagos lisogénicos solo se consideró la presencia y la diversidad de los mismos.

Se estimó el número de fagos por muestra mediante la determinación de unidades formadoras de placas (UFP) siguiendo el método descrito por Carlson (2004) el cual es un método general para fagos líticos, que consiste en hacer

diluciones decimales del lisado de fagos (hasta 10^{-5}). De cada dilución se tomó 1 mL y se inoculó en un tubo con agar marino líquido (mantenido a una temperatura entre 45 y 50°C aproximadamente) al cual también se le agregaron 20 μ L del homogeneizado de la bacteria de interés, se mezcló el contenido usando un vortex y se vació en una caja petri sobre una capa de agar marino. Se dejó incubar a 30°C por 24 hrs. Al término del tiempo de incubación se examinaron las cajas petri con la finalidad de observar unidades formadoras de placas (UFP), las cuales se presentan como áreas transparentes delimitadas que corresponden a la actividad del fago. Con esta prueba se consiguen dos objetivos, contabilización de fagos y la purificación de los mismos ya que cada UFP corresponde a un fago específico.

Posteriormente se recortaron las UFPs seleccionadas (con base en su morfología) y se transfirieron a tubos con caldo marino estéril previamente inoculados con la bacteria de interés, y los tubos se incubaron a 30°C por 24 hrs. Los cultivos se filtraron usando membrana de 0.2 μ m y con el sobrenadante se realizó la prueba de puntos para confirmar la presencia de fago. De este mismo sobrenadante se tomaron 2 mL y se inocularon en un tubo con caldo marino el cual fue previamente sembrado con una alta densidad de la bacteria de interés, se dejó en incubación a 35°C por 24 h. El proceso se repitió para obtener mayor concentración de fagos. Finalmente se centrifugó a 3,000 rpm a 4°C durante 40 min, el sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y se almacenó en refrigeración a 10°C para su uso posterior.

VI.3. Caracterización de los fagos

VI.3.1. Determinación del rango de especificidad.

Para determinar el rango de hospederos para cada fago se realizó la prueba de puntos con cada bacteria obtenida en los muestreos, además cada fago se probó contra las siguientes cepas de referencia: *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, *Vibrio harveyi* ATCC 14126, *Vibrio natriegens* ATCC 14048, *Vibrio campbellii* ATCC 25920, *Vibrio proteolyticus* ATCC 15338, *Vibrio pelagius* ATC 25916 y *Vibrio carchariae* ATCC 35084. La determinación del rango de especificidad produce dos

tipos de resultados: rango de hospederos para los fagos y rango de “susceptibilidad” para las bacterias.

VI.3.2. Selección de fagos líticos y lisogénicos

Con el fin de seleccionar a los fagos con mayor potencial lítico se realizaron pruebas de puntos en placas de agar marino y TCBS, posteriormente se recortaron las áreas de inóculo libres de colonias resistentes y se sembraron en tubos con caldo marino previamente inoculado con la bacteria de interés. Se tomaron en cuenta el área de expansión (doble halo) y la proporción de colonias resistentes. Los fagos seleccionados se purificaron, se concentraron y fueron almacenados en refrigeración para su posterior uso. En estas pruebas, los fagos que presentaron mejores características se clasificaron según su efectividad, siendo los más efectivos aquellos que presenten doble halo de expansión y sin bacterias resistentes.

Para los fagos lisogénicos, una parte del procedimiento fue similar al usado para los fagos líticos y consiste en la caracterización de la expresión en placas de agar marino de la ruta lítica. Sin embargo en este caso se considera de mayor importancia la parte del área del inóculo que presenta colonias resistentes, se recortó la parte que no presenta colonias resistentes para la selección del fago que provocó la lisis. De igual manera las colonias resistentes se aislaron y se les realizó la prueba de lisogénia para determinar la formación del lisógeno. Después de inducir ciclo lítico en los lisógenos formados se realizó la prueba de puntos con los fagos liberados. De la misma manera se realizó la prueba de puntos con los fagos aislados del área que no presentó colonias resistentes. Las pruebas se repitieron dos veces para comparar los resultados. En ambos casos se determinó el porcentaje relativo de colonias resistentes (algunas de las cuales son lisógenos). En estas pruebas los fagos se caracterizaron en cuanto a su estabilidad por lo que los que presentaron constantemente mayor inclinación hacía el ciclo lítico caracterizado por pocas colonias resistentes, y que al formar lisógenos sean fácilmente inducibles, se consideraron inestables. De lo contrario, los fagos que mostraron poca actividad lítica y formaron lisógenos estables, se consideraron lisogénicos estrictos o estables.

VI.3.3. Evaluación de la estabilidad del ciclo de replicación.

Empleando las pruebas de puntos se monitoreo el comportamiento del ciclo de replicación de los bacteriófagos líticos y lisogénicos, para esto se hicieron cinco repeticiones para cada fago. Se tomó en cuenta la morfología de placas. El procedimiento se repitió cada 3 días durante 15 días.

VI.4. Evaluación de la capacidad de fagos lisogénicos para inducir virulencia en vibrios en experimentos controlados.

Las larvas en estadio Nauplio I fueron aclimatadas en el laboratorio de microbiología con aireación constante a una temperatura de 30 °C. Después de aproximadamente 24 hrs, ya que las larvas alcanzaron el estadio Nauplio IV-V, fueron tratadas con Dióxido de cloro (ClO₂) a una concentración de 0.3 ppm durante 5 minutos y neutralizado con tiosulfato de sodio, para eliminar la microbiota asociada. Una vez realizado el tratamiento, las larvas fueron contadas en grupos de 100 organismos y colocadas en unidades experimentales con 100 mL de agua de mar artificial estéril a 35 ‰, pH 7.8 – 8.2, 30 °C ± 1 °C y sin luz durante 24 horas para su acondicionamiento.

Las cepas de vibrios de interés fueron sembradas en Agar marino 2216 e incubadas a 30 °C por 24 hrs. Posteriormente las bacterias fueron cosechadas y se ajustaron a una densidad óptica de 585 nm a 1 de absorbancia en 10 mL de agar marino líquido usando tubos de vidrio de tapón de rosca. En estadio Nauplio V se realizó la infección adicionando en cada unidad experimental una dosis de 600 µl de bacteria susceptible correspondiente a 2·10⁶ UFC·ml⁻¹. Para los tratamientos con fagos, se adicionaron 100 µl del concentrado de fagos.

Los organismos fueron mantenidos con dosis diarias de la microalga *Chaetoceros calcitrans* a una densidad de 1·10⁵ cel·ml⁻¹ y sin recambio de agua durante 96 horas. Transcurrido este tiempo se registró la supervivencia, estadio de desarrollo y presencia de signos de vibriosis. Los datos se analizaron a través de un ANOVA y comparaciones múltiples de Tukey.

VII. RESULTADOS

VII.1. Incidencia de vibrios y presencia de fagos en el cultivo larvario del camarón blanco *L. vannamei*.

VII.1.1. Ocurrencia de vibrios en las larvas del camarón e identificación.

De la porción de las bacterias cultivables de las muestras se aislaron en total 80 bacterias. De estas cepas se perdieron cinco; el resto se sometió a pruebas con fagos para identificar las cepas susceptibles a infección. Los datos generales sobre los muestreos, y el listado de cepas para cada ciclo se muestran en los apéndices (Tablas VIII a XI).

VII.1.1.1. Cepas identificadas mediante el método de multipruebas BIOLOG

Se practicó la identificación de 54 cepas usando el sistema de multipruebas BIOLOG. Solamente 13 cepas fueron identificadas con 100% de similitud. Por lo cual se realizó una comparación entre ellas con base en el uso de las fuentes de carbono. Se construyó un dendograma usando el método de Ward y las distancias de Manhattan (Figura 4). En el dendograma se observan tres grupos (a nivel de corte presente). La mayoría de las cepas fueron identificadas como *Vibrio alginolyticus*. Los grupos 1 y 2 son los que menos se parecen a *V. alginolyticus* teniendo menor parecido el grupo 1 (ya que se encuentra más separado del grupo 3), mientras que el grupo 3 parece estar conformado por vibrios muy similares e incluye cepas que fueron identificadas positivamente como *V. harveyi* y a la mayoría de *V. alginolyticus*.

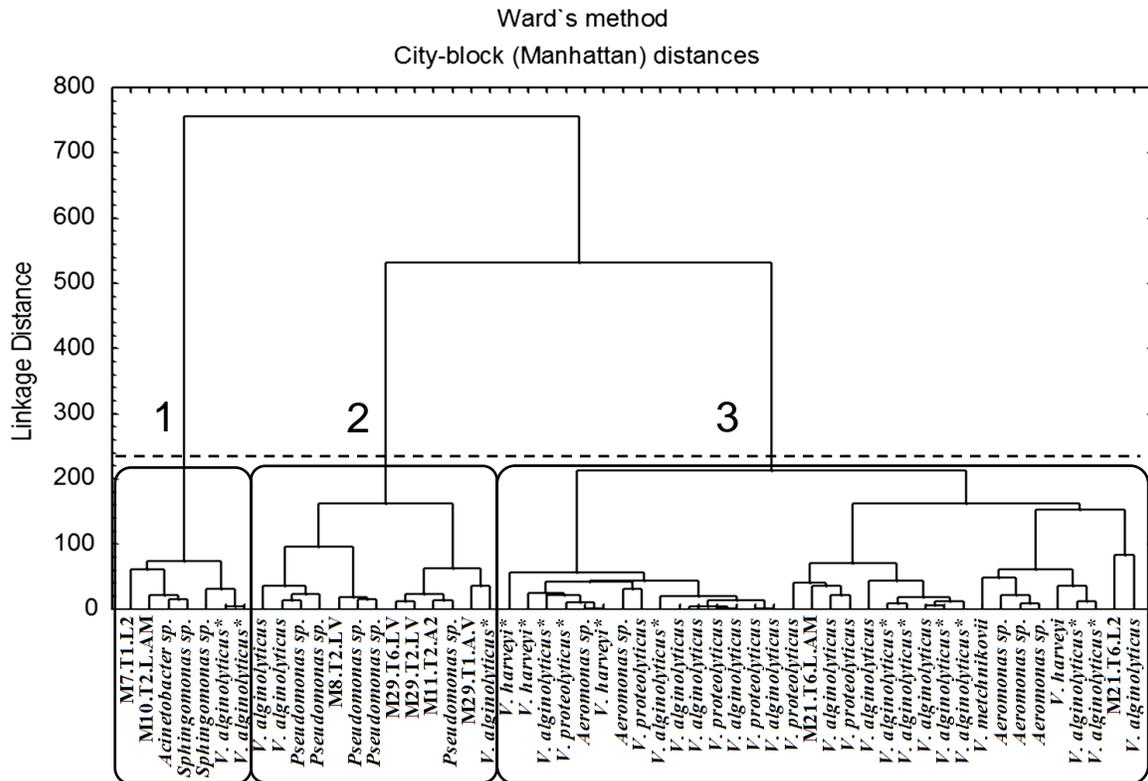


Figura 4. Dendrograma de similitudes entre las cepas identificadas usando BIOLOG. Se distinguen tres grupos. Grupo 1: grupo más heterogéneo, diferentes géneros presentes, menor parecido con grupo 3. Grupo 2: otro grupo heterogéneo, con algunas cepas no identificadas, incluye posibles *Pseudomonas* sp. Grupo 3: grupo con alto parecido entre cepas, dominado por *V. alginolyticus*.

VII.1.1.2. Cepas identificadas mediante la secuenciación parcial del gen 16s DNAr.

Se obtuvieron secuencias de 49 cepas. Inicialmente se procesaron siete cepas utilizando primers para un fragmento pequeño del gen y secuenciadas en una sola dirección, obteniéndose secuencias de calidad mediana. Posteriormente se secuenciaron 42 cepas en ambas direcciones, de las cuales ocho (ambos componentes) resultaron de calidad muy baja complicando o haciendo imposible la identificación de las mismas. Las secuencias de cuatro muestras no se pudieron alinear por lo mismo. Debido al alto parecido entre la mayoría de las secuencias de calidad obtenidas, se dificulta la identificación a nivel especie ya que existe un alto grado de similitud entre las cepas de la misma especie a nivel del gen 16s. Sin embargo, se pueden observar tres grupos con especies similares (Figura 5), donde el grupo 1 está compuesto por especies ajenas a *Vibrio*, teniendo a *Salinococcus* y

Acetobacter. El grupo 2 contiene secuencias similares a *V. alginolyticus* (con nueve cepas) incluyendo *V. azureus* y *V. parahaemolyticus*. Mientras que en el grupo 3 se observan especies de *V. brasiliensis/tubayashi* y similares (con ocho cepas). Es interesante notar que varias de las especies tipo son muy parecidas entre sí, como en el caso de *V. parahaemolyticus* con *V. proteolyticus* y *V. brasiliensis* con *V. hepatarius*. También se observa que *V. alginolyticus* presenta la variación más amplia entre todas las cepas ya que aparece en los diferentes grupos. Por otro lado se tiene una cepa, M21.T1.L.AM, que parece estar muy similar a la cepa ATCC de *V. harveyii* (especie tipo) pero relativamente distante de otras cepas de *V. harveyi*, las cuales no tienen una ubicación clara. Se presenta otra complicación en la ubicación de *V. parahaemolyticus* ya que ambas cepas se encuentran distanciadas de la cepa tipo (ATCC) y una, M8.T6.A.VC tiene alto parecido con *V. azureus* tipo. Las primeras siete cepas procesadas y las secuencias de baja calidad no fueron incluidas en el árbol filogenético.

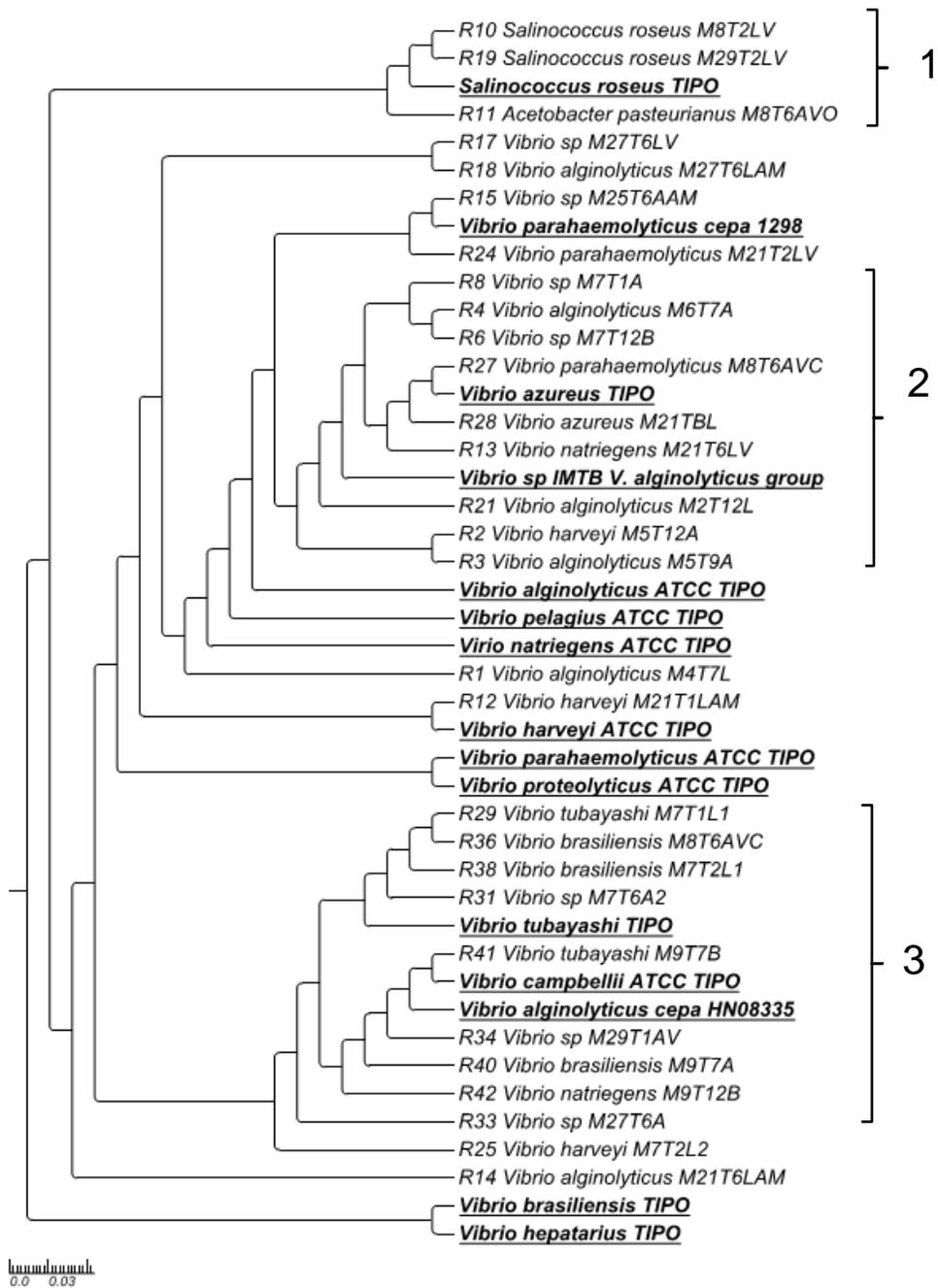


Figura 5. Árbol filogenético de cepas secuenciadas. Se pueden diferenciar tres agrupaciones: 1) bacterias distintas a vibrios, 2) grupo de similares a *V. alginolyticus* y 3) similares a *V. brasiliensis/tubayashi*. Como secuencias tipo se usaron seis vibrios de la cepa ATCC (subrayadas en negrita) y cepas representativas de otras especies.

VII.1.1.3. Ocurrencia de vibrios en las larvas del camarón.

De las cepas procesadas, 48 fueron identificadas. Sin embargo no se pudo llegar a nivel especie en el caso de 16 cepas (de las cuales 14 son *Vibrio* sp.). Se identificaron seis cepas que no pertenecen al género *Vibrio* las cuales se distribuyen en los géneros *Aeromonas*, *Planomicrobium* y *Salinococcus*. Se diferenciaron ocho especies de vibrios siendo *V. alginolyticus* la especie más común en la mayoría de los estadios de desarrollo larvario seguido por *V. harveyi*. Los estadios donde se encontró el mayor número de vibrios fueron Mysis 2-3 (Tabla I).

Tabla I. Ocurrencia de diferentes especies de vibrios en los estadios de desarrollo larvario.

Bacteria	Estadio de desarrollo larvario														Total
	Zoea 1	Zoea 2-3	M2-M3	M3-PL1	Mysis 1	PL2-PL3	PL3-PL4	PL6-PL7	PL8-PL9	PL9-PL10	PL12-PL13	PL16-PL17	PL18-PL19	PL20-PL21	
<i>A. pasteurianus</i>				1											1
<i>Aeromonas</i> sp.							1		1						2
<i>Planomicrobium</i> sp.						1									1
<i>S. roseus</i>				1										1	2
<i>V. alginolyticus</i>	1			1		2	4	1		1	1		1		12
<i>V. azureus</i>											1				1
<i>V. brasiliensis</i>			1							1					2
<i>V. harveyi</i>		2	2			1				1					6
<i>V. natriegens</i>										1	1				2
<i>V. parahaemolyticus</i>				1				1							2
<i>V. proteolyticus</i>								1							1
<i>V. tubayashi</i>			1								1				2
<i>Vibrio</i> sp.	1		3			3	1	1			1	2	1	1	14
Total general	1	3	7	4	0	6	6	5	0	6	4	2	2	2	48

VII.1.2. Bacteriófagos aislados.

Se aislaron un total de 69 fagos considerando ambos ciclos. De los cuales no se observa que exista una clara dominancia según el tipo de fago en cada ciclo. Sin embargo, si se consideran los tanques por separado, se pueden observar diferencias. Cabe mencionar que no necesariamente todos los fagos para un ciclo dado son diferentes.

En el primer ciclo de producción se observó un mayor número de fagos líticos, especialmente en los tanques 9 y 12. En el segundo ciclo, los fagos aislados en su mayoría fueron lisogénicos observándose mayores números de los mismos en el tanque 6 y 1 y la menor cantidad en el tanque 2 (Tabla II).

Tabla II. Bacteriófagos líticos y lisogénicos aislados en el primero y segundo ciclo de producción.

Ciclo	Tanque	Fagos lisogénicos	Fagos líticos	Total
1	7	5	7	10
	9	6	5	8
	12	5	12	11
Total		16	24	38
2	1	6	4	10
	2	4	5	9
	6	8	3	11
Total		18	12	31

VII.1.3. Incidencia de vibrios y presencia de fagos

Se estimó la incidencia de vibrios por larva y por mL de agua (exceptuando el primer ciclo debido a datos insuficientes). En el caso de los fagos las estimaciones fueron más complicadas debido a que los fagos lisogénicos no se pueden cuantificar usando el método tradicional de agar de doble capa por lo que se presentan datos de presencia/ausencia de distintos fagos.

VII.1.3.1. Ciclo 1

Tanque 7: vibrios y fagos

El tanque 7 fue el que menor cantidad de vibrios presentó. Los picos de mayor incidencia así como los mayores declives en la misma, coinciden con la presencia de fagos. Se observaron picos de incidencia de vibrios en zoea 2-3 y postlarva 2-3. Los fagos lisogénicos estuvieron presentes en el primer pico de vibrios mientras que los líticos en el segundo y en los valores de incidencia más bajos. Es interesante que se encontraron fagos de ambos ciclos en dos ocasiones (postlarva 2-3 y al final, en postlarva 8 - 9). Los valores más bajos en cantidad de vibrios corresponden a los días de tratamiento con antibióticos y recambios (Figura 6).

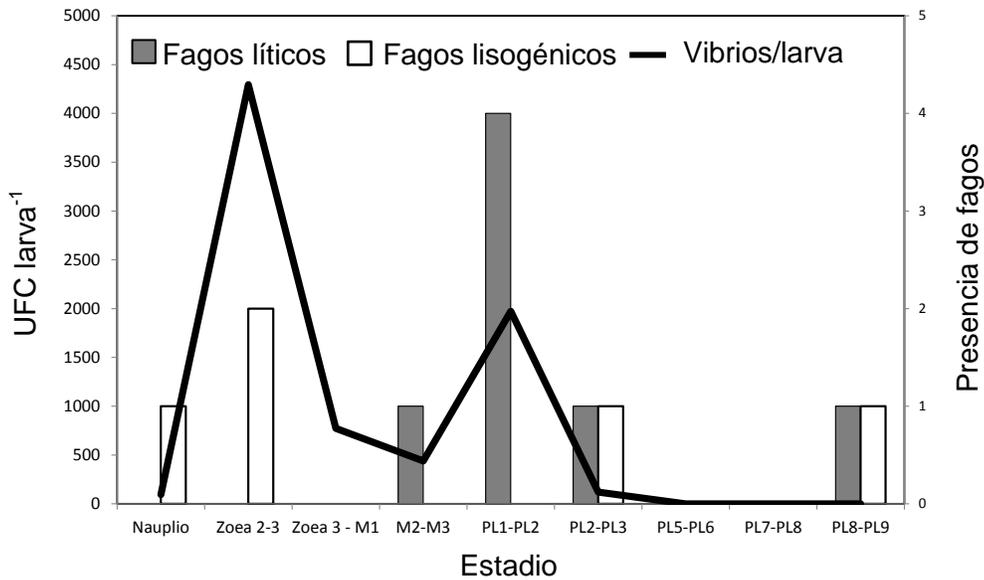


Figura 6. Incidencia de vibrios y presencia de vibriofagos con distinto ciclo de replicación en larvas de camarón en el tanque 7.

Tanque 9: vibrios y fagos

El tanque 9 presentó mayor cantidad de vibrios que el tanque 7. Los picos de incidencia ocurrieron en los estadios zoea 3 – mysis 1 (más tarde que en el caso de tanque 7) y postlarva 1 – 2 (igual que el anterior) pero con menor cantidad de vibrios. Los fagos lisogénicos se presentaron en los primeros estadios, durante el primer aumento registrado en cantidad de bacterias y al final de los muestreos donde se registró una baja significativa en la incidencia de vibrios, en estadios postlarva 5 – 6 (ausente en el tanque 7) y en el último (postlarva 8-9). Los fagos líticos se encontraron a mitad del ciclo, en estadios de postlarva 2 a postlarva 6 (ausente en postlarva 4). No se detectaron más de dos fagos del mismo tipo en las muestras (Figura 7).

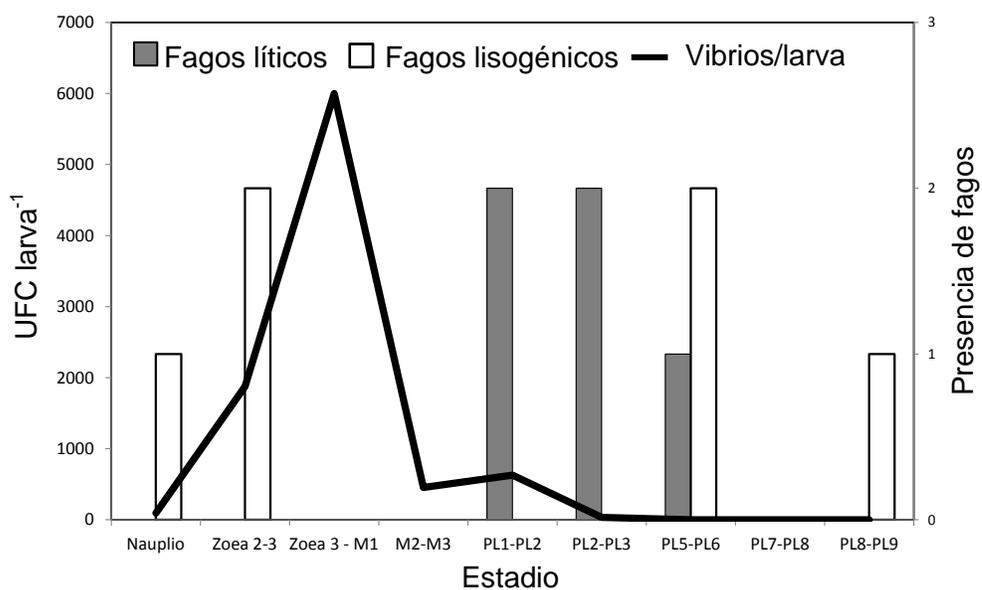


Figura 7. Incidencia de vibrios y presencia de vibriofagos con distinto ciclo de replicación en larvas de camarón en el tanque 9.

Tanque 12: vibrios y fagos

En el tanque 12 se observó la mayor cantidad de vibrios de los tres tanques. Se detectaron dos picos de incidencia donde de manera similar, el primer pico se caracteriza por el mayor número de vibrios. A diferencia de los tanques 7 y 9, la disminución en cantidad de vibrios después de la adición de antibióticos no se observó tan marcada en el estadio mysis 2 – 3 pero llegó a números muy bajos en la siguiente muestra (postlarva 1 – 2) donde se mantiene (incluso disminuye) por cinco días (abarcando estadios de postlarva 1 a 5). Durante este periodo se encontraron solamente fagos líticos, teniendo dos fagos en el primer punto más bajo y hasta ocho fagos en el segundo. Cuando se observó un aumento en la incidencia de vibrios (postlarva 5-6) también se tienen registrados dos fagos lisogénicos (Figura 8). Al igual que en los casos anteriores, en los últimos estadios muestreados donde la cantidad de vibrios es casi nula, se encontraron fagos lisogénicos.

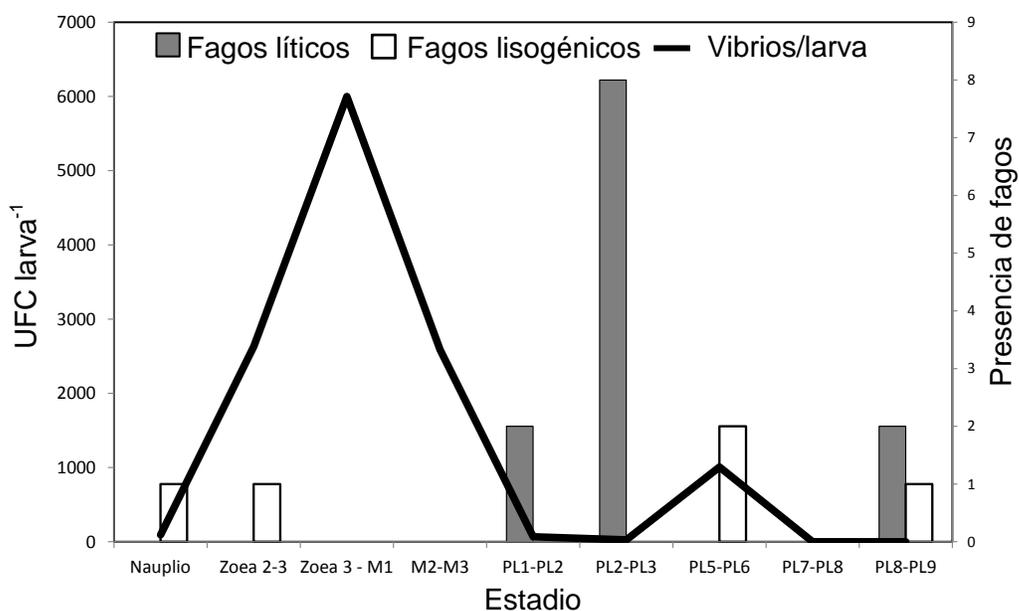


Figura 8. Incidencia de vibrios y presencia de vibriofagos con distinto ciclo de replicación en larvas de camarón en el tanque 12.

Comparación de la incidencia de vibrios entre los tres tanques.

Los tres tanques mostraron similitudes en cuanto a incidencia de vibrios. El mayor número de vibrios se observó en estadios zoea y mysis seguido por postlarva 1 y 2. Se registraron dos picos de incidencia siendo el primero con el mayor número de vibrios y el segundo con cantidades considerablemente menores. Al final de los muestreos no se encontraron vibrios en ninguno de los tres tanques. Los tanques 7 y 9 tienen un punto donde se observó una disminución significativa en la incidencia de vibrios, correspondiendo a los estadios mysis 1 y 2 (día 8 del ciclo) y comparten el intervalo en el que se registró el segundo pico de incidencia. Los tanques 9 y 12 coinciden en el pico de incidencia, donde tienen casi la misma cantidad de vibrios. Por último y al contrario de los tanques 7 y 9, el tanque 12 presenta números muy bajos de vibrios al mismo tiempo que se registra el segundo pico de incidencia para los otros tanques, adicionalmente su segundo punto de mayor incidencia coincide con el punto de menor (casi cero) incidencia para los otros tanques (Figura 9).

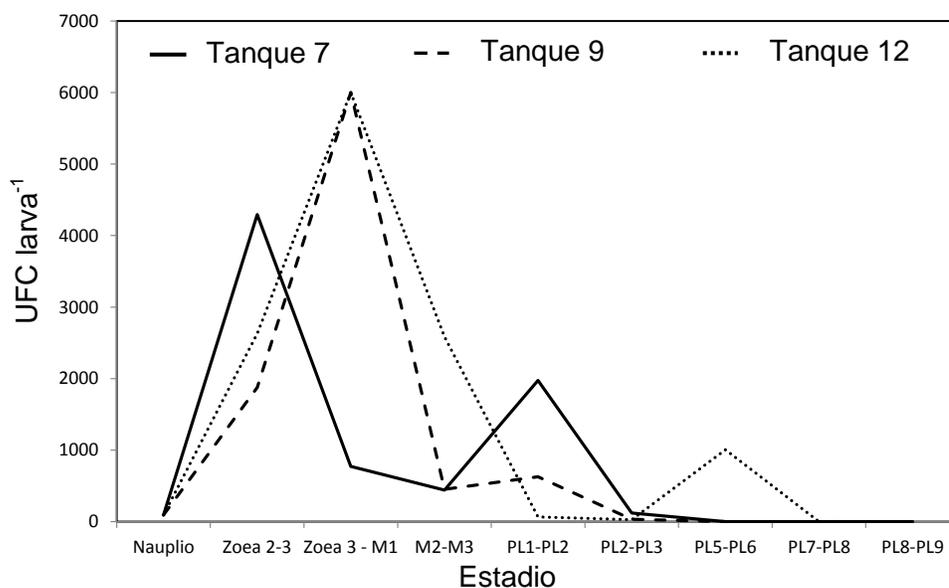


Figura 9. Incidencia de vibrios en las larvas de camarón en los tres tanques del primer ciclo.

Vibrios y fagos totales en las larvas.

La mitad del ciclo se caracterizó por una alta incidencia de vibrios y presencia o dominancia de fagos lisogénicos. Posteriormente se observaron variaciones menores en la cantidad de vibrios y se detectaron fagos líticos coincidiendo en tres casos con las caídas en los números de vibrios. Se observó que mientras aumenta el número de fagos líticos, más pronunciada es la disminución en la cantidad de vibrios. Se registraron tres casos de presencia de fagos de ambos tipos al mismo tiempo. En el primer caso solo hay un fago lisogénico, 11 líticos y un número muy bajo de vibrios. En el segundo caso, se observan más fagos lisogénicos y un aumento en cantidad de vibrios. En el último se observaron 3 fagos de cada tipo y número de vibrios cercano a cero (Figura 10).

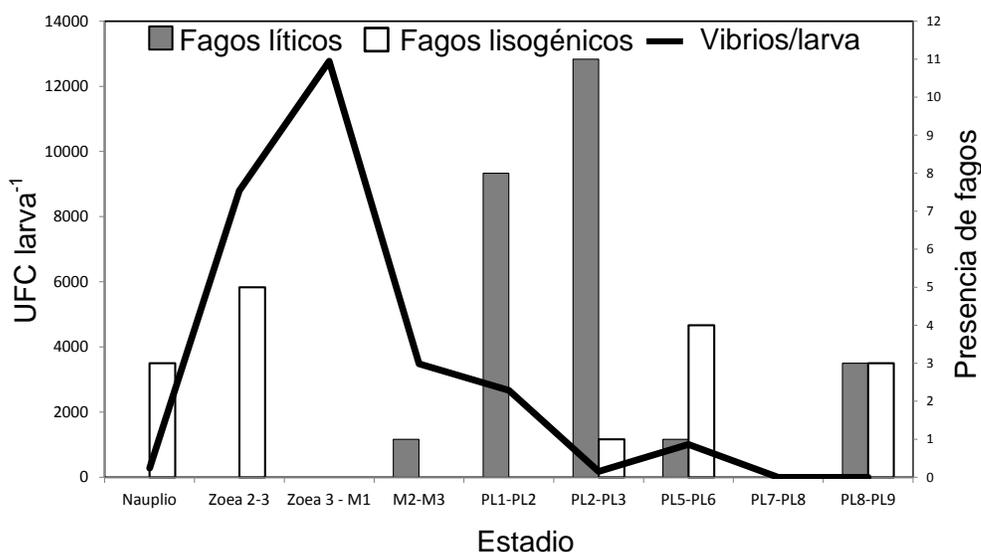


Figura 10. Incidencia de vibrios y fagos en las larvas de camarón durante el primer ciclo. Se muestra el total de vibrios y el total de fagos observados.

VII.1.3.2. Ciclo 2

En el segundo ciclo los datos obtenidos de las muestras de agua fueron suficientes para efectuar el seguimiento de la incidencia de los vibrios. El primer registro de vibrios tanto en el agua como en larvas corresponde a la muestra 4 (zoea 2 – 3) ya que no se observaron vibrios en las muestras anteriores.

Tanque 1: Vibrios y fagos

Vibrios en el agua y vibrios en las larvas

El tanque 1 se registró la mayor cantidad de vibrios (en el agua y en larvas) en el ciclo y fue descartado el último día de muestreo debido a las altas mortalidades y complicaciones de manejo. El patrón de la incidencia de vibrios en agua fue moderadamente similar a lo observado en las larvas, coincidiendo en el comportamiento en 3 ocasiones generales: al principio de los muestreos en el punto de disminución drástica de la cantidad de vibrios (estadio mysis 1 -2), y en los dos últimos picos de incidencia (Figura 11).

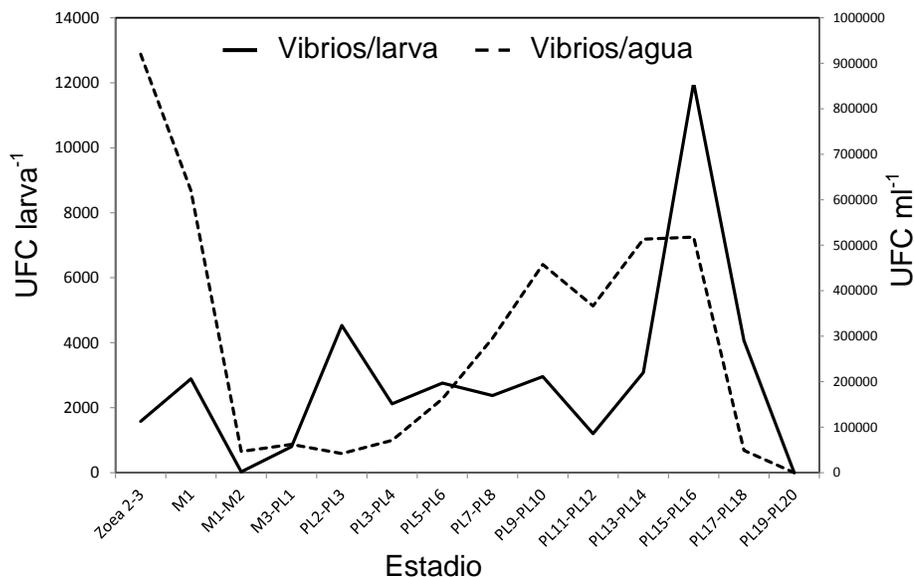


Figura 11. Comparativa de incidencia de vibrios en larvas y en el agua en el tanque 1.

Vibrios y fagos en las larvas

El primer registro de fagos corresponde a estadios mysis 1 y 2 (día 7 del ciclo) donde se observó una disminución significativa en el número de vibrios y se observan 4 fagos líticos y un fago lisogénico. En el resto de las muestras no se observaron fagos líticos. El segundo registro de fagos lisogénicos (3 fagos distintos) corresponde a estadios postlarva 2 - 3 y al segundo pico de incidencia de vibrios. Posteriormente se observan fagos lisogénicos en 3 ocasiones coincidiendo con disminuciones en cantidad de vibrios antes del pico más pronunciado de incidencia y a finales del mismo (Figura 12).

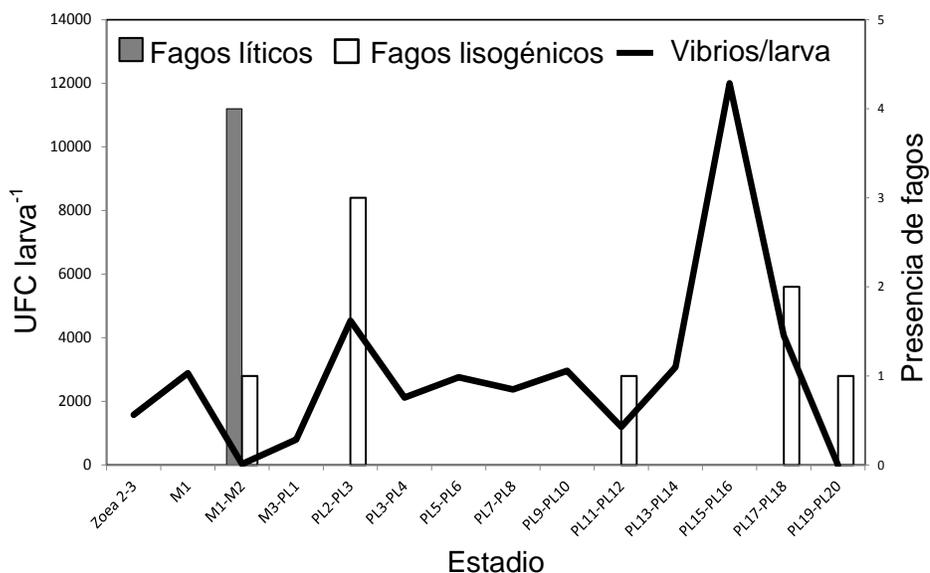


Figura 12. Incidencia de vibrios y presencia de vibriofagos con distinto ciclo de replicación en las larvas del camarón en el tanque 1.

Tanque 2: Vibrios y fagos

Vibrios en las larvas y vibrios en el agua

El patrón de comportamiento de los vibrios en el agua y en las larvas en el tanque 2, resultó ser muy similar observándose pocas diferencias en el mismo, en mysis 3 y postlarva 1 en el caso del agua se observa un aumento de vibrios (lo contrario de lo que pasa en las larvas) y casi al final del ciclo, en postlarva 15 – 16 disminuye la cantidad de vibrios (valores de incidencia más altos en larvas, Figura 13).

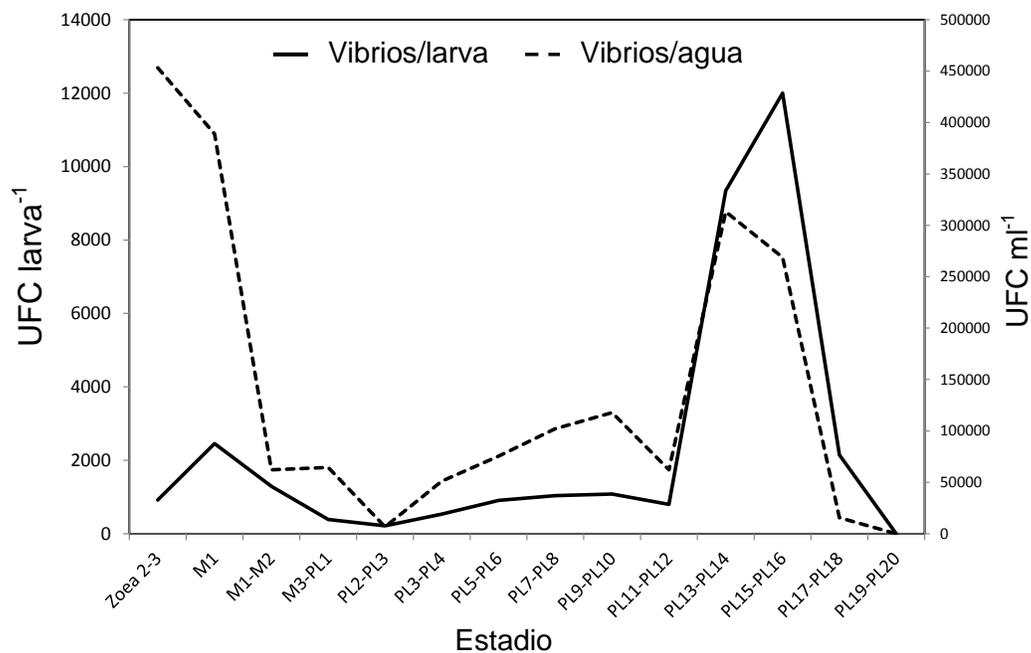


Figura 13. Comparativa de incidencia de vibrios en las larvas y en el agua en el tanque 2.

Vibrios y fagos en las larvas

El tanque 2 se caracterizó por tener la menor cantidad de fagos lisogénicos y la mayor de fagos líticos observados en el ciclo. Incluso se registró la presencia de un fago lítico en estadios mysis 2 -3 (día ocho del ciclo) para los cuales no se realizó la cuantificación de vibrios. Se observaron solamente dos picos de incidencia de vibrios, uno al principio del ciclo y otro al final. Se registró una cantidad de vibrios relativamente baja y poca variación en la misma durante la parte media del ciclo (mysis 3 hasta postlarva 12, equivalente a 14 días del ciclo). Lo último puede ser relacionado a la presencia de los fagos líticos al inicio del ciclo. Como en los casos anteriores, la presencia de los fagos líticos se caracteriza por una disminución en la cantidad de vibrios en las cinco ocasiones que éstos fueron detectados. Por otro lado, los fagos lisogénicos se registraron solamente al principio y al final del ciclo y están presentes en eventos de disminución de la cantidad de vibrios (Figura 14).

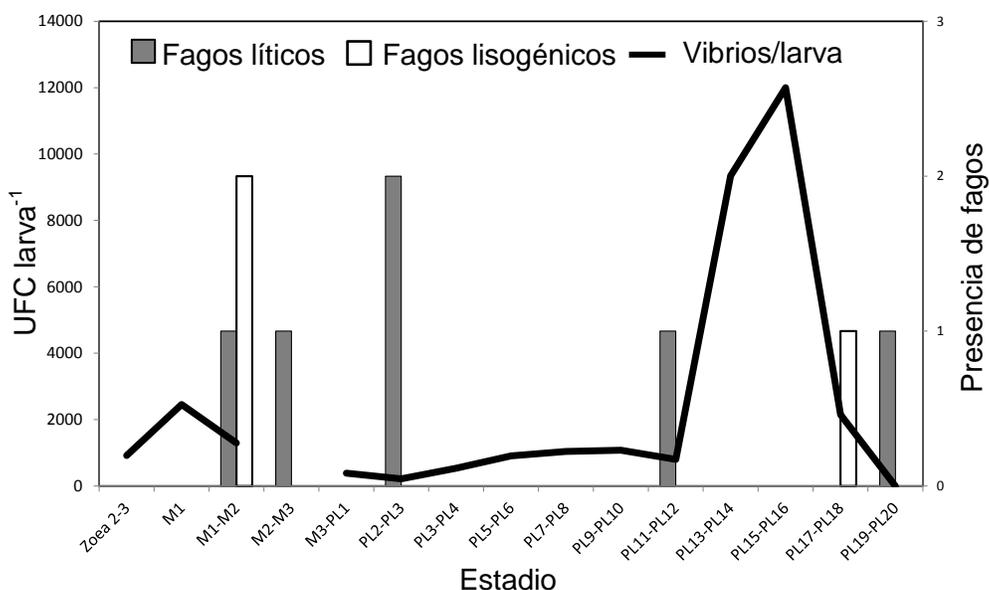


Figura 14. Incidencia de vibrios y presencia de vibriofagos con distinto ciclo de replicación en las larvas del camarón en el tanque 2.

Tanque 6: vibrios y fagos

Vibrios en el agua y en las larvas

El patrón de incidencia de vibrios en agua y larvas en el tanque 6 resulta ser bastante diferente ya que en el caso del agua la cantidad de vibrios disminuyó gradualmente a pesar de tener tres picos de aumento en la incidencia que a su vez coinciden con los picos de incidencia en las larvas. A pesar de las similitudes, los tres puntos de mayor incidencia (excluyendo el primero, zoea 2 -3) difieren en que para el caso de las larvas a partir del primer punto la incidencia aumenta teniendo el valor máximo al final del ciclo mientras que en el caso del agua se observa un comportamiento contrario (Figura 15).

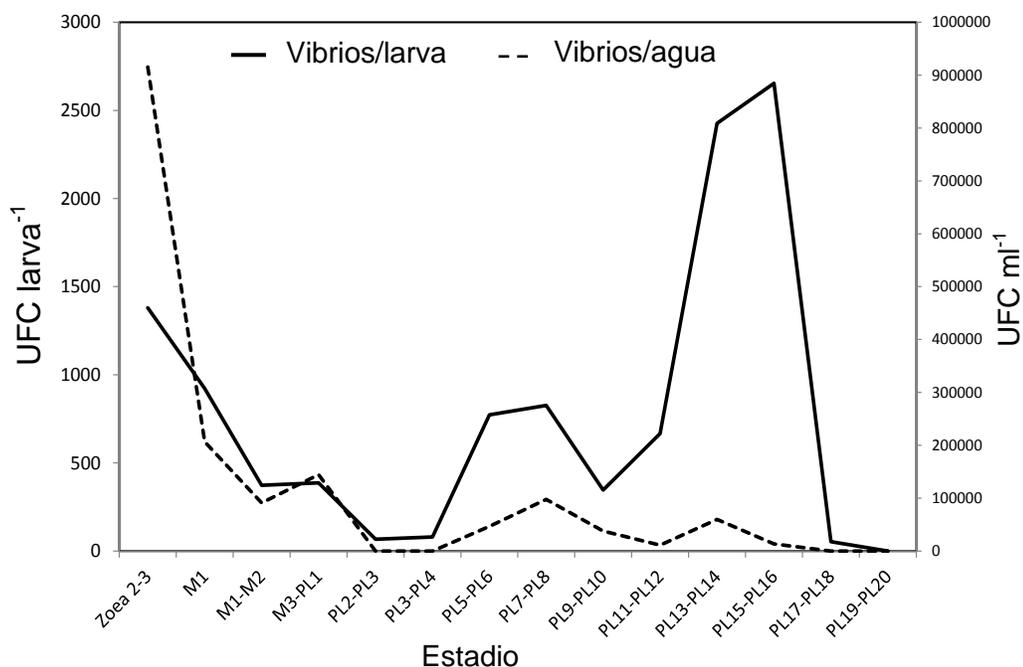


Figura 15. Comparativa de incidencia de vibrios en las larvas y en el agua en el tanque 6.

Vibrios y fagos en las larvas

El caso del tanque 6 resulta de particular interés ya que comparte ciertas características con el tanque 1, como distribución de fagos líticos y lisogénicos según el estadio de desarrollo, además que ambos son tanques con la mayor cantidad de fagos lisogénicos. Sin embargo, el tanque 6 presentó menor mortalidad que el tanque 1 y 2 aparte de tener valores de incidencia de vibrios más bajos de los tres tanques. Se observa que de manera general la incidencia de vibrios baja al principio del ciclo pero después aumenta teniendo mayor número al final. Los primeros tres y el último de los registros de fagos lisogénicos se encontraron en puntos donde se observa una baja significativa en la cantidad de vibrios; sin embargo, al inicio del intervalo con la mayor incidencia de vibrios (postlarva 11 -12) y en el punto de mayor incidencia (postlarva 15 – 16) también se observan fagos lisogénicos (Figura 16).

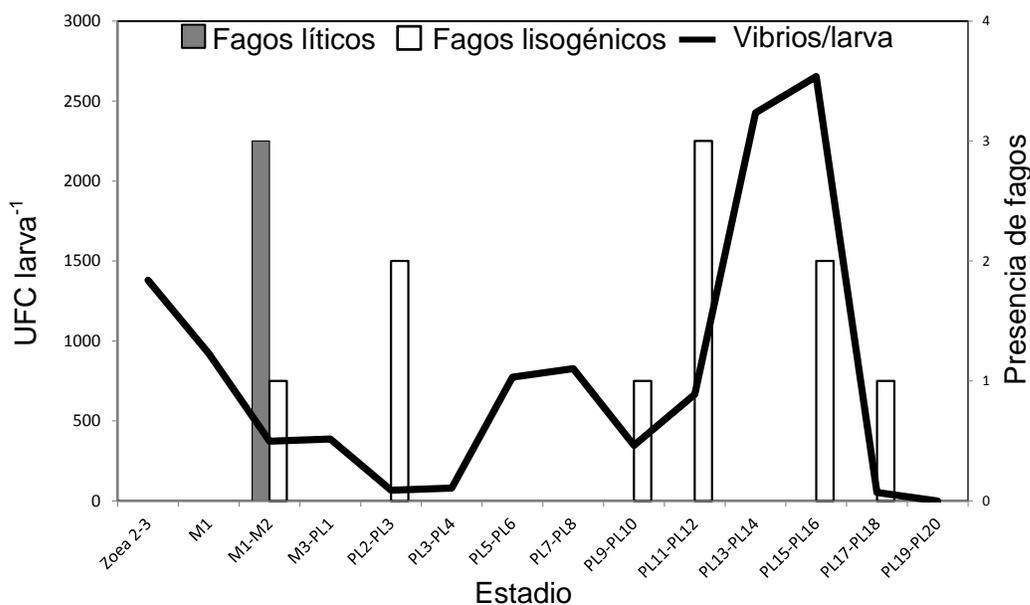


Figura 16. Incidencia de vibrios y presencia de vibriofagos con distinto ciclo de replicación en las larvas del camarón en el tanque 6.

Comparación de la incidencia de vibrios en el agua entre los tres tanques.

Los tres tanques muestran similitudes en cuanto a los picos de aumento de incidencia en general a lo largo del ciclo. Se observó la mayor cantidad de vibrios en el tanque 1, seguido por el tanque 2 y tanque 6. En el caso del último, la tendencia en la variación de la incidencia de vibrios es inversa comparada con los otros tanques: el número de vibrios en general disminuye conforme se acerca el final del ciclo (Figura 17).

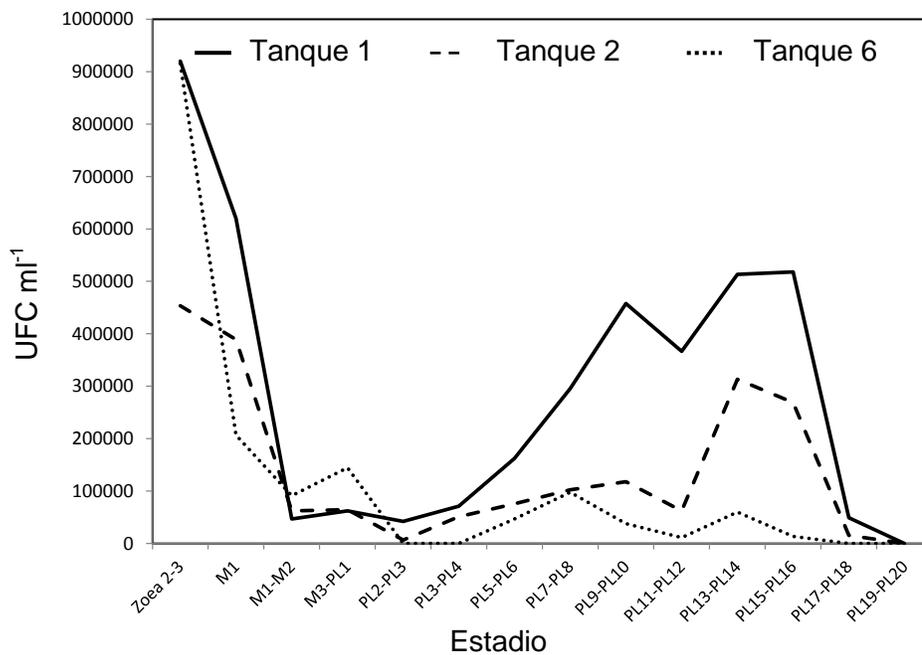


Figura 17. Incidencia de vibrios en el agua de los tres tanques del segundo ciclo.

Comparación de la incidencia de vibrios en las larvas entre los tres tanques.

En el caso de incidencia de vibrios en las larvas se observó que la similitud entre los tres tanques radica principalmente en que coinciden en los picos de mayor incidencia de vibrios (estadios postlarva 15 y 16). Por otro lado nuevamente se observó que el tanque 1 presenta mayor cantidad de vibrios en general mientras que el tanque 6 es el que presenta números de vibrios más bajos (Figura 18).

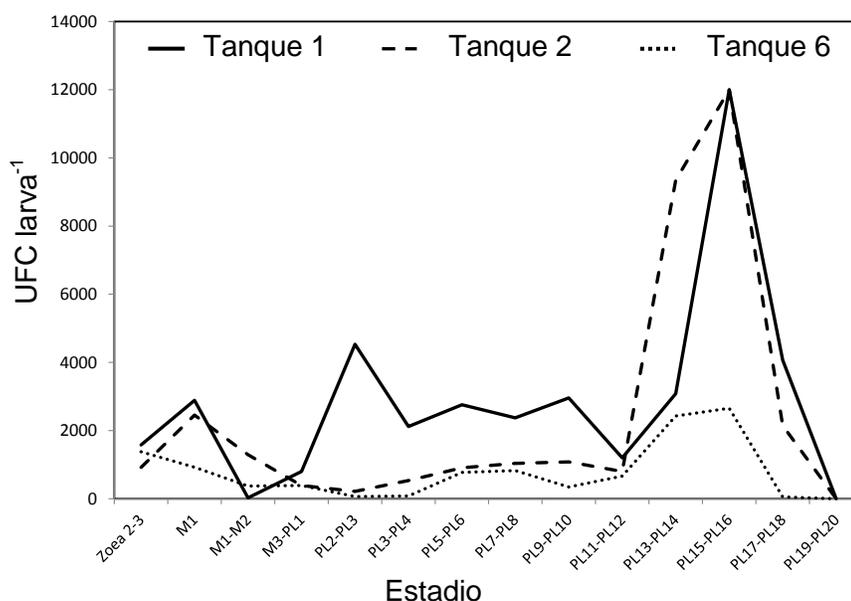


Figura 18. Incidencia de vibrios en las larvas de los tres tanques del segundo ciclo.

Vibrios totales en el agua vs vibrios totales en las larvas

Se encontró la mayor cantidad de vibrios al inicio del ciclo en el caso de las muestras de agua observándose otro incremento de importancia casi al final del ciclo. En las larvas el comportamiento es de cierta manera lo contrario (sin considerar que al final del ciclo la incidencia bajo a valores cercanos a cero) ya que el valor más alto de la incidencia de vibrios se encuentra al final del ciclo. De la misma manera se observaron diferencias (aumento vs disminución en número de vibrios) en los estadios zoea 2–3, y en el intervalo de mysis 3 a postlarva 4 (Figura 19).

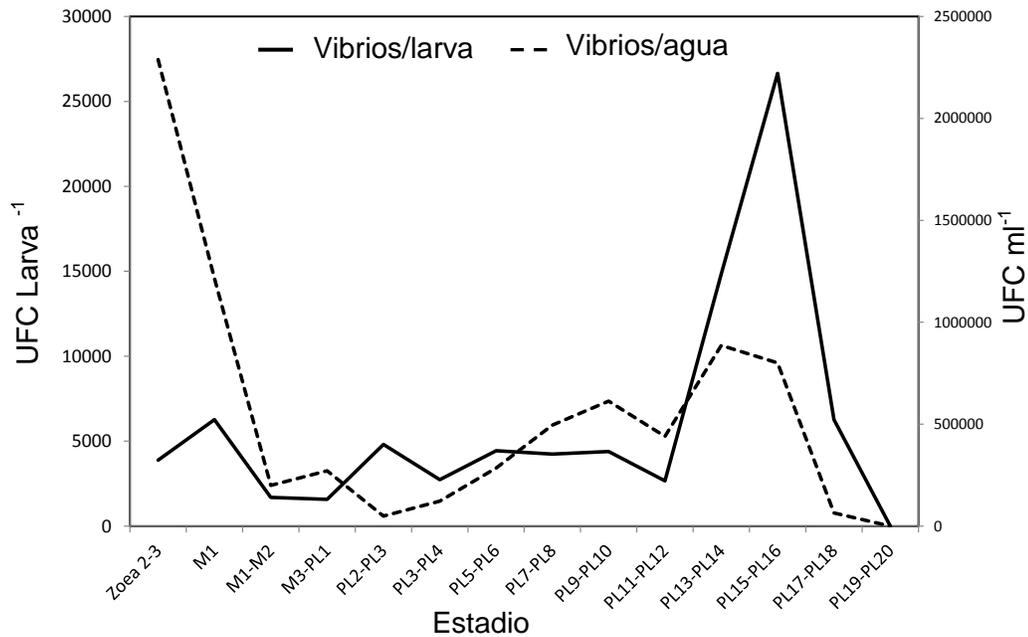


Figura 19. Incidencia general de vibrios en las larvas y en el agua en el segundo ciclo.

Vibrios y fagos totales en las larvas.

En general, la incidencia de vibrios en el segundo ciclo fue representada por dos eventos con números elevados al principio (en zoea y mysis 1) y al final (intervalo postlarva 14 – 16) de los muestreos, siendo el segundo donde se registraron cantidades más elevadas de vibrios. Los fagos líticos se observan en puntos donde la cantidad de vibrios disminuye (estadios mysisi 1-2, postlarva 11-12 y postlarva 19-20) a excepción del día 11 (postlarva 2 y 3) donde la presencia de fagos líticos no coincide con la disminución en la cantidad de vibrios (Figura 20). Los fagos lisogénicos no parecen tener relación alguna con la variación en la incidencia de vibrios si no se examina cada tanque por separado.

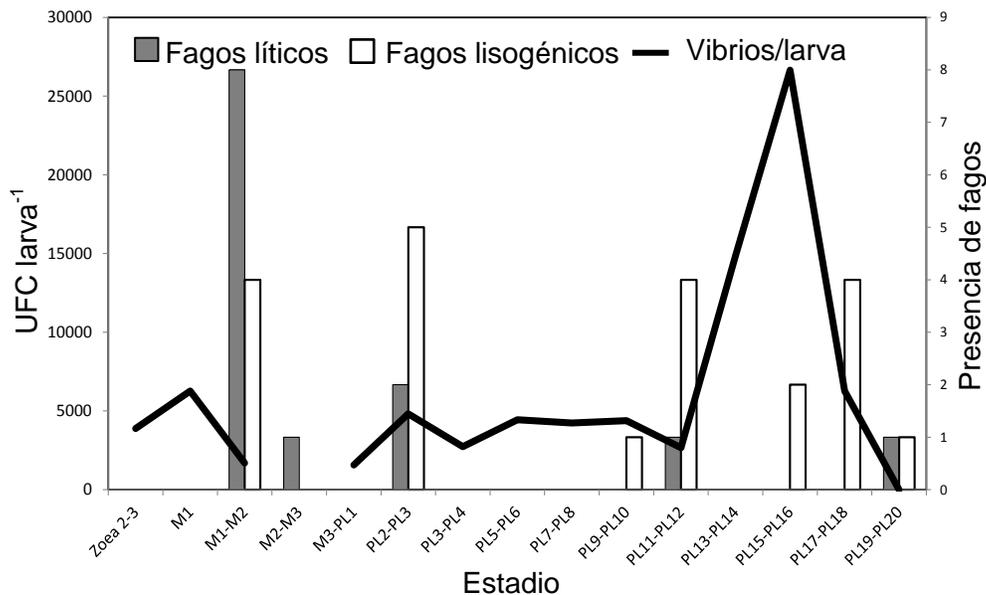


Figura 20. Incidencia de vibrios y fagos en las larvas de camarón durante el segundo ciclo. Se muestra el total de vibrios y el total de fagos observados. No se cuenta con datos de incidencia de vibrios en el punto M2-M3.

VII.2. Caracterización de los fagos

VII.2.1 Especificidad de los fagos y susceptibilidad de las cepas a infección por los fagos.

Los fagos obtenidos se clasificaron en líticos y lisogénicos. Se monitoreo el comportamiento de cada fago usando su cepa blanco para confirmar el ciclo de replicación (comprobación de la clasificación) y posteriormente se evaluó la capacidad de cada uno de infectar múltiples cepas. Los resultados se presentan en tablas para cada ciclo (tabla IV y V) donde se muestra la clave asignada a cada fago, el tipo de ciclo de replicación del mismo, su rango de hospederos y estabilidad del ciclo. Para lo último, se tienen tres clasificaciones: estricto, estable e inestable. Los fagos con ciclo estricto se comportan de manera idéntica en todas las pruebas, para los fagos líticos significa que el efecto lítico no cambia, para los fagos lisogénicos, significa que una vez formado el lisógeno, este es muy estable y no es susceptible a infección secundaria por el mismo fago y en la prueba de puntos las características

del área de inóculo no cambian. Los fagos estables son aquellos que muestran algunas variaciones en la expresión de su ciclo: los líticos varían poco en efectividad en la prueba de puntos (es decir, dejan más colonias o varía el diámetro del halo de inhibición), los lisogénicos si forman lisógenos exitosamente pero en la prueba de puntos muestran variaciones (en el tamaño e intensidad). Finalmente, los fagos inestables son aquellos que se comportan de manera inconsistente durante las pruebas realizadas, los fagos líticos pueden dejar mayor porcentaje de colonias resistentes y tener un efecto lítico variable, los fagos lisogénicos forman lisógenos inestables que pueden ser inducidos bajo condiciones mínimas de estrés mientras que en pruebas de puntos pueden mostrar un fuerte efecto lítico, pero durante las repeticiones, se comportan diferente (dejando placas turbias). Al final se muestra una tabla general que resume lo observado en ambos ciclos (tabla VI).

VII.2.1.1. Ciclo 1.

En el primer ciclo se observan siete especies de vibrios que son susceptibles a infección por fagos donde se tienen 10 cepas de *V. alginolyticus*, de las cuales dos (del tanque 7 y 12) son susceptibles a infección de hasta 11 fagos seguido por dos cepas más (tanque 9 y 7) que resultaron susceptibles a seis y cinco fagos respectivamente. En conjunto, *V. alginolyticus* es susceptible a infecciones por 41 fagos. En segundo lugar pero con menos cepas y menor “rango de susceptibilidad” se encuentra *V. harveyi* que se observó en los tres tanques. Es interesante que en las cepas de los tanques 7 y 9 *V. harveyi* solamente sea susceptible a un fago mientras que en el tanque 12 puede ser infectado por tres. De las cinco cepas de vibrios no identificados, una cepa, M6.T9.A resultó susceptible a 10 fagos y en total por los vibrios no identificados se observaron 15 fagos. Las cepas no identificadas resultaron ser susceptibles a infecciones de hasta 10 fagos en dos ocasiones (ver tabla XII del Apéndice 3).

VII.2.1.2. Ciclo 2

En el segundo ciclo de producción se identificaron menos cepas teniendo mayor número de fagos en una cepa de *Vibrio* sp. del tanque 6 (M25.T6.A.V) siendo ésta

susceptible a siete fagos, seguido por cepa no identificada del tanque 1 (M27.T1.L.AM) susceptible a cinco fagos. En general, los vibrios identificados no fueron afectados por más de 2 fagos lo que sugiere que la mayoría son específicos de su cepa blanco (Ver tabla XIII del Apéndice 3).

De manera general, de las ocho especies de *Vibrio*, las más recurrentes (*V. alginolyticus* y *V. harveyi*) resultaron susceptibles a la infección por un mayor número de fagos, registrándose 43 para la primera y 10 para la segunda lo que significa que son las especies más susceptibles (y tienen mayor número de cepas). De lo contrario, especies como *V. azureus*, *V. brasiliensis*, *V. proteolyticus* y *V. natriegens* solamente son susceptibles de infección por su fago específico. En general, el ciclo 1 presentó más cepas susceptibles a un mayor número de fagos comparado con el segundo ciclo (tabla III). La mayoría de los fagos capaces de infectar *V. alginolyticus* y *V. harveyi* se encuentran en el ciclo 1.

Tabla III. Resumen de la lista de especies de bacterias encontradas en cada ciclo de producción y cantidad de fagos a los que son susceptibles.

Bacterias		Fagos encontrados		
Cepas	ESPECIE	Ciclo 1	Ciclo 2	TOTAL
2	<i>Aeromonas sp.</i>	2	0	2
2	<i>Salinococcus roseus</i>	0	2	2
12	<i>Vibrio alginolyticus</i>	41	2	43
1	<i>Vibrio azureus</i>	0	1	1
2	<i>Vibrio brasiliensis</i>	1	1	2
6	<i>Vibrio harveyi</i>	6	4	10
2	<i>Vibrio natriegens</i>	1	1	2
2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2	2	4
1	<i>Vibrio proteolyticus</i>	1	0	1
2	<i>Vibrio tubayashi</i>	1	2	3
14	<i>Vibrio sp.</i>	15	18	33
33	N.I.	27	24	51

VII.2.2. Rango de hospederos de los fagos aislados y tipos de fagos.

VII.2.2.1. Ciclo 1

El ciclo 1 se caracterizó por presentar un mayor número de fagos líticos que el ciclo 2. Además de tener un mayor número de fagos líticos, la mayoría de éstos son de rango amplio de hospederos (hasta cinco), encontrándose solamente dos fagos líticos específicos de una sola cepa (fagos 16 y 45). En cuanto a fagos lisogénicos, la mayoría de los mismos son específicos de su cepa blanco. Se observó un fago lisogénico (fago 8) capaz de infectar cuatro cepas distintas mostrando resultado estable en los cuatro casos (Tabla IV).

Tabla IV. Rango de hospederos de los fagos aislados en el primer ciclo de producción. La mayoría de los fagos líticos infectan dos o más cepas.

Clave Fago	Tipo	Hospederos	Estabilidad ciclo
30(a,b,c,d,e,f)	Lítico	5	Estricto
26	Lítico	5	Estable
27	Lítico	5	Estable
29	Lítico	5	Estable
23	Lítico	4	Estable
28	Lítico	3	Estricto
36	Lítico	3	Estable
21	Lítico	3	Estable
18	Lítico	2	Estricto
19	Lítico	2	Estable
20	Lítico	2	Estricto
22	Lítico	2	Estable
25	Lítico	2	Inestable
40	Lítico	2	Inestable
16	Lítico	1	Estricto
45	Lítico	1	Inestable
8	Lisogénico	4	Estricto
17(a,b)	Lisogénico	2	Estricto
32	Lisogénico	2	Estable
34	Lisogénico	2	Estable
39	Lisogénico	2	Estable
1	Lisogénico	1	Inestable
5	Lisogénico	1	Estable
6	Lisogénico	1	Estable
7	Lisogénico	1	Estable
9	Lisogénico	1	Estable
24	Lisogénico	1	Muy inestable
35	Lisogénico	1	Muy inestable
41	Lisogénico	1	Estable
43	Lisogénico	1	Estable
44	Lisogénico	1	Estable

VII.2.2.2. Ciclo 2

El segundo ciclo se caracterizó por una mayor cantidad de fagos lisogénicos, la mayoría de los cuales son específicos de su cepa blanco (10 de 18), ocho son capaces de infectar más de dos cepas y de éstos, un fago, F5-T1 es capaz de infectar hasta seis bacterias. De los 13 fagos líticos, casi la mitad (seis fagos) infectan solamente una bacteria mientras que el resto es capaz de infectar hasta un máximo de tres bacterias (Tabla V).

Tabla V. Rango de hospederos de los fagos aislados en el segundo ciclo de producción. Se observa que algunos fagos lisogénicos son de rango amplio de hospederos.

Clave Fago	Tipo	Hospederos	Estabilidad ciclo
F1-T1a	Lítico	3	Estricto
F1-T1b	Lítico	3	Estricto
F1-T2	Lítico	3	Estable
F6-T2a	Lítico	3	Estricto
F6-T2b	Lítico	3	Estricto
F2-T1a	Lítico	2	Estricto
F2-T1b	Lítico	2	Estricto
F10-T2	Lítico	1	Inestable
F1-T6a	Lítico	1	Estricto
F1-T6b	Lítico	1	Estricto
F1-T6c	Lítico	1	Estricto
F4-T2	Lítico	1	Inestable
F8-T2	Lítico	1	Inestable
F5-T1	lisogénico	6	Estable
F4-T1	lisogénico	4	Estable
F8-T1	lisogénico	3	Estricto
F9-T1	lisogénico	3	Inestable
F3-T2	lisogénico	3	Estricto
F3-T6	lisogénico	3	Estricto
F5-T6	lisogénico	2	Estricto
F11-T6	lisogénico	2	Estable
F7-T1	lisogénico	1	Estable
F10-T1	lisogénico	1	Inestable
F2-T2	lisogénico	1	Estricto
F5-T2	lisogénico	1	Estable
F9-T2	lisogénico	1	Estricto
F2-T6	lisogénico	1	Estricto
F7-T6	lisogénico	1	Estable
F8-T6	lisogénico	1	Estricto
F9-T6	lisogénico	1	Estable
F12-T6	lisogénico	1	Estricto

VII.2.2.3. Resumen de especificidad de los fagos.

En resumen, los fagos líticos del primer ciclo de producción tienen un rango de hospederos mayor que los del segundo ciclo y son más abundantes, teniendo hasta nueve fagos capaces de infectar cinco bacterias. El número máximo de hospederos para los fagos líticos del segundo ciclo fue de tres registrándose cinco fagos con dicha característica. En cuanto a fagos lisogénicos, para ambos ciclos de producción se observa una alta especificidad de los mismos respecto a su cepa blanco. En ambos casos la mayoría de los fagos lisogénicos (10 y 9, respectivamente) tienen un hospedero. Sin embargo en el ciclo 2 los fagos lisogénicos son más generalistas que en el ciclo 1 llegando en dos casos a infectar hasta seis hospederos (Tabla VI).

Tabla VI. Resumen de especificidad de los fagos encontrados en ambos ciclos. La mayoría de los fagos lisogénicos son específicos de su cepa blanco.

Hospederos	Número de fagos	
	Ciclo 1	Ciclo 2
Líticos		
5	9	0
4	1	0
3	3	5
2	6	2
1	2	6
Lisogénicos		
6	0	2
4	1	1
3	0	4
2	5	2
1	10	9

VII.3. Evaluación de la capacidad de fagos lisogénicos para inducir virulencia en vibrios en experimentos controlados.

Se seleccionaron 19 fagos para las pruebas de reto con larvas de camarón (Tabla VII). La selección se realizó considerando las cepas que se han reportado como patógenas y los fagos que las infectan. Los tratamientos en cada caso consisten en la adición de bacteria (B) y en la adición de ambos (BF) a las unidades con larvas. Algunas de las cepas (M7.T1.A, M25.T6.A.AM, M7.T12.B, M2.T7.A y

M5.T7.A) se seleccionaron antes de la identificación adecuada de las mismas dada la susceptibilidad a fagos lisogénicos. La finalidad de la adición de fagos junto con la bacteria es la formación de lisógenos los cuales, en teoría, pueden expresar características metabólicas que podrían reflejarse en la supervivencia de las larvas. No se pudieron realizar pruebas con todos los fagos lisogénicos aislados debido a las limitaciones en la disponibilidad de larvas de camarón.

Tabla VII. Fagos y cepas de bacterias seleccionados para las pruebas de reto en larvas de camarón. Los fagos marcados con (*) son de tipo lítico que fueron agregados debido a la especie de bacteria que infectan. En las últimas dos columnas se muestran las diferencias estadísticas encontradas para cada caso, donde en cursiva y negrita se marcan los tratamientos con diferencias significativas mientras que (**) son casos anormales.

Tratamiento	Cepa	Especie	Fago	Valor F	Valor p
F1 (B/BF)	M7.T1.A	Gpo <i>V. alginolyticus/harveyi</i>	F4-T1	F(2, 6)=1,2251	p=0,35798
F3 (B/BF)	M8.T6.A.VC	<i>V. parahaemolyticus</i>	F3-T6	F(2, 6)=1,4566	p=0,30503
F12 (B/BF)	M21.T6.LV	<i>V. natriegens</i>	F8-T6	F(2, 6)=4,3155	p=0,06896
F13 (B/BF)	M25.T6.A.AM	Gpo <i>V. alginolyticus/harveyi</i>	F10-T6	F(2, 6)=1,6220	p=0,27345
24 (B/BF)	M6.T7.A	<i>V. alginolyticus</i>	24	F(2, 6)=2,0993	p=0,20363
F35 (B/BF)	M7.T12.B	Gpo <i>V. alginolyticus/harveyi</i>	35	F(2, 6)=8,3199	p=0,01861
F41 (B/BF)	M9.T9.A	<i>V. harveyi</i>	41	F(2, 6)=32,186	p=0,00062
8 (B/BF)	M2.T9.A	<i>V. harveyi</i>	8	F(2, 6)=3,3994	p=0,10303
2-5 (B/BF)	M21.T1.L.AM	<i>V. harveyi</i>	F7-T1	F(2, 6)=2,9191	p=0,13019
2 (F/BF)	M7.T1.L2	<i>V. harveyi</i>	F2-T1	F(2, 6)=17,788	p=0,00301**
6 (B/BF)	M2.T7.A	N.I.	6	F(2, 6)=0,33306	p=0,72918
5 (B/BF)	M2.T7.L	<i>V. harveyi</i>	5	F(2, 6)=3,1512	p=0,11601
34 (B/BF)	M7.12.A	<i>V. parahaemolyticus</i>	34	F(2, 6)=6,7052	p=0,02954**
12 (B/BF)	M21.T6.L.BL	<i>V. azureus</i>	F12-T6	F(2, 6)=5,5983	p=0,04247**
9 (B/BF)	M2.T12.L	<i>V. alginolyticus</i>	9	F(2, 6)=2,2517	p=0,18641
17 (B/BF)	M5.T7.A	<i>Vibrio sp</i>	17	F(2, 6)=4,5024	p=0,06394
18 (B/BF)	M5.T7.B	<i>V. alginolyticus</i>	18*	F(2, 6)=0,38536	p=0,69591
20 (B/BF)	M5.T9.A	<i>V. alginolyticus</i>	20*	F(2, 6)=,98473	p=0,42674
F8-2 (B/BF)	M21.T2.L	<i>V. parahaemolyticus</i>	F8-T2*	F(2, 6)=,26679	p=0,77446

Se realizaron cuatro experimentos utilizando larvas obtenidas de diferentes lotes de producción, por lo que la calidad de las mismas presentó variaciones. Para el primer experimento se obtuvieron larvas de buena calidad y se probaron tres bacteriófagos sin obtener diferencias significativas en ninguno de los casos (Figura 21: a – c). En el tratamiento 8 B y BF (con la cepa de *V. harveyi*) algunas de las larvas presentaron excitación de cromatóforos (Figura 22-a) que se considera como signo de vibriosis, y desplazamiento más lento comparado con el grupo control. En el

segundo experimento la calidad de larvas fue considerada la mejor de todos los experimentos, se probaron cuatro bacteriófagos sin obtener diferencias significativas (Figura 21: d – g). Se observaron algunas irregularidades en las larvas en el caso de los tratamientos 5 y 18 (*V. harveyi* y *V. alginolyticus* respectivamente) incluyendo movimiento más lento, tracto vacío (Figura 22d), malformaciones de apéndices (Figura 22f), daño en espinas lobulares (Figura 22c) y alimento interrumpido (Figura 22d). El tratamiento 5BF presentó la supervivencia más baja entre todos los tratamientos del experimento cuatro y los signos de vibriosis aunque no se detectaron diferencias significativas. Para el caso particular del experimento tres, se obtuvieron larvas de baja calidad por lo que los valores de supervivencia en general fueron bajos. Se detectó contaminación por protozoarios en la microalga suministrada lo que tuvo un impacto negativo en la supervivencia del grupo control registrándose porcentaje de supervivencia menor a 10% y abundantes protozoarios tipo paramecium y vorticela (Figura 22e). Curiosamente en todos los tratamientos (excluyendo 12B) la supervivencia fue superior al 20% (Figura 21: h – k) registrándose tres casos con diferencias significativas (Figura 21: j – k) de los cuales de mayor interés es el tratamiento 12BF (Figura 21j) donde la diferencia se debe al alto valor de supervivencia cuando está presente el fago. Se observaron algunas larvas con alimento interrumpido y cromatóforos excitados (tratamientos 2B/BF y 2-5B). En los tres casos es difícil afirmar algo debido al bajo porcentaje de supervivencia del grupo control. En el último experimento se trabajó con larvas de buena calidad obteniéndose porcentajes de supervivencia generales cercanos al 60% (Figura 21: l – s). Se examinó el comportamiento de ocho fagos obteniéndose diferencias significativas en los tratamientos F35BF y F41BF, tratándose en ambos casos de cepas distintas de *V. harveyi*. Se presume que la disminución en la supervivencia se debe a la presencia del bacteriófago. En ambos casos se observaron larvas con tracto colapsado (Figura 22g), tracto vacío o con alimento interrumpido que presentan movimiento lento comparado con el grupo control. De manera contraria, en el tratamiento 24BF (*V. alginolyticus*), se observó un porcentaje de supervivencia superior al grupo control, sin embargo la diferencia no fue significativa estadísticamente.

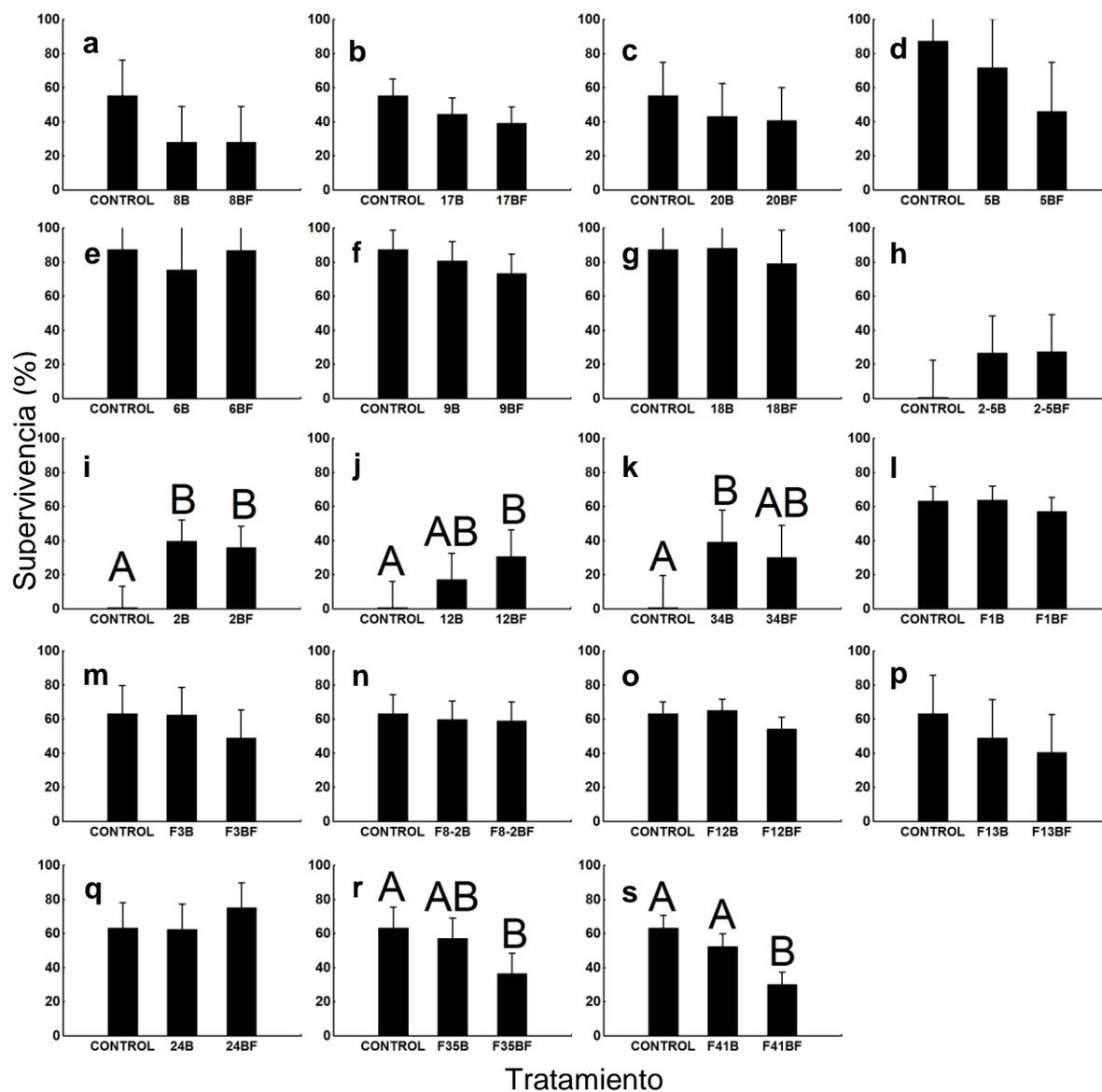


Figura 21. Resultados de los experimentos de inducción de virulencia en vibrios. En el eje Y se muestra el porcentaje de supervivencia de acuerdo a los tratamientos ubicados en el eje X. Se observaron 5 casos con diferencias significativas (i, j, k, r y s) donde denominaciones A, B y AB se utilizan para distinguir entre los tratamientos (A es diferente de B pero igual a AB). Nótese que en los casos j, k y l las diferencias posiblemente no deberían de considerarse debido al inusualmente bajo porcentaje de supervivencia del grupo control. En las figuras r y s se observa que las diferencias se deben al tratamiento de bacteria con fago. En ambos casos la cepa usada fue *V. harveyi*.

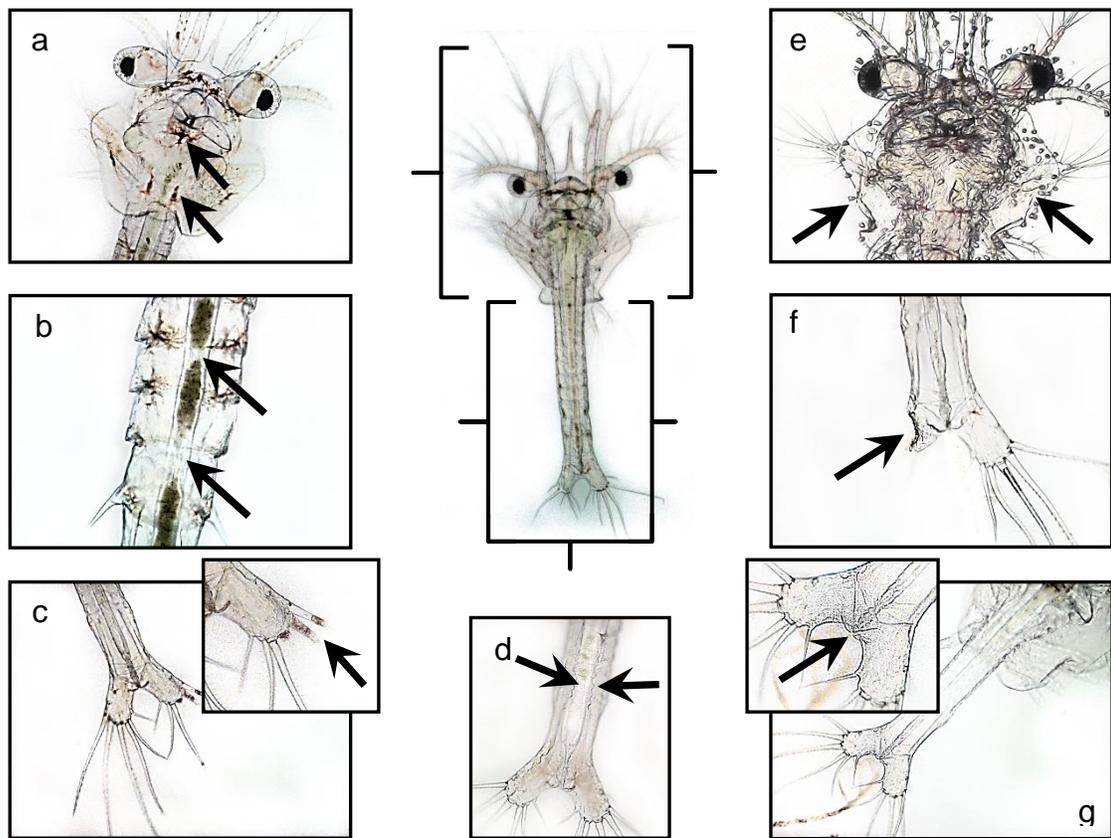


Figura 22. Daños observados en las larvas de camarón que pueden ser considerados como signos de vibriosis (excepto figura e). Dónde: a – excitación de cromatóforos (donde los puntos marcados corresponden a acumulación de bacterias), b – alimento interrumpido, c – daño en espinas lobulares, d – tracto vacío, e – colonización por protozoarios, f – daño en apéndices y g – tracto contraído o colapsado.

VIII. DISCUSIÓN

VIII.1. Incidencia de vibrios y presencia de fagos en el cultivo larvario de camarón.

La diversidad de vibrios que se observó en los dos ciclos fue de ocho especies identificadas mediante métodos moleculares. Entre estas especies se encuentran *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* que son patógenos conocidos en camaronicultura por provocar vibriosis, *V. proteolyticus* que se ha reportado presente en camarones dañados y *V. alginolyticus*, que generalmente se considera como probiótico pero también se ha reportado presente en casos de vibriosis incluyendo los trabajos de Regpipat *et al.*, (1998); Liu *et al.*, (2004) quienes describen a *V. alginolyticus* como patógeno de larvas de camarón blanco *L. vannamei* debido al hecho de ser aislado de larvas con signos de vibriosis sistémica incluyendo daños en apéndices, anorexia y musculatura opaca. De manera contradictoria, en el mismo trabajo de Regpipat *et al.* (1998), *V. alginolyticus* también está considerado como probiótico refiriéndose al mismo en calidad de cepa con características benéficas. En otros reportes, esta bacteria es considerada un buen probiótico y se sugiere su uso como tal en los cultivos de larvas de camarón (Austin *et al.*, 1995; Garriques & Arevalo, 1995; Gomez-Gil *et al.*, 2002). Es importante mencionar que las especies más comunes en este estudio fueron *V. alginolyticus*, con 12 cepas y *V. harveyi*, con seis cepas, encontrándose al primero casi en todos los estadios de desarrollo y a *V. harveyi* en menos estadios, lo que concuerda con lo observado por Vanderberghe *et al.*, (1999) quienes realizaron un estudio acerca de vibrios relacionados con las larvas, postlarvas y juveniles del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* encontrando mayor abundancia de *V. alginolyticus*, seguido por *V. harveyi* en lo que se refiere a estadios de larvas y postlarvas (antes de postlarva 20).

También se encontraron especies relativamente nuevas, como *V. azureus*, *V. brasiliensis* y *V. tubayashi* de las cuales todavía se cuenta con poca información, especialmente sobre *V. azureus* que fue aislado de las costas de Japón en el año 2009 y no se ha reportado como parte de microbiota en tanques de camaronicultura

teniendo incierta la importancia del mismo aunque es posible que se produzca cierta confusión debido al alto parecido genético con *V. harveyi*, además de ser también una bacteria luminiscente (Vanderberghe *et al.*, 2003; Yoshisawa *et al.*, 2009). Para el caso de *V. brasiliensis*, éste fue descrito en el año 2003 y se ha reportado como parte de la microbiota en cultivos de camarón sin encontrarse asociado a casos de vibriosis. Una característica interesante de esta bacteria es su alto parecido con *V. tubayashi* en lo que se refiere a secuencias parciales del gen 16s donde se reporta hasta un 98.8% de similitud siendo el último un patógeno conocido de la ostra de Pacífico *Gasostrea gigas*, de larvas de moluscos bivalvos y de algunos crustáceos incluyendo al camarón (Thompson *et al.*, 2003).

De las especies que no pertenecen a la familia Vibrionaceae se encontraron tres cepas siendo dos de ellas *Salinococcus roseus* y una, *Acetobacter pasteurianus*. Es interesante que no se cuente con mucha información acerca de estas bacterias y no hay reportes de aislamiento de las mismas en acuicultura. *S. roseus* es una bacteria halófila moderada de familia Staphylococcaceae y siendo gram-positiva, naturalmente se debería de excluir la posibilidad de ser aislada en las placas de TCBS, debido a que dicho medio contiene compuestos que inhiben el crecimiento de bacterias gram-positivas (y un pH alcalino, de 8.6). Sin embargo, *S. roseus* tolera pH en intervalo de 6 a 9, y un amplio rango de salinidades (0.9 a 25% de NaCl) por lo que fue posible su crecimiento en el medio a pesar de otros agentes selectivos que por razones desconocidas, posiblemente relacionadas a las características metabólicas de la bacteria, no tuvieron efecto esperado. Por otro lado, la bacteria crece mejor en medio de agar marino que es menos selectivo y con los valores más adecuados de salinidad y pH, estando cerca de los óptimos de *S. roseus* (pH: 8; NaCl: 10%) además se ha aislado anteriormente de muestras de ambientes hipersalinos y de agua de mar (Wang *et al.*, 2008) por lo que es probable que sea de muestras obtenidas de los tanques de cultivo de larvas de camarón. Debido a que se detectó a *S. roseus* en placas de TCBS (lo que se confirmó mediante resiembras en TCBS, descartando que fuera por contaminación en agar marino) se efectuó una búsqueda bibliográfica acerca de la capacidad de crecimiento de *S. roseus* en

diferentes medios, específicamente en TCBS pero no se encontró ningún reporte que respaldara lo observado en este estudio. Adicionalmente se repitió el proceso de la identificación de las secuencias de ambas cepas considerando la posibilidad de una identificación errónea pero, nuevamente se obtuvo un 99% de similitud con la secuencia de la cepa MS21 de *Salinicoccus roseus* aislada de una muestra de agua de mar y un porcentaje similar o poco menor con otras secuencias de *S. roseus* excluyendo completamente la posibilidad de otro tipo de bacteria. En el caso de *A. pasteurianus*, es una alfaproteobacteria gram-negativa capaz de tolerar concentraciones elevadas de ácido acético y oxidar etanol, es capaz de crecer en TCBS y agar marino (Cleenwerck *et al.*, 2002), pero no se cuenta con reportes de su aislamiento de muestras de invertebrados marinos ni de agua de mar, además solamente se aisló una cepa por lo que podría ser un contaminante de procedencia incierta ya que comúnmente se aísla de ambientes terrestres, como de materia orgánica en descomposición (vegetales o carne fermentada). Cabe mencionar que en el caso de la aplicación de probióticos, estos primero pasan por un proceso de fermentación donde participan bacterias específicas (no se proporcionó información acerca de las mismas) por lo que puede ser posible que la presencia de *A. pasteurianus* esté relacionada con la producción y manejo de probióticos lo que descartaría la opción de que sea un contaminante adquirido durante el aislamiento.

Es importante mencionar que el aislamiento de vibrios en medio TCBS tiene sus limitaciones las cuales están ligadas directamente a las características del mismo. El Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) es un medio selectivo ampliamente usado y recomendado para aislamiento y purificación de vibrios que originalmente fue diseñado para aislar *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* (Kobayashi *et al.*, 1963; Nakanishi, 1963) que contiene elementos clave, como tiosulfato y citrato de sodio que junto con sales de bilis inhiben el crecimiento de bacterias gram-positivas y coliformes. Sin embargo, se ha reportado que otras bacterias son capaces de crecer en este medio incluyendo algunas cepas de *Staphylococcus*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Aeromonas* y *Shewanella* lo que significa que en el caso de estudios de cuantificación de vibrios totales puede haber sesgo en los

números debido a la inclusión de algunas especies que no son vibrios, como en el presente trabajo donde dos cepas que fueron identificadas como *Aeromonas* sp y una como *Acetobacter pasteurianus*. Otro detalle importante radica en que el crecimiento de algunos vibrios puede ser afectado negativamente o hasta inhibido incluyendo especies como *V. vulnificus*, *V. penaeicida*, *V. cincinnatiensis*, *V. metschnikovii* y *V. hollisae*. Esto se debe a que algunas características del medio (como pH) y componentes del mismo no son igualmente aprovechados por bacterias mencionadas (Gomez-Gil & Roque, 2006), de las cuales, *V. vulnificus* y *V. penaeicida* se consideran patógenos de importancia en camaronicultura ya que se han encontrado presentes en los camarones con signos de vibriosis avanzada (Costa *et al.*, 1998; Lemonnier *et al.*, 2006). Considerando lo arriba mencionado se puede suponer que es posible que algunos de los vibrios presentes en los tanques de cultivos no se aislaron debido a las limitaciones características del medio de cultivo usado, agar TCBS. Por lo que en general puede haber dos fuentes de sesgo en datos de la incidencia de vibrios, la primera por la cuantificación de especies que no son vibrios y la segunda, por la posibilidad de que falten datos de vibrios no aislados pero potencialmente presentes en las muestras.

De los datos obtenidos mediante el sistema de multipuebas BIOLOG se observan tres grandes grupos metabólicos los cuales prácticamente se dividen en subgrupos de *V. alginolyticus* y un grupo relativamente alejado del mismo (*Acinetobacter* y *Sphingomonas*) el cual posteriormente se identificó mediante secuenciación parcial del gen 16s como grupo de *Acetobacter* y *Salinococcus*. El segundo grupo de *V. alginolyticus* en este caso presenta complicaciones en su identificación y algunas cepas se identificaron a nivel género (y erróneamente) como *Pseudomonas* y *Aeromonas* (que posteriormente fueron identificados dentro del grupo de *V. tubayashi*). El tercer grupo contiene a la mayoría de los *V. alginolyticus* identificados con 100% de similitud (referente a la base de datos de BIOLOG) y las 4 cepas de *V. harveyi* identificadas positivamente sin embargo no se observa una diferenciación clara en la agrupación de los mismos. Además, de las 54 cepas que se analizaron, solamente 13 fueron identificadas positivamente (con 100% de

similitud) pero al comparar la identificación de las mismas por BIOLOG con identificación vía genética se observaron diferencias importantes en la composición de las especies. Es por eso, entre otros factores (como la actualización de las bases de datos de BIOLOG) que la identificación de vibrios a nivel especie mediante BIOLOG no se debería considerar como el método definitivo en casos similares debido a que los resultados son imprecisos y en caso de tener un número considerable de cepas implica un costo mayor otorgando beneficio mínimo comparado con la identificación genética. Por otro lado, esta herramienta puede ser considerada de gran utilidad en el caso de la caracterización del perfil bioquímico de las cepas ya identificadas en conjunto con otras pruebas de caracterización de diferentes aspectos del metabolismo microbiano. Dichas herramientas actualmente se utilizan para describir cepas con potencial de ser una nueva especie ya que incluso la identificación genética presenta complicaciones. Tal es el caso de las especies *V. brasiliensis*, *V. hepatarius* y *V. azureus* ya que en un principio fueron identificadas como *V. harveyi* o *V. tubayashi* teniendo muy pocas diferencias entre las secuencias por lo que se efectuaron extensivas pruebas bioquímicas permitiendo establecer características fundamentales (principalmente utilización y producción de distintas sustancias) que pueden definir una nueva especie (Vanderberghe *et al.*, 2003; Yoshizawa *et al.*, 2009).

La identificación usando secuencias parciales del gen 16s resultó ser mucho más eficiente e, indudablemente de mayor precisión que el método de multipuebas BIOLOG antes mencionado. Sin embargo también presenta problemas, debido a que los vibrios en general tienen la región 16s bastante conservada además de que la misma se está usando para diferenciar cada vez un número mayor de vibrios (que incrementa con la frecuente adición de especies nuevas). Una prueba de esto es la agrupación de especies-tipo de *V. brasiliensis* con *V. hepatarius* en el mismo cluster al igual que el caso de *V. parahaemolyticus* con *V. proteolyticus* y la aparición de *V. alginolyticus* y *V. natriegens* en grupos relativamente distantes de sus respectivas especies-tipo. La mayoría de las secuencias de vibrios fueron muy similares complicando la identificación de las mismas a nivel especie dado a que el nivel de

similitud con las secuencias de la base de datos GeneBank fue superior al 96%. Por lo mismo se utilizó la herramienta de árboles de distancia (usando método Neighbor-Joining) proporcionada por el BLAST para comparar las secuencias muy cercanas y facilitar la identificación de las muestras aunque no siempre se obtenía un resultado satisfactorio. Es interesante observar que algunas cepas fueron identificadas como *V. tubayashi*, *V. brasiliensis* y *V. azureus* ya que éstas son especies relativamente nuevas y presentan mucha similitud genética con grupos de *V. harveyi* y *V. alginolyticus* (Thompson *et al.*, 2003; Yoshisawa *et al.*, 2009). Considerando estas complicaciones, se recomienda trabajar de preferencia con secuencias más grandes y realizar secuenciaciones de otras regiones y genes, tales como 23s, *hsp60*, *recA*, *gyrB*, y la región de espacio intergénico entre 16s y 23s para una identificación mucho más precisa aunque el costo en general sería mayor (Nishibuchi, 2006). Los genes mencionados contienen regiones con mayor variabilidad comparado con el gen 16s y se emplean para diferenciar especies y cepas muy relacionadas dentro del género *Vibrio*. El gen 23s y la región 16s-23s contienen regiones con una variación importante por lo que se consideran de mayor utilidad para discriminar a nivel de cepa (Lan & Reeves, 1998; Chun *et al.*, 1999; Heidelberg *et al.*, 2000). Para el caso del gen *recA*, éste, según Thompson *et al.* (2004); resulta muy útil para la identificación a nivel especie debido a que las similitudes entre secuencias de diferentes especies son de 83 a 99% mientras que en el caso del 16s son más de 98%, resultando este gen de mucha utilidad para separar especies como *V. brasiliensis*, *V. tubayashi* y *V. harveyi* que se han reportado como problemáticas debido a la escasa variabilidad entre secuencias (alrededor de 1-2% con 16s). Kwok *et al.* (2002), proponen el uso de secuencias parciales del gen *hsp60* de alrededor de 600 pb como herramienta alternativa al 16s para diferenciar especies de vibrios teniendo una importante la variabilidad inter-específica de 18 a 29% mientras que la variabilidad entre cepas es de 0 a 4%. El gen *gyrB* es de particular importancia para investigaciones donde sea necesario diferenciar entre *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* debido a que las secuencias son idénticas en un 86.8% comparado con aproximadamente el 99% en caso de secuencias del gen 16s (Le Roux *et al.*, 1999).

Otro de los problemas pero de carácter técnico es la amplificación de los productos de PCR ya que si no resultan de buena calidad, la secuenciación obtenida no será confiable, tal y como se observó en el caso de 8 muestras (R9, R14, R16, R30, R32, R35, R37 y R39) que se secuenciaron en ambas direcciones. Las muestras mencionadas comprenden 16 secuencias, de las cuales lamentablemente ni la mitad de sus bases tienen calidad necesaria, lo que se reflejó en serias complicaciones al momento de la alineación debido a que no cumplen con el criterio mínimo para la misma, es decir no coinciden en 20 bases por lo que en el caso de la mitad de estas secuencias la alineación fue imposible por lo que se optó por la identificación utilizando cada secuencia por separado, bajando considerablemente el éxito de una identificación satisfactoria. Cabe mencionar que la identificación de las primeras 7 bacterias secuenciadas resultó problemática debido a que las secuencias fueron de calidad media (50-60% de bases de calidad) además de ser fragmentos relativamente cortos (aproximadamente 900 pb), lo que está directamente relacionado con la concentración del producto amplificado. Para el caso de estas siete bacterias, después de correr los geles, las bandas se observaron muy tenues indicando una baja concentración del producto, por lo que se considera altamente probable que la sensibilidad de la secuenciación resultó ser baja (Gomez-Gil & Roque, 2006).

Los resultados no muestran una tendencia clara que explique o relacione las fluctuaciones en la incidencia de los vibrios con la mortandad de las larvas de camarón. Esto se debe principalmente a que en los tanques muestreados no se presentaron casos severos de vibriosis o mortandad, excepto por el tanque 1 del segundo ciclo de producción, siendo éste, solamente uno de los 6 tanques monitoreados, lo que significa que se cuenta con pocos casos contrastantes. En el primer ciclo los tanques en los que se registró la mayor cantidad de vibrios (tanques 9 y 12) no fueron considerados problemáticos en su manejo y no presentaron incidentes de mortandad sugiriendo que altas cantidades de vibrios no necesariamente tienen que estar ligados a casos de vibriosis. Sin embargo, en el tanque 1 del segundo ciclo de producción se observaron los números más altos de

vibrios de los tres tanques del ciclo y se reportaron constantes problemas en el manejo incluyendo elevada turbidez del agua, retraso en el desarrollo de las larvas (hasta 3 estadios), anorexia y comportamiento errático de las mismas y al final de los muestreos este tanque fue descartado debido a las mortandades elevadas. Esto puede implicar varios factores relacionados con las poblaciones de vibrios así como factores característicos del manejo de los tanques de cultivo. En los casos donde se observaron cantidades elevadas de vibrios pero no se registraron casos de mortalidades (al menos durante el periodo de los muestreos) es factible considerar la posibilidad de que no se presentaron las condiciones adecuadas para que se produzca un caso de vibriosis o alguna enfermedad como tal. Para casos como el presente, Lightner & Redman (1998), mencionan que una enfermedad en acuicultura (vibriosis, síndrome de la mancha blanca, etc.) es el resultado final de interacciones complejas entre tres componentes principales: el organismo (camarón), su entorno y el patógeno, por lo que el resultado esperado de las mismas puede cambiar según las alteraciones en alguno o en los tres factores. Las características del hospedero (en ese caso larvas de camarón) pueden variar (especie, estadio de desarrollo, condición nutricional, etc.), el patógeno puede presentar variaciones (puede ser tipo bacteria, protozooario, fúngico o viral) y también el ambiente varía de ser cercano al ideal (para el camarón) o favorable para el desarrollo del agente patógeno, por lo que, el hecho de que se detecte un patógeno conocido en una muestra no necesariamente equivale al brote de la enfermedad relacionada. Lo que significa que bajo ciertas condiciones (por ejemplo, un ambiente saludable para el camarón) el organismo hospedero y su patógeno potencial pueden coexistir sin efectos adversos detectables. Una prueba de esto es que la presencia de *V. harveyi* en cuatro tanques (2, 7, 9 y 12) no ha sido relacionada con algún caso de vibriosis. Cabe mencionar que se aislaron pocas cepas de *V. harveyi* y aunque no se sabe qué proporción representan en la abundancia total de vibrios, se puede suponer que debido a la relativamente poca frecuencia de aislamiento, la cantidad o la virulencia de dichas cepas no fue suficiente como para que se produjera un incidente de vibriosis. Esto puede reforzarse con lo observado por Amaro *et al.* (1995), que demostraron que existe una relación fuerte entre la incidencia de la enfermedad en cuestión y las

poblaciones de patógenos en el agua. Los autores (Amaro *et al.*, 1995) mencionan que para que la vibriosis ocurra, se tiene que registrar un aumento significativo de especies patógenas de vibrios en conjunto con un cambio significativo en la composición de la comunidad de los mismos (favoreciendo especies patógenas). Por otro lado, cuando se observan cantidades elevadas de vibrios y mortandades masivas (tanque 1 del 2do ciclo) se tiene que considerar la importancia de la composición de la comunidad, (especialmente la presencia de especies potencialmente patógenas) y la posibilidad de que otro factor esté implicado en el incidente, en el caso de que el mismo no se pueda atribuir a la presencia de vibrios (Sung *et al.*, 1999). Los vibrios que se aislaron y fueron identificados a nivel especie incluyen a *V. harveyi* y a *V. tubayashi* siendo ambos reportados como patógenos, considerando a *V. harveyi* como el patógeno de mayor importancia y virulencia en camaronicultura (Karunasagar *et al.*, 1994; Saeed, 1995; Liu *et al.*, 1996; Austin & Zhang, 2006). Estas bacterias fueron aisladas dos veces, al principio y casi al final del ciclo, donde se empezaron a detectar problemas pero después de realizar las pruebas de inducción de virulencia en experimentos controlados, no se observó un efecto negativo en la supervivencia aunque algunas de las larvas presentaron excitación de cromatóforos, alimento interrumpido y daños en apéndices lo que se consideran como signos de vibriosis. Cabe mencionar que se sabe poco de la composición de los vibrios del tanque en cuestión ya que sólo una parte fue identificada con herramientas moleculares (además de que se evaluó la virulencia de solamente dos cepas) por lo que sería prudente considerar la posibilidad de que entre las cepas no identificadas se pueden encontrar patógenos potenciales. Es interesante notar que los signos de vibriosis se observaron también en algunas larvas retadas con cepas de *V. harveyi* aisladas de otros tanques que se consideraron de cierta manera “sanos” comparado con el tanque 1 del 2do ciclo de producción.

Otro factor o factores, que no es la presencia/virulencia de vibrios patógenos, pueden jugar un papel importante. Tal factor o factores, como se ha mencionado anteriormente, están relacionados a las variaciones en algunas de las características

del organismo y/o de su entorno, siendo este el agua de los tanques de cultivo con todas las intervenciones y tratamientos aplicados al mismo. Como se observa en los resultados, se registraron números elevados de vibrios en el agua del tanque 1 al principio del ciclo donde también se aisló la primera cepa de *V. harveyi* y *V. tubayashi*. Los vibrios (totales) fueron abundantes durante unos días hasta registrarse un decremento significativo en los números de los mismos como resultado de tratamientos con antibióticos y probióticos, sin embargo durante el pico de incidencia se registraron las primeras mortalidades de las larvas y algunos casos de retraso en los estadios de desarrollo. No se puede afirmar que las mortalidades y los problemas mencionados realmente se deban a la presencia y virulencia de los vibrios, debido a que faltaron estudios al respecto y teniendo en consideración que las enfermedades pueden ser causadas por otros agentes etiológicos, como protozoarios o microalgas, entre otros. Sin embargo, después de que se lograron controlar las poblaciones de vibrios, la calidad de las larvas, en general no mejoró, sugiriendo participación de otro factor, que en este caso puede estar relacionado con la eutrofización del medio provocado por la administración de cantidades inadecuadas de alimento. Según Hellowell, (1986); Sung *et al.* (2006), aunque los productores consideren la disminución en el porcentaje de la biomasa del alimento que se administra a las larvas conforme éstas aumentan de talla, si los organismos se encuentran bajo estrés, su actividad para alimentarse disminuye, por lo que la cantidad de alimento no consumido aumenta, determinando un deterioro en la calidad del agua debido a que el alimento no consumido favorece la proliferación de bacterias y con ello una disminución en la concentración de oxígeno. Los microorganismos responden rápidamente a tales cambios en su entorno debido a que tienen tiempos de generación cortos con lo que puede cambiar la composición de la microbiota. Se ha reportado que cuando el ambiente está sujeto a estrés, suceden dos cosas importantes: se produce un decremento en la diversidad de la comunidad microbiana y un aumento en algún grupo microbiano especializado (favorecido por los cambios), que serían los vibrios debido a que son bacterias aerobias facultativas y pueden crecer en condiciones de bajas concentraciones de oxígeno, dándoles una ventaja adaptativa sobre bacterias aerobias estrictas

(Madigan *et al.*, 1999). Este puede ser el caso del tanque 1 donde al empezar a aumentar la mortandad, el medio se sobresaturó de alimento no consumido por las larvas estresadas, hasta llegar a cambiar drásticamente las condiciones. Esto posiblemente condujo hacia un aumento significativo en la incidencia de vibrios casi al final del ciclo de producción (también se aisló la segunda cepa de *V. harveyi*) donde el porcentaje de mortandad fue considerado lo suficientemente alto como para descartar el tanque.

En términos generales, las diferencias entre el primer y el segundo ciclo de producción radican en la diferencia entre los picos de incidencia de vibrios donde para el caso del ciclo 1 el pico de mayor incidencia se observa al inicio del ciclo mientras que para el ciclo 2 se observa al final. El patrón de la incidencia de vibrios en el ciclo 1 es similar en los tres tanques lo que probablemente refleja mismas condiciones de manejo para cada caso, mientras que en el 2do ciclo se observan diferencias importantes entre los tanques, sugiriendo un manejo más personalizado o que posiblemente existan diferencias en la composición y el comportamiento de la microbiota. Un aspecto que se tiene que considerar es la adición de antibióticos ya que tiene un impacto directo sobre las poblaciones de vibrios. Se puede observar que los casos de una administración de antibióticos requieren de una importante concentración de vibrios ya que normalmente los antibióticos se utilizan como último recurso, cuando las otras medidas de control y manejo no dan resultado satisfactorio y se tiene un diagnóstico apropiado de la situación (Chávez & Higuera, 2003). En la mayoría de los tanques muestreados se puede notar una disminución en la cantidad de vibrios posterior a la adición de antibióticos sin llegar a la eliminación total de los mismos y en algunos casos los antibióticos no tuvieron el efecto deseado (como en el tanque 1). Según Roque *et al.* (2001); Le *et al.* (2005), las bacterias del género *Vibrio* se consideran reservorios y vehículos de la resistencia a antibióticos, debido a su presencia abundante en aguas costeras, a su habilidad para desarrollarse rápidamente y a su capacidad de adquirir resistencia en respuesta a la presión selectiva. Roque *et al.* (2001), estudiaron la sensibilidad de 144 cepas de vibrios aisladas de un sistema de cultivo de camarón en el Noroeste del Pacífico Mexicano a

15 antibióticos incluyendo los más comunes y encontraron que los vibrios pueden desarrollar resistencia a la mayoría de los antibióticos, teniendo mayor porcentaje de vibrios resistentes en el caso de Oxitetraciclinas (OTC) que es un antibiótico ampliamente utilizado en camaronicultura para controlar vibriosis, hepatopancreatitis necrotizante y furniculosis. Considerando estos antecedentes se puede suponer que los antibióticos no son una solución definitiva para el control de vibrios a pesar de ser considerada una de las más efectivas, debido a que se seleccionan bacterias resistentes y se modifica la composición de la microbiota lo que puede resultar en un escenario menos controlable.

Otro de los factores que puede ser de importancia considerable son los recambios parciales de agua que se realizaron en ambos ciclos como medida para mejorar las condiciones sanitarias de los tanques de cultivo. La diferencia principal entre los ciclos de producción, en cuanto a recambios de agua radica en que éstos se realizaron aproximadamente tres veces en el 1er ciclo (a la mitad y a finales del ciclo) y solamente una vez, a finales del 2do ciclo (cuando se presentó el pico de incidencia). Según lo reportado en el Boletín Nicovita (1998), los recambios de agua en los tanques de cultivo de camarón se realizan con el fin de conseguir la dilución de compuestos tóxicos, diluir la proliferación de plancton y evitar el incremento de la salinidad por efecto de la evaporación, es decir, cuando se presentan problemas en la calidad del agua. Por otro lado, no se deberían de realizar si el agua de los tanques contiene nutrientes y plancton necesario para la producción de camarones sanos e indica buenos parámetros de la calidad, además si se cuenta con un eficiente sistema de aireación. Uno de los efectos inmediatos de los recambios es la remoción de una parte de la microbiota del tanque, lo que produce estrés en la misma complicando la estabilización de los grupos especializados, que podrían resultar dominantes (Sung *et al.*, 1999). Es por esto que durante el primer ciclo de producción se observan oscilaciones en la incidencia sin tener intervalos de estabilidad relativa. De manera contrastante, en el caso del segundo ciclo de producción, se puede observar un periodo donde las variaciones en la incidencia son, en general, pocas teniendo una especie de periodo de “estabilidad” que dura

aparentemente 14 días, lo que equivale a la mitad del ciclo. Dicho evento, así como los eventos de fluctuaciones mayores, puede deberse a la respuesta de la comunidad microbiana a las perturbaciones aplicadas al sistema. Como perturbaciones se pueden considerar la adición de probióticos, antibióticos, administración de alimento y recambios de agua, entre otros factores que pueden causar impacto. Para ofrecer una posible explicación a las variaciones en la incidencia de vibrios es importante entender de qué maneras la comunidad microbiana puede responder a una perturbación. En el trabajo relativamente reciente, Alison & Martiny (2008), describen tres tipos de respuesta de la comunidad microbiana que no afectarían los procesos de un ecosistema y una respuesta que sí cambiaría el comportamiento del mismo. Un ecosistema se consideraría realmente afectado en el caso de que la perturbación sea de tal nivel o magnitud que la comunidad microbiana resulte significativamente alterada en su composición y empiece a funcionar de manera distinta (que antes de ser afectada). Pero si no pasan las dos cosas mencionadas, la microbiota puede mostrar resistencia, resiliencia y/o ser funcionalmente redundante en respuesta al disturbio. La composición microbiana se considera resistente si se mantiene similar bajo distintas condiciones, o por decirlo con otras palabras, si es difícil de alterar de su estado original. Es resiliente (la palabra “resilience” se podría traducir como elasticidad, teniendo como significado más preciso, la capacidad para recuperarse) en el caso de que la composición cambie pero se recupera rápidamente ya sea gracias al crecimiento (tiempos de generación cortos) o por adaptación fisiológica o genética. Finalmente, la composición microbiana puede cambiar en respuesta a nuevas condiciones del ambiente pero al contener taxa funcionalmente redundantes, no se verá afectado el funcionamiento del sistema. Algunos grupos microbianos (como vibrios) tienen un alto grado de flexibilidad metabólica y tolerancia fisiológica a cambios en el ambiente lo que resulta en una comunidad microbiana resistente. Estas características junto con otras que son propias de los microorganismos, como altas abundancias, amplia dispersión y crecimiento rápido, sugieren que las comunidades microbianas también son normalmente resilientes a los cambios. Además, la rápida adaptación evolutiva a través de la transferencia horizontal de

genes puede permitir a los componentes sensibles adaptarse a las nuevas condiciones, restableciendo la composición original de la comunidad, mientras que la abundancia y diversidad de las bacterias favorecen la redundancia funcional (Meyer, 1994; Fencher & Finlay, 2004). Teniendo en cuenta que la comunidad microbiana puede presentar tales respuestas a la perturbación, se puede suponer que en los tanques de cultivo de camarón, las comunidades microbianas, como los vibrios, responden de diferentes maneras a las perturbaciones de distintas magnitudes. Si se considera la importancia de las intervenciones en el sistema de tanques de cultivo (administración de cantidades inadecuadas de alimento, adición de antibióticos y recambios de agua, arriba mencionadas), se podrían definir dos casos particulares que tienen un impacto masivo: los antibióticos y recambios de agua. Bajo tales condiciones, el estrés experimentado por el sistema es sumamente alto por lo que las poblaciones de vibrios se ven alteradas drásticamente pero algunos se muestran resistentes y resilientes (elásticos) a la perturbación registrándose posteriormente valores elevados en la incidencia de los mismos, tal y como se observa en la mayoría de los tanques y principalmente en el 1er ciclo de producción donde la población de vibrios se “recupera” con el tiempo llegando a observarse otro pico de incidencia (aproximadamente a la mitad de los muestreos). Considerando lo antes mencionado, se puede decir que las poblaciones de vibrios del 1er ciclo fueron posiblemente más resistentes y resilientes al cambio, principalmente en los tanques 9 y 12, a pesar de que se realizaron ambas cosas, adición de antibióticos y recambios de agua. Esto se puede reforzar, aunque indirectamente, con el hecho de que las cepas de *V. alginolyticus* fueron aisladas a lo largo del ciclo. En el caso del 2do ciclo de producción, los antibióticos se agregaron en la primer semana y no se efectuaron recambios de agua (sino hasta el final del ciclo) por lo que los tanques fueron sometidos a estrés, observándose una disminución significativa en cantidades de vibrios (mejor reflejado en los números de vibrios por ml de agua) lo que sugiere una sensibilidad alta de los mismos hacía el cambio, sin embargo, posteriormente se observa un incremento gradual en la cantidad de vibrios hasta que se produce un segundo pico importante de incidencia, lo que puede explicarse por la resistencia y elasticidad (resiliencia) de las poblaciones de vibrios. Finalmente, al término del ciclo

se realizaron recambios junto con la adición de antibióticos, presentándose el suceso de mayor perturbación para el sistema. Esto fue reflejado en una disminución drástica en la cantidad de vibrios en un periodo muy corto (2 días) sugiriendo que la respuesta de las poblaciones de vibrios no fue ninguna de las tres (resistencia, resiliencia o redundancia funcional) por lo que se produjo un cambio significativo en la microbiota que fue corroborado de manera bastante singular: no se aisló ninguna colonia de vibrios el último día del muestreo (de los tres tanques). Regresando al caso del ciclo 2, donde se observa un periodo con menos fluctuaciones en la incidencia de vibrios en las larvas (periodo de estabilidad), se puede suponer que se debe a que la magnitud de la perturbación no fue lo suficientemente alta como para producir un cambio significativo en la composición microbiana, y, debido a que no se realizó ningún recambio, se puede considerar la posibilidad de que la microbiota se encontraba en el proceso de “estabilización natural” por lo que la incidencia de vibrios durante este periodo es relativamente baja y con variaciones menores. Por otro lado, se observaron diferencias en la incidencia entre los tanques en ambos ciclos, en el ciclo 1 el tanque 7 fue diferente del resto debido a menor cantidad de vibrios observados (aunque el patrón de la incidencia es similar con otros tanques), mientras que en el ciclo 2 se observaron diferencias más marcadas, donde el tanque 6 se diferenció del resto no sólo por tener números más bajos de vibrios, sino también por tener un patrón de incidencia distinto. Dichas variaciones podrían estar relacionadas con las características de las poblaciones de vibrios de los tanques particulares. Éstos podrían ser resistentes a los cambios en el sistema o tener composición específica, distinta del resto de los tanques (especialmente en el caso del tanque 6). Sin embargo, es evidente que las teorías y la información arriba mencionada no son suficientes para explicar tales variaciones así como algunas de las variaciones menores detectadas en los tanques y comportamiento de ciertos vibrios (las condiciones bajo las cuales algunos de los vibrios potencialmente patógenos expresan virulencia), por lo que se pretende aclarar éstas (y otras) cuestiones en función de la presencia de distintos tipos de fagos que son parte importante de la microbiota pero rara vez son considerados debido al poco

conocimiento que se tiene sobre la interacción de los mismos con las poblaciones bacterianas.

Los bacteriófagos están presentes en todos los tanques y en todas las etapas de los ciclos y, dado el comportamiento observado, se encuentran relacionados a las variaciones de vibrios de cada tanque. Como se menciona anteriormente, varias oscilaciones en los números de vibrios no parecen tener una relación con las perturbaciones que experimenta el sistema y parece que por alguna razón la incidencia de vibrios aumenta o disminuye. Esto se puede relacionar a la presencia de fagos con diferentes estrategias de ciclo de vida. Los fagos con ciclo lítico son considerados como virulentos debido a que matan su bacteria hospedera y su abundancia depende de la disponibilidad de cepas susceptibles, mientras que los fagos con ciclo lisogénico normalmente se encuentran integrados en el cromosoma bacteriano, lo que sería parecido a un caso de simbiosis, sin provocar muerte del hospedero (Madigan *et al.*, 1999). Teniendo en cuenta lo antes mencionado, sería lógico esperar detectar fagos líticos en los casos donde hay fluctuaciones en la incidencia de vibrios, y esto es justo lo que se observa en ambos ciclos, siendo más característico en el 1ro, donde los fagos líticos se encontraron con mayor frecuencia. Es importante resaltar el hecho de que los fagos líticos se observaron, casi exclusivamente, en los puntos donde los números de vibrios bajan drásticamente, otra característica interesante es la relación que parece haber entre el incremento en la mortalidad de vibrios y aumento en diversidad de fagos líticos, es decir, a mayor diversidad de fagos se observa un decremento más marcado en la incidencia de vibrios. La razón de tal comportamiento se explica por la dinámica de las interacciones de los fagos líticos con los vibrios susceptibles. Según Wommack & Colwell (2000), la densidad de los fagos está en función de la densidad de bacterias susceptibles a la infección, y si las características metabólicas y fisiológicas bacterianas son constantes, entonces más alta será la densidad de bacterias susceptibles y consecuentemente, habrá mayor densidad final de fagos. Por lo que se puede decir que en un sistema dado, el éxito de una población bacteriana también puede significar su destrucción. Esto es particularmente cierto en sistemas más

cerrados, donde las características del entorno facilitan una difusión relativamente rápida de fagos a bacterias, permitiendo establecer múltiples infecciones paralelas en poco tiempo. En efecto, mientras más densa se hace la población microbiana, más rápido puede crecer la población de fagos líticos y, finalmente se produce una disminución significativa en la cantidad de bacterias susceptibles teniendo grandes cantidades de fagos pero pocas bacterias. Es por esto que los fagos líticos se registraron después de los picos de incidencia de vibrios y no antes o en el medio, ya que su aparición es respuesta al éxito de los vibrios en el sistema. Por otro lado, según Thingstad & Lignell (1997); Wommack & Colwell (2000), la presencia de fagos con rango variable de hospederos (principalmente rango estrecho) tiene un efecto de tipo selectivo, infectando principalmente a las bacterias más comunes y exitosas. Tal selección, como consecuencia, provoca un incremento en la diversidad en las comunidades bacterianas, permitiendo infecciones por más fagos, por lo que también aumenta la diversidad de los últimos. Es posible que debido a un proceso similar, el incremento en la diversidad de los fagos líticos corresponde a una disminución en la incidencia de vibrios. Los fagos lisogénicos, a diferencia de los líticos no presentan un patrón claro, aunque se puede decir que, en general no coexisten con los líticos, son más diversos en el segundo ciclo de producción y se pueden encontrar tanto en casos de aumento como de disminución en la incidencia de vibrios. Según Breitbart *et al.* (2006), es común observar con mayor frecuencia a los fagos lisogénicos después de un evento de lisis bacteriana provocado por fagos líticos, ya que los últimos reducen drásticamente la cantidad de bacterias susceptibles, dejando viables a células que son resistentes a la infección. Dicha resistencia puede ser adquirida mediante mutación en una fracción de la población, provocando un cambio en la estructura de la pared celular alterando los sitios de reconocimiento que son utilizados por el fago, o puede estar relacionada a la presencia de un profago. Los fagos lisogénicos normalmente no provocan lisis de sus hospederos y les pueden conferir características adicionales mediante la conversión lisogénica, como aumento en el metabolismo, en la resistencia a los antibióticos, resistencia a fagos e incremento en virulencia. Éstas características pueden beneficiar al lisógeno (bacteria con un fago lisogénico estable integrado en su genoma) haciéndolo más

competitivo frente a otras especies o cepas de la misma especie asegurando su estabilización y prevalencia en el sistema. Es por esto que varios fagos lisogénicos son detectados justo después de fagos líticos (o inclusive junto) y se encuentran presentes durante los picos de incidencia de vibrios, lo último se debe a que se encuentran como lisógenos. Dos casos, los tanques 1 y 6 del 2do ciclo de producción, son de interés particular debido a que ambos presentan números similares de fagos lisogénicos, un solo caso de fagos líticos al principio del ciclo, pero el patrón de incidencia de los vibrios es completamente distinto, incluso se podría decir que son dos casos contrastantes. Una posible explicación consiste en que los fagos lisogénicos se comportan diferente en cada caso, es decir, al formar lisógenos, estos tienen tales características que para el caso del tanque 1, el efecto fue negativo (combinado con la perturbación causada por la acumulación de alimento no consumido), produciéndose un segundo pico de incidencia, mientras que en el tanque 6, después del efecto de los fagos líticos, los lisógenos fueron de alguna manera benéficos para el sistema presentándose una cierta estabilidad del mismo. Según Bossi *et al.* (2003), es posible un escenario donde los fagos lisogénicos pueden incrementar la diversidad de bacterias contribuyendo al antagonismo microbiano, esto incluye aparición de cepas capaces competir contra bacterias patógenas exitosas, reduciendo de alguna manera el impacto de las últimas. Este puede ser el caso del tanque 6 donde no se encontraron vibrios patógenos. Por otro lado, mediante la conversión lisogénica se pueden formar lisógenos que tengan ventajas respecto a otros componentes de la comunidad microbiana pero no contribuyan al antagonismo, como en el primer caso, por lo que éstos serían exitosos en el sistema y no serían eliminados fácilmente, sino se sumarían a la diversidad ya existente, incluso algunos podrían expresar virulencia (Bossi *et al.*, 2003), lo que posiblemente puede tener relación con las fluctuaciones en la incidencia de vibrios en el tanque 1 aunque es difícil afirmar algo dada la complejidad de interacciones que puede haber entre vibrios y distintos tipos de fagos, además de la influencia de otros factores, mencionados anteriormente.

Hasta ahora, el comportamiento de fagos y vibrios en los dos ciclos de producción larvaria se trató de explicar por separado y desde diferentes puntos de vista, con lo que se consigue aclarar algunas interrogantes, sin embargo sería prudente ofrecer una explicación más generalizada. Por lo que, tomando en cuenta las observaciones de Jiang & Paul (1994), sobre la proporción de fagos con distinto ciclo de replicación en diferentes ambientes, y las ideas sobre la perturbación de ecosistemas, expuestas en el escrito de Alison & Martiny (2008), se propone una hipótesis generalizada de “estabilidad de un sistema”. Su significado sería el siguiente. En ambientes donde hay frecuentes perturbaciones, siendo algunas de magnitud considerable, la microbiota no llega a establecerse y se producen constantes cambios y alteraciones en la misma (como en ambientes eutróficos), y es más común la presencia de fagos líticos (que lisogénicos), cuya estrategia es simplemente matar a la bacteria susceptible mientras ésta se encuentra disponible. Por otro lado, en ambientes, por decirlo, más balanceados o estables (como oligotróficos) donde las perturbaciones son menores, y los grupos bacterianos se encuentran establecidos o alcanzan una especie de equilibrio, es de esperarse una menor densidad bacteriana y la dominancia de fagos con ciclo lisogénico que no matan a sus hospederos. Tomando en cuenta lo mencionado, el comportamiento de vibrios y fagos durante el 1er ciclo se ajustaría al primer caso, de un sistema inestable ya que debido a las perturbaciones mayores (adición de probióticos, antibióticos y recambios de agua), las poblaciones de vibrios se encuentran en constante estrés por lo que no se pueden establecer o “normalizar” de manera natural (con perturbaciones menos frecuentes y de poca magnitud), esto a su vez promueve la presencia de fagos líticos que se encargan de destruir una parte de dicha población, pero debido a la inestabilidad de las condiciones del sistema el proceso se repite, por lo que se tienen pocos fagos lisogénicos. En el caso del 2do ciclo de producción, éste empieza como un sistema relativamente perturbado por lo que al principio se observa un pico en la incidencia de vibrios y se detectan fagos líticos, sin embargo, después la magnitud de las intervenciones disminuye dejando que la microbiota llegue a una especie de equilibrio, que dura aproximadamente la mitad del ciclo encontrándose menores cantidades de vibrios y solamente fagos lisogénicos, los cuales tienen diferente

efecto sobre las poblaciones de vibrios específicas de cada tanque provocando una disminución en la densidad de los mismos en el tanque 6 (donde no hubo casos de vibriosis). Mientras que en el tanque 1, el efecto de la perturbación debido el efecto conjunto de dos intervenciones (administración de cantidades inadecuadas de alimento y la posterior adición de antibióticos) causó una seria desestabilización en el sistema registrándose eutrofización del ambiente y, como respuesta, aumentó la cantidad y diversidad de vibrios acompañada de presencia de fagos lisogénicos que probablemente formaron diversos lisógenos competitivos sin excluir la posibilidad de inducción de virulencia ya que se observaron signos de vibriosis.

VIII.2. Caracterización de fagos

Los vibriofagos encontrados en su mayoría fueron de ciclo lisogénico lo que no fue algo esperado debido a que en sistemas inmaduros y que se someten a mucho y frecuente estrés es tardado que se establezca la microbiota por lo cual existe mucha competencia entre los diferentes vibrios y normalmente abundan los fagos líticos ayudando regular de alguna manera la población. Las primeras pruebas de aislamiento revelaron aún menos potenciales fagos líticos pero muchos lisógenos. De los fagos líticos del primer ciclo de producción todos respondieron satisfactoriamente a la prueba de estabilidad del ciclo mostrándose los mismos resultados sin aumento aparente en cantidad de bacterias resistentes. La prueba posterior que se aplicó a las bacterias resistentes mostró que no hubo conversión lisogénica lo que comprueba que el ciclo es estrictamente lítico. Según Chibani-Chennoufi *et al.* (2004), los fagos líticos estables son comunes en sistemas con microbiota no establecida y que se encuentra en constante competencia lo cual proporciona condiciones adecuadas para la relativamente prolongada presencia de fagos líticos. De estos fagos tres del primer ciclo (lisados de fagos 16, 18 y 30) y 6 del segundo (que salieron de la misma muestra con cepa blanco identificada como *V. alginolyticus*) resultaron tener efecto lítico mejor pronunciado debido a que se detectó el incremento en el halo de inhibición hasta 3 mm de radio. Esto, según Baros *et al.* (1978); Jiang & Paul (1994), puede significar que estos fagos son altamente

específicos, posiblemente con el genoma de tamaño mediano que no contiene regiones que pueden influenciar en la decisión de la ruta lítica/lisogénica pero debido a lo mismo se mantienen solamente durante el tiempo de residencia de la bacteria hospedera y en el caso de no presentarse una mutación que permita la infección de otras bacterias, estos fagos son eliminados del medio. Por otro lado los fagos líticos restantes fueron capaces de infectar en algunos casos hasta 6 bacterias adicionales. Este aumento en el rango de especificidad puede deberse a que los fagos tengan codificados los sitios de reconocimiento para las variaciones en la estructura o composición de los receptores en la superficie bacteriana ya que las bacterias afectadas fueron en su mayoría diferentes cepas de *Vibrio alginolyticus* y *V. proteolyticus* que tienen un alto grado de similitud (Kutter *et al.*, 2005; Shivu *et al.*, 2007). En el caso particular del lisado de fago 30, después de la purificación del mismo se diferenciaron 6 morfotipos de placa de lisis por lo cual se consideró la posibilidad de que los 6 son fagos distintos. Sin embargo al realizar las pruebas de rango de hospederos los 6 fagos presentaron el mismo rango de especificidad y poca variación en la efectividad del ciclo. Lo mismo se observó con los demás fagos purificados. Esto conlleva ciertas complicaciones ya que puede significar que se trata del mismo fago que por alguna razón mostró resultados distintos en la placa o tratarse de una cepa del mismo fago. Sin embargo, después de realizar la prueba de puntos simple para determinación de la actividad de los 6 fagos se observó una diferencia comparado con el resultado que muestra el lisado crudo: el lisado crudo del fago 30 se considera uno de los que tiene el mejor efecto debido a que presenta un segundo halo de inhibición, lo que no se observó en los fagos por separado, además el efecto lítico en general fue mayor (antes de concentrar) lo que significa que el efecto se debe a la mezcla de diferentes fagos. Es interesante observar que en el caso de otros fagos líticos estrictos que presentan una actividad muy marcada y que fueron purificados pero no diferenciados en más de un fago, no se observa el segundo halo de inhibición. Con base en lo anterior se puede especular que la presencia del segundo halo de inhibición tiene relación con la diversidad de fagos en el lisado.

Para el caso de los fagos con ciclo lisogénico se presentaron algunas complicaciones, siendo la principal, la dificultad de cuantificación de los mismos ya que el método tradicional de agar de doble capa con formación de UFP's contables no es aplicable al caso de los fagos con ciclo lisogénico. Esto se debe al sesgo en el número de los fagos detectables debido a que solamente se pueden cuantificar aquellos que fueron exitosamente inducidos a la lisis (Carlson *et al.*, 2004). Otro problema radica en la detección de los mismos debido a la propiedad de proporcionar resistencia a la bacteria para futuras infecciones (Guttman & Kutter, 2005). Es por esto que en etapas tempranas de detección de fagos lisogénicos no se habían detectado algunos. La complicación consiste en que los filtrados de la muestra en cuestión, no muestran actividad lítica mínima (o característica de un fago lisogénico) sobre la cepa de prueba (es decir, la muestra aparentemente no presenta fagos para la cepa) pero tienen efecto sobre otra cepa o, en algunos casos, contra la misma cepa si se repite la prueba. Lo que significa que se trata de una bacteria lisogénica que es resistente a la infección por su fago lisogénico, por lo que fue necesario realizar una prueba de lisogenia adicional. Por otro lado, las pruebas sobre la estabilidad del ciclo en el caso de lisógenos fueron de ayuda para selección de diferentes fagos lisogénicos. Se identificaron dos tipos principales, los que tienen ciclo lisogénico estricto y los que son altamente inestables. En resumen, los estrictos en este caso se liberan solo bajo condiciones desfavorables para la bacteria (que puede incluir posible daño al ADN bacteriano) que son inducidos mediante exposición a luz UV y los inestables bajo condiciones de estrés mínimas (como densidad elevada de bacterias en el medio). Según Little (2005), esto último significa que tales fagos posiblemente requieren de mayores concentraciones de proteína inhibidora de genes líticos denominada CI para prevenir la ruta lítica. Otra alternativa consiste en que la bacteria hospedera por razones desconocidas presente inestabilidad en los niveles de CI/CII (a menor concentración de CI, la proteína CII se encarga de activar la ruta lítica) lo que podría explicar el comportamiento inconsistente en la etapa de decisión entre lisis y lisogénia. Se observó un comportamiento peculiar en el caso de fagos lisogénicos 24 y 41 y sus cepas blanco (*V. alginolyticus* y *V. harvey*). En ambos casos la inducción del ciclo lítico ocurre bajo

condiciones mínimas de estrés (denso dependiente) y, contrario a lo que se espera, el efecto del fago liberado es similar a fagos líticos, dejando pocas bacterias resistentes lo que significa que ambos son fagos inestables. Adicionalmente, el fago 24 al infectar su hospedero, provoca un crecimiento diferente de la bacteria lo que puede significar que provoca cambios significativos en el metabolismo de la misma.

Es importante mencionar que realmente no se sabe el número exacto de fagos distintos ya que es posible que en varias ocasiones se aislaran los mismos fagos debido a que los intervalos entre muestreos fueron de dos (ciclo 1) o de un día (ciclo 2) y tomando en cuenta que el tiempo de residencia de un fago es normalmente superior a un día y depende de la disponibilidad de cepas susceptibles (Baros *et al.*, 1978). Para obtener resultados más exactos en cuanto a tipos de fagos y facilitar la caracterización y descripción de los mismos se recomienda realizar observaciones en un microscopio electrónico de transmisión debido a que permite la identificación de los mismos a nivel familia además de distinguir la variedad de los mismos en una muestra. Lo último es de gran utilidad en el caso de los fagos lisogénicos debido a que posibilita evaluar la pureza del lisado y establecer el número de fagos distintos en el mismo debido a que la selección y purificación presenta complicaciones.

VIII.3. Evaluación de la capacidad de los fagos lisogénicos para inducir virulencia en vibrios en experimentos controlados

Los fagos con ciclo lisogénico han sido seleccionados con base en su estabilidad, dando mayor importancia a los estables debido a que los lisógenos pueden ser potencialmente más competitivos en este caso ya que existe la posibilidad de que los genes que los fagos les confieren pueden ser de cierta manera benéficos para la bacteria acelerando el metabolismo de las mismas y proporcionando resistencia a infección por fagos (Little, 2005). Por medio de la evaluación del efecto de los fagos con ciclo lisogénico se pretendía demostrar que la lisogénia puede tener efecto sobre la supervivencia de las larvas de camarón tratadas con vibrios que se han considerado potencialmente patógenos. Teniendo como premisa que los fagos son capaces de transformar las bacterias confiriéndoles virulencia como se ha

demostrado en múltiples ocasiones con vibrios patógenos u otras bacterias (Calendar & Inman, 2005), se esperaba observar dicha transformación indirectamente, por medio de la variación en la supervivencia larvaria. Al observarse una disminución significativa en la supervivencia en larvas tratadas con fagos lisogénicos comparado con el grupo tratado con bacteria sin el fago y el grupo control se puede atribuir el efecto negativo directamente a la presencia del fago ya que los experimentos se manejaron en condiciones gnotobioticas siendo las larvas desinfectadas con dióxido de cloro previo a la administración de tratamientos. Sin embargo, en los 3 de los 4 experimentos realizados no se encontraron diferencias significativas por lo que solamente se puede mencionar que existe una tendencia general hacia la disminución en la supervivencia cuando los fagos se administran junto con la bacteria dejando que la infección y la conversión lisogénica ocurran en el medio. Sin embargo, en el último experimento realizado se observaron dos casos (lisógenos 34BF y 41BF) detectando diferencias significativas ($p < 0.05$) comparado con el grupo control. Ambos fagos lisogénicos forman lisógenos con sus bacterias blanco que fueron identificadas como *V. harveyi* y ocasionan un decremento en la supervivencia de las larvas. Un aspecto interesante es que por separado, ambos *V. harveyi* no ocasionan un descenso significativo en la supervivencia lo que sugiere que el efecto es ocasionado por la presencia del fagos, lo que coincide con algunos reportes sobre fagos lisogénicos de cepas patógenas de *V. harveyi* aislados de ejemplares de camarón blanco cultivado. Flegel *et al.* (2005), mencionan que la virulencia de *V. harveyi* es adquirida mediante bacteriófagos por lo que se debe de considerar la posibilidad de que la virulencia de otros vibrios que son patógenos en los cultivos de camarón se debe a la presencia de fagos lisogénicos. Esto tiene una implicación sobre la fagoterapia ya que hace evidente la importancia de la selección de los fagos líticos y evaluación de los fagos lisogénicos que potencialmente podrían transferir genes de virulencia o resistencia a antibióticos (Jiang & Paul, 1994; Winbauer & Suttle, 1996; Faruque *et al.*, 1999).

Otro aspecto importante a considerar es la posibilidad de otro tipo de efecto tal como el aumento en la supervivencia de las larvas. Tal es el caso de tres lisógenos:

lisógeno de bacteria no identificada (lisógeno 6BF) de *V. alginolyticus* (lisógeno 24BF) y *V. azureus* (lisógeno 12BF) los que mostraron valores de supervivencia más bajos que el grupo control en ausencia del fago y un aumento notable en la misma en calidad de lisógenos. No se tiene información sobre el comportamiento de *V. azureus* en sistemas de cultivo debido a que la especie fue descrita recientemente, sin embargo esta muestra un alto parecido a nivel genético con el grupo de *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* (Yosizawa *et al.*, 2009). Por otro lado, *V. alginolyticus* es una de las bacterias más comunes en los cultivos de camarón y está presente prácticamente en todos los estadios teniendo mayores números en estadios tempranos (Vanderberghe *et al.*, 1999) y en diferentes reportes se ha considerado tanto como patógeno como probiótico sin tomar en cuenta la posibilidad de presencia de un fago que podría ser responsable de tales atributos. En este estudio debido a las pruebas de aislamiento de fagos y pruebas de lisogéncia se sabe con certeza de que se trata de un lisógeno por lo que es igual de posible que el efecto “positivo” en la supervivencia de las larvas de camarón se deba a las características adquiridas por medio del fago. Cabe mencionar que se ha reportado que algunas cepas probióticas de *V. alginolyticus* son portadoras de fagos. Según Breitbart *et al.* (2005), los bacteriófagos no necesariamente son sólo vectores de genes de toxinas sino son capaces de proporcionar características tales como aumento en el metabolismo, resistencia a fagos y/o sustancias tóxicas secretadas por otras bacterias y aumento en la capacidad de colonización o diseminación lo que significa una mayor ventaja competitiva sobre otras bacterias. Cabe mencionar que en el caso particular del lisógeno 24BF las larvas examinadas no presentaron ningún signo de vibriosis y se comportaban de manera similar que los organismos del grupo control teniendo aproximadamente las mismas tallas y mismos estadios de desarrollo (no fueron alterados debido a la presencia de la bacteria).

IX. CONCLUSIONES

En el cultivo larvario del camarón los vibrios son abundantes y presentes a lo largo de todo el ciclo siendo *V. alginolyticus* la especie dominante seguido de *V. harveyi*.

La adición de antibióticos no necesariamente es la solución definitiva a problemas de carácter bacteriano ya que puede provocar resistencia además de ser uno de los factores de mayor estrés para el sistema afectando la microbiota.

Para identificación de los vibrios, el sistema de multipuebas BIOLOG comparado con identificación vía genética (secuencias parciales del gen 16s) es poco confiable y menos conveniente.

La mayor parte de vibriofagos líticos no son específicos siendo capaces de infectar dos o más cepas encontrándose a *V. alginolyticus* como la especie más susceptible. Lo que refuerza la observación de que la abundancia de una bacteria va acompañada de un incremento en la cantidad y diversidad de fagos capaces de infectarla.

Cuando el sistema de cultivo se encuentra relativamente inestable, los vibriofagos dominantes son líticos, mientras que en condiciones de mayor estabilidad, se observa la tendencia hacia la ruta lisogénica. Esto sugiere que la presencia de los fagos con ciclo lítico o lisogénico depende de la estabilidad del sistema.

Los fagos lisogénicos no necesariamente son vectores de virulencia, pueden tener inclusive impacto positivo al hacer más competitiva a la cepa hospedera como se observa en el caso del fago 24, sin embargo hace falta desarrollar un modelo de infección para evaluar tal fenómeno.

La virulencia de bacteria patógena *V. harveyi* se debe a la presencia de fago lisogénico que posiblemente es un vector que transferencia de los genes que aumentan su virulencia.

X. RECOMENDACIONES

Es importante considerar más factores que puedan aportar información relevante acerca del estado del sistema de cultivo. El seguimiento de los cambios en los valores de pH, salinidad, oxígeno y temperatura podría reflejar el estado de perturbación del sistema y sería de mucha utilidad para interpretar los resultados de incidencia de vibrios. También se recomienda hacer seguimiento detallado de las variaciones en las tallas de los organismos en cada muestreo para tener mayor cantidad de información que pueda ser útil en el caso de un evento de mortalidad.

Como se observó de los resultados, no se recomienda utilizar el sistema de multipuebas BIOLOG para la identificación de los vibrios a nivel especie, además de que la identificación a nivel género tampoco es exacta. Sin embargo, si se trabaja con vibrios lisogénicos y ya se cuenta con una identificación exacta de las cepas, éste sistema puede ser de mucha utilidad para caracterizar los perfiles bioquímicos de cada lisógeno y podría servir para distinguirlos con base en los cambios en el metabolismo adquiridos mediante la adquisición de genes nuevos.

La identificación de vibrios a nivel especie vía genética presenta complicaciones en el caso del gen 16s por lo que se recomienda secuenciar genes adicionales, como 23s, *hsp60*, *recA* y *gyrB* debido a que la variación que presentan éstos es mayor permitiendo una identificación más exacta.

Para obtención de resultados más completos se recomienda realizar conteos de bacterias y virus totales siguiendo el método de microscopía de epifluorescencia con el fluorocromo SYBR Gold, que es específico para ácido nucleicos. De esta manera se podrá determinar qué proporción de la microbiota total son los vibrios y vibriofagos libres.

Se recomienda profundizar estudios acerca de la capacidad de algunos fagos lisogénicos de formar lisógenos que pueden tener un efecto probiótico, así como mejorar protocolos y procedimientos de selección de fagos líticos y lisogénicos. Esto permitirá mejorar la situación y la seguridad de la fagoterapia en acuicultura. Para lo cual es necesario desarrollar un adecuado modelo de infección, lo que también implicaría la evaluación del impacto de las descargas de las aguas residuales en cuerpos de agua naturales.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abedon, S. 1989. Selection for bacteriophage latent period length by bacterial density: a theoretical examination. Microb. Ecol., 18:79-88.
- Allison, S.D. & J.B.H. Martiny. 2008. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. Natl. Acad. Sci., 105(1):11512-11519.
- Ackerman, H. 2006. Classification of Bacteriophages, 8-16. En: R. Calendar (Ed.) The Bacteriophages. Oxford University Press. New York.
- Amaro, C., E.G. Biosca, B. Fouz, E. Alcaide & C. Steve. 1995. Evidence that water transmits *Vibrio vulnificus* biotype 2 infections to eels. Environ. Microbiol., 61:1133-1137.
- Austin, B. & X-H. Zhang. 2006. *Vibrio harveyi*: A significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. Lett. Appl. Microbiol., 43:119-124.
- Austin, B., F. Stuckey, P. Robertson, I. Effendi & D. Griffiths. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalli*. J. Fish Dis., 18:93-96.
- Ausubel F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith & K. Struhl. 2002. Short Protocols in Molecular Biology, 5th Ed. John Wiley and Sons, Inc.
- Baross, J.A., J. Liston & R.Y. Morita. 1978. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus*, bacteriophages and other bacteriophages in marine samples. Appl. Environ. Microbiol., 36:492-499.

- Baticados, M.C.L., C.R. Lavilla-Pitogo, E.R. Cruz-Lacierda, L.D. de la Pena & N.A. Sunaz. 1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *Vibrio splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. Dis. Aquat. Organ., 9:133-139.
- Bossi, L., J.A. Fuentes, G. Mora & N. Figueroa-Bossi. 2003. Prophage Contribution to Bacterial Population Dynamics. J. Bacteriol., 185(21):6467-6471.
- Breitbart, M., F. Rohwer & S.T. Abedon. 2005. Phage ecology and bacterial pathogenesis, 66-91. En: M.K. Waldor, D.I. Friedman & S.L. Adhya (Eds.) Phages: Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology. ASM Press, Washington DC. U.S.A.
- Breitbart, M., J.H. Miyake & F. Rohwer. 2006. Global distribution of nearly identical phage-encoded DNA sequences. Fems Microbiol. Lett., 254:332–332.
- Brock, J.A. & B. LeaMaster. 1992. A look at the principal bacterial, fungal and parasitic diseases of farmed shrimp, 212-226. En: Wyban, J (Ed.) Proceedings of the special session on shrimp farming. W. Aquacult. Soc. Baton Rouge.
- Brock, J.A. & K.L. Main. 1994. A guide to the common problems and diseases of *Penaeus vannamei*. W. Aquacult. Soc. Baton Rouge, Louisiana. U.S.A., 241 p.
- Calendar, R. & R. Inman. 2005. Phage Biology, 18-36. En: En: M.K. Waldor, D.I. Friedman & S.L. Adhya (Eds.) Phages: Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology. ASM Press, Washington DC. U.S.A
- Carlson, K. 2004. Working with bacteriophages: common techniques and methodological approaches, 437-494. En: Kutter, E & A. Sulakvelidze. 2005. Bacteriophages: Biology and Application. CRC Press. Boca Raton, Fla.

- Chávez-Sánchez, M.C. & I. Higuera-Ciapara. 2003. Manual de Buenas Prácticas de Producción Acuícola de Camarón para la Inocuidad Alimentaria. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, SAGARPA, 67 p.
- Chen, P.K., R.V. Citarella, O. Salazar, & R.R. Colwell. 1966. Properties of two marine bacteriophages. J. Bacteriol., 91:1136-1139.
- Chibani-Chennoufi, S., A. Bruttin, M-L. Dillmann, & H. Brüssow. 2004. Phage-Host Interaction: an Ecological Perspective. J. Bacteriol., 186:3677-3686.
- Chong. L., R. Chou, R. Singh & T.M. Chao. 1983. Country reports: Singapore. P., 47-63. En: Davy, F.B. & A. Chouinard (Eds.) Fish quarantine and fish diseases in Southeast Asia. Intern. Developm. Res. Centre. Ottawa, Canada, 79 p.
- Costa, R., I. Mermoud, S. Koblavi, B. Morlet, P. Haffner, F. Berthe, M. Legroumellec & P. Grimont. 1998. Isolation and characterization of bacteria associated with *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. Aquaculture, 164:297–309.
- Egidius, E., R. Wiik, K. Andersen, K.A. Hoff & B. Hjeltnes. 1986. *Vibrio salmonicida* sp. nov., a New Fish Pathogen. Int. J. Syst. Bacteriol., 36:518-520.
- Faruque, S.M., M. Mostafizur-Rahman, Asadulghani, K.M. Nasirul-Islam & J.J. Mekalanos. 1999. Lysogenic Conversion of Environmental *Vibrio mimicus* Strains by CTX Φ . Am. Soc. Microbiol., 67(11):5723-5729.
- Flegel, T.W., T. Pasharawipas, L. Owens & H.J. Oakey. 2005. Evidence for phage-induced virulence in the shrimp pathogen *Vibrio harveyi*, 329-337. En:

Walker, P., R. Lester & M.G. Bondad-Reantaso (Eds). Diseases in Asian Aquaculture V. Fish Health Section, Asia.

Garriques D. & G. Arevalo. 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, 53–59. En: Browdy, C.L. & J.S. Hopkins (Eds) Swimming Through Troubled Water Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95. World Aquaculture Society, Baton Rouge.

Goarant, C., Y. Reynaud, D. Ansquer, S. de Decker, D. Saulnier & F. Le Roux. 2006. Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. Syst. Appl. Microbiol., 29:570-580.

Gómez-Gil, B., A. Roque, & F.A. Guerra. 2001. Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto del uso de antimicrobianos, 315-346. En: Páez-Osuna, F. (Ed.) Camaronicultura y Medio Ambiente. UNAM. México.

Guttman, B., R. Raya & E. Kutter. 2005. Basic phage biology, 29-66. En: Kutter, E & A. Sulakvelidze. Bacteriophages: Biology and Application. CRC Press. Boca Raton, Fla.

Hambly, E., & C.A. Suttle. 2005. The virosphere, diversity, and genetic exchange within phage communities. Curr. Opin. Microbiol., 8:444-450.

Hellawell, J.M. 1986. Biological indicators of freshwater pollution and environmental management. Els. Appl. Sci. Publ. Ltd., London.

- Hidaka, T. 1971. Isolation of marine bacteriophages from seawater. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 37:1199-1206.
- Ikema, M. & Y. Honma. 1998. A novel filamentous phage, fs-2, of *Vibrio cholerae* 0139. Microbiology, 144:1901-1906.
- Ishimaru, K.M., M. Akagawa & K. Muroga. 1995. *Vibrio penaeicida* sp nov. A pathogen of kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). Int. J. Syst. Bacteriol., 1:134–138.
- Jiang, S.C. & J.H. Paul. 1994. Seasonal and diel abundance of viruses and occurrence of lysogeny/bacteriocinogeny in the marine environment. Mar. Ecol-Prog. Ser., 104:163-172.
- Johnson, S.K. 1989. Handbook of shrimp diseases. Texas A & M University., 25 p.
- Kakimoto, D. & H. Nagatomi. 1972. Study of bacteriophages in Kinko Bay. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 38:271-278.
- Kar, S., R.K. Ghosh, A.N. Ghosh & A. Ghosh. 1996. Integration of the DNA of a novel filamentous bacteriophage VSK from *Vibrio cholerae* 0139 into the host chromosomal DNA. FEMS. Microbiol. Lett., 145:17–22.
- Karunasagar, I., I. Karunasagar, & R.K. Umesha. 2005. Microbial diseases in shrimp aquaculture, 121–134. En: Ramaiah, N. (Ed) Marine microbiology: Facets & Opportunities. National Institute of Oceanography, Goa. India., 188 p.
- Karunasagar, I., M.G. Vinod, M.D. Bob Kennedy, A. Vijay, A. Deepanjali, K.R. Umesh, & I. Karunasagar. 2005. Biocontrol of bacterial pathogens in

aquaculture with emphasis on phage therapy. En: Walker, P., R. Lester & M.G. Bondad-Reantaso (Eds). Diseases in Asian Aquaculture V. Fish Health Section, Asia.

Karunasagar, I., R. Pai, G.R. Malathi & I. Karunasagar. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture, 128(3-4):203-209.

Keynan, A., K. Nealson, H. Sideropoulos & J.W. Hastings. 1974. Marine transducing bacteriophage attacking a luminous bacterium. Am. Soc. Microbiol., 14(2):333-340.

Khemayan, K., T. Pasharawipas, O. Puiprom, S. Sriuriatana, O. Suthienkul & T.W. Flegel. 2006. Unstable lisogeny and pseudolysogeny in *Vibrio harveyi* Siphovirus-like phage. Appl. Environ. Microbiol., 72(2):1355-1363.

Kobayashi, T., S. Enomoto, R. Sakazaki, & S. Kuwahara. 1963. A new selective isolation medium for the vibrio group; on a modified Nakanishi's medium (TCBS agar medium). Nippon Saikinaku Zasshi, 18:387-392.

Koga, T., S. Toyoshima & T. Kawata. 1982. Morphological varieties and host ranges of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophages isolated from seawater. Appl. Environ. Microbiol., 44(2):466-470.

Kutter, E., R. Raya & K. Carlson. 2005. Molecular mechanisms of phage infection, 165-122. En: Kutter, E & A. Sulakvelidze. Bacteriophages: Biology and Application. CRC Press. Boca Raton, Fla.

Kwok, A.Y.C., J.T. Wilson, M. Coulthart, L-K. Ng, L. Mutharia & A.W. Chow. 2002. Phylogenetic study and identification of human pathogenic *Vibrio* species based on partial *hsp60* gene sequences. Can. J. Microbiol., 48:903-910.

- Lederberg, E.M. 1951. Lysogenicity of *E. coli* K-12. Genetics., 36:560 p.
- Lederberg, E.M., & J. Lederberg. 1953. Genetic studies of lysogenicity in *Escherichia coli*. Genetics., 38:51-64.
- Lemonnier, H., A. Herbland, L. Salery & B. Souldard. 2006. "Summer syndrome" in *Litopenaeus stylirostris* grow out ponds in New Caledonia: Zootechnical and environmental factors. Aquaculture., 261:1039-1047.
- Lightner, D.V. & R.M. Redman. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture., 164:201-220.
- Little, J.W. 2005. Threshold effects in gene regulation: When some is not enough. Proc. Natl. Acad. Sci., 102(15):5310-5311.
- Liu, P-C., K-K. Lee, K-C. Yii, G-H. Kou & S-N. Chen. 1996. News & Notes: Isolation of *Vibrio harveyi* from Diseased Kuruma Prawns *Penaeus japonicus*. Curr. Microbiol., 33(2):129-132.
- Liu, P-C., W. Cheng, J. Hsu & J. Chen. 2004. *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. Dis. Aquat. Organ., 61:169-174.
- Lwoff, A., & A. Gutmann. 1950. Recherches sur un *Bacillus megathérium* lysogène, 3-17. En: M.K. Waldor, D.I. Friedman, and S.L. Adhya (Eds.). Phages: Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology. ASM Press, Washington DC.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko & J. Parker. 1999. Brock. Biología de los Microorganismos. Prent. Hall. España, 1064 p.

- Meyer, J.L. 1994. The microbial loop in flowing waters. Microb. Ecol., 28(2):195-199.
- Nakai, T. & S.C. Park. 2002. Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. Res. Microbiol., 153:13-18.
- Nakai, T., R. Sugimoto, K.H. Park, S. Matsuoka, K. Mori, T. Nishioka, & K. Naruyama. 1999. Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garviae* infection in yellowtail. Dis. Aquat. Org., 37:33-41.
- Nakanishi, Y. 1963. An isolation agar medium for cholera and enteropathogenic halophilic vibrios. Mod. Med., 9:246.
- Nasu, H., T. Iida, T. Sugahara, Y. Yamaichi, K-S. Park, K. Yokoyama, K. Makino, H. Shinagawa & T. Honda. 2000. A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains. J. Clin. Microbiol., 38(6):95-1137.
- Oakey, H.J. & L. Owens. 2000. A new bacteriophage, VHML, isolated from a toxin-producing strain of *Vibrio harveyi* in tropical Australia. J. Appl. Microbiol., 89:701-709.
- Park, K.H., H. Kato, T. Nakai & K. Muroga. 1997. A virulent bacteriophage of *Lactococcus garviae* isolated from yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Dis. Aquat. Org., 29:145-149.
- Park, S.C., I. Shimamura, M. Fukunaga, K. Mori & T. Nakai. 2000. Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossidica*, as a candidate for disease control. Appl. Environ. Microbiol., 66:1416-1422.

- Payne, M., J. Oakey & L. Owens. 2004. The ability of two different *Vibrio* spp. bacteriophages to infect *Vibrio harveyi*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. J. Appl. Microbiol., 97:663-672.
- Phumkhachorn, P. & P. Rattanachaikunsopon. 2010. Isolation and partial characterization of a bacteriophage infecting the shrimp pathogen *Vibrio harveyi*. Afr. J. Microbiol. Res., 4(16):1794-1800.
- Reed P.A. & R. Francis-Floyd. 1996. *Vibrio* infections of fish. FA-31, Department of Fisheries and Aquatic Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Rengpipat S, S. Rukpratanporn, S. Piyatiratitivorakul, P. Menasveta. 1998. Probiotics in Aquaculture: A Case Study of Probiotics for Larvae of the Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). En: Flegel, T.W. (Ed) Advances in shrimp biotechnology, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.
- Ronda, C., M. Vázquez & R. López. 2003. Los bacteriófagos como herramienta para combatir infecciones en Acuicultura. R. Aquat., 18:3-10.
- Roque, A., A. Molina-Aja, C. Bolán-Mejía & B. Gomez-Gil. 2001. In vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. Int. J. Antimicro. Ag., 17(5):383-387.
- Saeed, M.O. 1995. Association of *Vibrio harveyi* with mortalities in cultured marine fish in Kuwait. Aquaculture., 136(1-2):21-29.
- Sambrook J. & D. W. Russell. 2001. Molecular Cloning: A laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

- Shivu, M.M., B.C. Rajeeva, S.K. Girisha, I. Karunasagar, G. Krohne & I. Karunasagar. 2007. Molecular characterization of *Vibrio harveyi* bacteriophages isolated from aquaculture environments along the coast of India. Environ. microbiol., 9(2):322-331.
- Smith, L.S., & A.P. Krueger. 1954. Characteristics of a new *Vibrio* bacteriophage system. J. Gen. Physiol., 38:161-168.
- Spencer, R. 1955. A marine bacteriophage. Nature., 175:160-161.
- Sung, H-H., H-C. Li, F-M. Tsai, Y-Y. Ting & W-L Chao. 1999. Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 236(2):261-271.
- Suttle, C.A. 2007. Marine viruses: major players in the global ecosystem. Nat. Rev. Microbiol., 5(10):801-812.
- Thingstad, T.F. & R. Lignell. 1997. Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand. Inter-Research Aquat. Microb. Ecol., 13:19-27.
- Thompson, F.L., C.C. Thompson, B. Hoste, K. Vandemeulebroecke, M. Gullian & J. Swings. 2003. *Vibrio fortis* sp. nov. and *Vibrio hepatarius* sp. nov., isolated from aquatic animals and the marine environment. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53:1495-1501.
- Thompson, F.L., T. Iida & J. Swings. 2004. Biodiversity of Vibrios. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 68: 403-431.

- Vandenbergh, J., F.L. Thompson, B. Gómez-Gil & J. Swings. 2003. Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. Aquaculture., 219:9-20
- Vandenbergh, J., L. Verdonck, R. Robles-Arozarena, G. Rivera, A. Bolland, M. Balladares, B. Gomes-Gil, J. Calderon, P. Sorgeloos & J. Swings. 1999. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. Appl. Environ. Microbiol., 65(6):2592-2597.
- Vinod, M.G., M.M. Shivu, K.R. Umesha, B.C. Rajeeva, G. Krohne, I. Karunasagar & I. Karunasagar. 2006. Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments. Aquaculture., 255:117-124.
- Waldor, M.K. & J.J. Mekalanos. 1996. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding colera toxin. Science., 272(5270):1910-1914.
- Wang X., Y. Xue, S. Yuan, C. Zhou & Y. Ma. 2008. *Salinicoccus halodurans* sp. nov., a moderate halophile from saline soil in China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **58**(2008):1537-1541.
- Weinbauer, M.G. & C.A. Suttle. 1996. Potential Significance of Lysogeny to Bacteriophage Production and Bacterial Mortality in Coastal Waters of the Gulf of Mexico. Appl. Environ. Microbiol., 62(12):4374-4380.
- Wollman, E. 1934. Bulletin de L'Institut Pasteur. 32:945-955. En: Clokie, M.R.J. & A.M. Kropinski. 2009. Bacteriophages Methods and protocols Volume 1: Isolation, Characterization and interactions. Humana Press. N.Y., USA. 307 p.
- Wommack, K.E., & R.R. Colwell. 2000. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 64:69-114.

Yong, W.S., B. Ong & T.E. Shua. 1979. Isolation, identification of causative agent of red boil disease in grouper (*Epinephelus salmoides*) and its control by vaccination. En: Yong, W.S & L.T. Seng. 1990. A comparative study of Vibrio infections in healthy and diseased marine Finfishes cultures in floating cages near Penang, Malaysia. Asian Fish. Sci., 3: 353-359.

Wu, J.L. & W.J. Chao. 1982. Isolation and application of a new bacteriophage, Φ ET-1, which infect *Edwardsiella tarda*, the pathogen of Edwardsiellosis. CAPD Fish. Ser., 8:8-1.

Yong, W.S. & L.T. Seng. 1990. A comparative study of Vibrio infections in healthy and diseased marine Finfishes cultured in floating cages near Penang, Malaysia. Asian Fish. Sci., 3: 353-359.

Yoshizawa, S., M. Wada, K. Kita-Tsukamoto, E. Ikemoto, A. Yokota & K. Kogure. 2009. *Vibrio azureus* sp. nov., a luminous marine bacterium isolated from seawater. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 59:1645-1649.

Zachary, A. 1974. Isolation of bacteriophages of the Marine Bacterium *Beneckeana natrigens* from Coastal Salt Marshes. Appl. Microbiol., 27(5):980-982.

<http://www.microbiologia.com.ar/virologia/procariontes.php>

<http://www.macrogen.com>

XII. APÉNDICES

Apéndice 1

Datos generales de los muestreos

Ciclo 1.

Durante el primer ciclo de producción se realizaron 9 muestreos. Se escogieron al azar los tanques 7, 9 y 12 de la sala proporcionada. El estadio máximo observado fue postlarva 9. Para el final del ciclo se intensificó la adición de antibióticos y se hicieron varios recambios de agua en los tanques como medidas de preparación para la entrega del producto (que se realizó al siguiente día del último muestreo). Aproximadamente a la mitad del ciclo se realizaron los primeros recambios de agua. La adición de antibióticos y probióticos se efectuó desde los primeros días de siembra. El alimento se proporcionó de acuerdo a talla siguiendo protocolos establecidos. Los datos se muestran en la tabla VIII.

Ciclo 2.

En el segundo ciclo los muestreos se realizaron diariamente. Se escogieron los tanques 1, 2 y 6 de la sala proporcionada. Una de las características principales de este ciclo radica en el manejo de la adición de antibióticos y frecuencia de recambios de agua que fue distinto al caso anterior debido a que antibióticos se agregaron con menor frecuencia y los recambios se realizaron aproximadamente a finales del ciclo, como respuesta al incremento en la mortalidad y baja calidad de larvas en algunos tanques de cultivo, especialmente el tanque 1 que presentó problemas de mortalidad elevada y retraso en estadios de desarrollo (observaciones directas, no se cuenta con datos). Dicho tanque fue desechado al día 29 del inicio del ciclo ya que no se pudo recuperar después de efectuar medidas necesarias. Los datos se muestran en la tabla IX.

Tabla VIII. Datos generales sobre el primer ciclo de producción larvaria. M se refiere al estadio de desarrollo Mysis y PL a Postlarva.

FECHA	MUESTRA	ESTADIOS GRAL	OBSERVACIONES
23/02/2009	1	Nauplio	-
24/02/2009		Zoea 1	-
25/02/2009	2	Zoea 2	-
26/02/2009		Zoea 2 - 3	-
27/02/2009	3	Zoea 3	-
28/02/2009		M1	-
01/03/2009		M1-M2	Antibiótico
02/03/2009	4	M2-M3	Recambio
03/03/2009		M3-PL1	-
04/03/2009	5	PL1-PL2	Recambio
05/03/2009		PL2-PL3	Recambio, Antibiótico
06/03/2009	6	PL3-PL2	Antibiótico
07/03/2009		PL4-PL3	Antibiótico
08/03/2009		PL5-PL4	-
09/03/2009	7	PL6-PL5	-
10/03/2009		PL7-PL6	Antibiótico
11/03/2009	8	PL8-PL7	Recambio
12/03/2009	9	PL9-PL8	Recambio

Tabla IX. Datos generales sobre el segundo ciclo de producción larvaria. M se refiere al estadio Mysis y PL a Postlarva.

FECHA	MUESTRA	ESTADIOS GRAL	OBSERVACIONES
18/06/2009	1	Nauplio	-
19/06/2009	2	zoea 1	-
20/06/2009	3	zoea 2	-
21/06/2009	4	zoea 2 - 3	-
22/06/2009	5	zoea 3	-
23/06/2009	6	M1	Antibiótico
24/06/2009	7	M1-M2	Antibiótico
25/06/2009	8	M2-M3	-
26/06/2009	9	M3-PL1	-
27/06/2009	10	PL1-PL2	-
28/06/2009	11	PL2-PL3	-
29/06/2009	12	PL3-PL2	-
30/06/2009	13	PL4-PL3	-
01/07/2009	14	PL5-PL4	-
02/07/2009	15	PL6-PL5	-
03/07/2009	16	PL7-PL6	-
04/07/2009	17	PL8-PL7	-
05/07/2009	18	PL9-PL8	-
06/07/2009	19	PL10-PL9	Antibiótico
07/07/2009	20	PL11-PL10	-
08/07/2009	21	PL12-PL11	-
09/07/2009	22	PL13-PL12	-
10/07/2009	23	PL14-PL13	Antibiótico
11/07/2009	24	PL15-PL14	Recambio 25%
12/07/2009	25	PL16-PL15	Recambio 25%
13/07/2009	26	PL17-PL16	Recambio 25% y Antibiótico
14/07/2009	27	PL18-PL17	Antibiótico
15/07/2009	28	PL19-PL18	Antibiótico
16/07/2009	29	PL20-PL19	Antibiótico, T1 descartado

Apéndice 2

Bacterias identificadas en cada ciclo

Ciclo 1

Se obtuvieron 45 bacterias en total. 17 no fueron identificadas. La mayoría de *V. alginolyticus* y *V. harveyi* se encontraron en el 1er ciclo (Tabla X).

Tabla X. Cepas aisladas durante el primer ciclo de producción larvaria. La denominación N.I. aplica a cepas no identificadas debido a no fueron consideradas de importancia por no ser susceptibles a infección por fagos. Cepas marcadas con (*) fueron identificadas mediante BIOLOG.

ESTADIO	MUESTRE	TANQUE	CLAVE	ESPECIE
Zoea 1	1	7,9,12	M1.L.Y	<i>Vibrio sp.</i>
Zoea 1	1	7,9,12	M1.L.N	N.I.
Zoea 1	1	9	M1.T9.a	N.I.
Zoea 1	1	12	M1.T12.a	N.I.
Zoea 2-3	2	7	M2.T7.L	<i>Vibrio harveyi</i>
Zoea 2-3	2	7	M2.T7.a	N.I.
Zoea 2-3	2	9	M2.T9.L	N.I.
Zoea 2-3	2	9	M2.T9.a	<i>Vibrio harveyi</i>
Zoea 2-3	2	12	M2.T12.L	<i>Vibrio alginolyticus</i>
Mysis 1	3	7	M3.a	N.I.
Mysis 1	3	9	M3.b	N.I.
Mysis 1	3	12	M3.c	N.I.
Mysis 3 - PL1	4	12	M4.a	N.I.
Mysis 3 - PL1	4	12	M4.b	<i>Vibrio alginolyticus</i>
Mysis 3 - PL1	4	12	M4.a2	N.I.
Mysis 3 - PL1	4	12	M4.b2	N.I.
PL2-PL3	5	7	M5.T7.a	<i>Vibrio sp.</i>
PL2-PL3	5	7	M5.T7.b	<i>Vibrio alginolyticus</i>
PL2-PL3	5	7	M5.T7-c	<i>Vibrio sp.</i>
PL2-PL3	5	9	M5.T9.a	<i>Vibrio alginolyticus</i>
PL2-PL3	5	9	M5.T9.b	<i>Vibrio sp.</i>
PL2-PL3	5	12	M5.T12.a	<i>Vibrio harveyi</i>
PL2-PL3	5	12	M5.T12.b	N.I.
PL3-PL4	6	7	M6.T7.a	<i>Vibrio alginolyticus</i> *
PL3-PL4	6	7	M6.T7.b	<i>Vibrio alginolyticus</i> *
PL3-PL4	6	9	M6.T9.a	<i>Vibrio sp.</i> *
PL3-PL4	6	9	M6.T9.b	N.I.
PL3-PL4	6	12	M6.T12.a	<i>Vibrio alginolyticus</i>
PL3-PL4	6	12	M6.T12.b	N.I.
PL3-PL4	6	12	M6.T12.c	<i>Vibrio alginolyticus</i>
PL6-PL7	7	7	M7.T7.a	N.I.
PL6-PL7	7	9	M7.T9.a	<i>Vibrio proteolyticus</i>
PL6-PL7	7	9	M7.T9.b	<i>Vibrio alginolyticus</i>
PL6-PL7	7	12	M7.T12.a	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
PL6-PL7	7	12	M7.T12.b	<i>Vibrio sp.</i> *
PL6-PL7	7	12	M7.T12.c	<i>Aeromonas sp.</i> *
PL8-PL9	8	9	M8.T9.a	N.I.
PL8-PL9	8	9	M8.T9.b	N.I.
PL9-PL10	9	7	M9.T7.a	<i>Vibrio brasiliensis</i>
PL9-PL10	9	7	M9.T7-b	<i>Vibrio tubayashi</i>
PL9-PL10	9	9	M9.T9.a	<i>Vibrio harveyi</i>
PL9-PL10	9	9	M9.T9.b	N.I.
PL9-PL10	9	12	M9.T12.a	<i>Aeromonas sp.</i> *
PL9-PL10	9	12	M9.T12.b	<i>Vibrio natriegens</i>
PL9-PL10	9	12	M9.T12.c	<i>Vibrio alginolyticus</i>

Ciclo 2

Se aislaron 36 cepas de las cuales se identificaron 19. Nueve fueron identificadas a nivel género teniendo una cepa inusual, *Planomicrobium* sp. y el resto siendo *Vibrio* sp.(Tabla XI)

Tabla XI. Cepas aisladas durante el segundo ciclo de producción larvaria. La denominación N.I. aplica a cepas no identificadas debido a que no fueron consideradas de importancia por no ser susceptibles a infección por fagos.

ESTADIO	MUESTREO	TANQUE	CLAVE	ESPECIE
M2-M3	7	1	M7.T1.L1	<i>Vibrio tubayashi</i>
M2-M3	7	1	M7.T1.L2	<i>Vibrio harveyi</i>
M2-M3	7	2	M7.T2.L1	<i>Vibrio brasiliensis</i>
M2-M3	7	2	M7.T2.L2	<i>Vibrio harveyi</i>
M2-M3	7	1	M7.T1.A	<i>Vibrio</i> sp.
M2-M3	7	2	M7T2.A	<i>Vibrio</i> sp.
M2-M3	7	6	M7.T6.L.1	N.I.
M2-M3	7	6	M7.T6.L.2	<i>Vibrio</i> sp.
M3-PL1	8	6	M8.T6A.VC	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
M3-PL1	8	6	M8.T6A.VO	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
M3-PL1	8	2	M8.T2.L.V	<i>Salinococcus roseus</i>
PL2-PL3	10	2	M10.T2.L.AM	N.I.
PL2-PL3	10	2	M10.T2.L.V	N.I.
PL3-PL4	11	1	M11.L.T1.1	N.I.
PL3-PL4	11	6	M11.T6.L.1	N.I.
PL3-PL4	11	6	M11.T6.L.2	N.I.
PL3-PL4	11	1	M11.T1.A.1	N.I.
PL3-PL4	11	1	M11.T1.A.2	N.I.
PL3-PL4	11	2	M11.T2.A.1	<i>Planomicrobium</i> sp.
PL3-PL4	11	2	M11.T2.A.2	N.I.
PL12-PL13	21	1	M21.T1.L.AM	<i>Vibrio</i> sp.
PL12-PL13	21	2	M21.T2.L.V	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
PL12-PL13	21	6	M21.T6.L.AM	<i>Vibrio alginolyticus</i>
PL12-PL13	21	6	M21.T6.L.V	<i>Vibrio natriegens</i>
PL12-PL13	21	6	M21.T6.L.BL	<i>Vibrio azureus</i>
PL16-PL17	25	6	M25.T6.A.AM	<i>Vibrio</i> sp.
PL16-PL17	25	6	M25.T6.A.V	<i>Vibrio</i> sp.
PL18-PL19	27	1	M27.T1.L+A.AM	N.I.
L18-PL19	27	1	M27.T1.A.V	N.I.
PL18-PL19	27	2	M27.T2.L+A.AM	N.I.
PL18-PL19	27	6	M27.T6.L.AM	<i>Vibrio alginolyticus</i>
PL18-PL19	27	6	M27.T6.L.V	<i>Vibrio</i> sp.
PL20-PL21	29	1	M29.T1.L.V	N.I.
PL20-PL21	29	2	M29.T2.L.V	<i>Salinococcus roseus</i>
PL20-PL21	29	6	M29.T6.L.V	N.I.
PL20-PL21	29	1	M29.T1.A.V	<i>Vibrio</i> sp.

Apéndice 3

Susceptibilidad de cepas aisladas a infección por fagos.

Ciclo 1.

En el primer ciclo se observan 7 especies de vibrios que son susceptibles a infección por fagos donde se tienen 10 cepas de *V. alginolyticus*, de las cuales dos (del tanque 7 y 12) son susceptibles a infección de hasta 11 fagos seguido por dos cepas más (tanque 9 y 7) que resultaron susceptibles a 6 y 5 fagos respectivamente. En conjunto, *V. alginolyticus* es susceptible a infecciones por 41 fagos. En segundo lugar pero con menos cepas y menor “rango de susceptibilidad” se encuentra *V. harveyi* que se observó en los tres tanques. Es interesante que en las cepas de los tanques 7 y 9 *V. harveyi* solamente sea susceptible a un fago mientras que en el tanque 12 puede ser infectado por tres. De las 5 cepas de vibrios no identificados, una cepa, M6.T9.A resultó susceptible a 10 fagos y en total por los vibrios no identificados se observaron 15 fagos. Las cepas no identificadas resultaron ser susceptibles a infecciones de hasta 10 fagos en dos ocasiones (tabla XII).

Ciclo 2

En el segundo ciclo de producción se identificaron menos cepas teniendo mayor número de fagos en una cepa de *Vibrio* sp. del tanque 6 (M25.T6.A.V) siendo ésta susceptible a 7 fagos, seguido por cepa no identificada del tanque 1 (M27.T1.L.AM) susceptible a 5 fagos. En general, los vibrios identificados no fueron afectados por más de 2 fagos lo que sugiere que la mayoría son específicos de su cepa blanco (tabla XIII).

Tabla XII. Lista de bacterias susceptibles a infección por distintos fagos. Las columnas corresponden a la especies de bacterias mientras que las filas son las cepas que se encontraron de cada especie. Los números representan cantidad de bacteriófagos capaces de infectar la cepa en cuestión.

Cepa	Fagos encontrados									N.I.	
	<i>Aeromonas sp.</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. brasiliensis</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. natriegens</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. proteolyticus</i>	<i>V. tubayashi</i>	<i>Vibrio sp.</i>		
M1Yodo										1	
M2.T12.L			2								
M2.T7.A											2
M2.T7.L					1						
M2.T9.A					1						
M2.T9.L											2
M4.T7.A.2			1								
M5.T12.A					3						
M5.T12.B											1
M5.T7.A											2
M5.T7.B			5								
M5.T7.C											1
M5.T9.A			6								
M5.T9.B											1
M6.T12.A			2								
M6.T12.B											10
M6.T12.C			11								
M6.T7.A			11								
M6.T7.B			1								
M6.T9.A											10
M6.T9.B											10
M7.T12.A							2				
M7.T12.B											2
M7.T12.C		1									
M7.T9.A								1			
M7.T9.B			1								
M9.T12.A		1									
M9.T12.B						1					
M9.T12.C			1								
M9.T7.A				1							
M9.T7.B										1	
M9.T9.A					1						
Total	2	41	1	6	1	2	1	1	1	15	27

Tabla XIII. Lista de bacterias susceptibles a infección por distintos fagos en el segundo ciclo de producción. Las columnas corresponden a la especies de bacterias mientras que las filas son las cepas que se encontraron de cada especie. Los números representan cantidad de bacteriófagos capaces de infectar la cepa en cuestión.

Cepa	Fagos encontrados								N.I.	
	<i>S. roseus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. azureus</i>	<i>V. brasiliensis</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. natriegens</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. tubayashi</i>		<i>Vibrio sp.</i>
M10.T2.L.V										2
M11.T1.A.1										1
M11.T1.A.2										2
M11.T1.L.1										1
M11.T6.A										1
M11.T6.L.1										2
M11.T6.L.2										1
M19.T6.L.V										2
M21.T1.L.AM									1	
M21.T2.L.V										1
M21.T6.L.AM			1							
M21.T6.L.BL				1						
M21.T6.L.V							1			
M25.T6.A.AM										3
M25.T6.A.V										7
M27.T1.A.V										2
M27.T1.L.A.AM										5
M29.T2.L.V	1									
M27.T6.L.AM			1							
M27.T6.L.V										1
M29.T1.L.V										3
M7.T1.A										4
M7.T1.L.1								2		
M7.T1.L.2							2			
M7.T2.A										1
M7.T2.L.1					1					
M7.T2.L.2							2			
M7.T6.A.1										1
M7.T6.A.2										1
M8.T2.L.V	1									
M8.T6.A.VC								2		
Total	2	2	1	1	4	1	2	2	18	24

Apéndice 4

Secuencias de cepas de nucleótidos obtenidas mediante la secuenciación de productos de PCR utilizando oligonucleótidos para las regiones variables del gen ribosomal 16S.

Secuencia: R1

Gen: 16S

Especie: *Vibrio alginolyticus*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1356

```
TGCAGTCGAG CGGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAG
GAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAAGAGGGGGACC
TTCGGGCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTACCAAGGCGACGATCCCT
AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTCAGTCGTG
AGGAAGGTGGTGTCTTAATAGCGTCATTCTGTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGTTTGTAAAGTCAGATGTG
AAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGA
AAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAG
CCGTGGCTTTTCGGAGCTAACCGTTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAACAACTCAAATGAATTGACGG
GGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAAC
TTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTT
GGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACCTCCAGGGAGACTGCCGGT
GATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGC
ATACAGAGGGCGGCCAACTTGCGAAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGAC
TCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT
```

Secuencia: R2

Gen: 16S

Especie: *Vibrio harveyi*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1357

ATGCAGTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGGACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTA
GGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAAACCATTGGAAAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGAC
CTTCGGGCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTACCAAGGCGACGATCCC
TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGT
GAGGAAGGTGGTGTAGTTAATAGCTGCATTACTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTTGTTAAGTCAGATGTG
AAAGCCCGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGGCGGCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGA
AAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAG
CCGTGGCTTTCGGAGCTAACCGGTTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAACCAATGAATTGACGG
GGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTTGTGACATCCAGAGAAC
TTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTT
GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGT
GATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGC
ATACAGAGGGCGGCCAACTTGCGAAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGAC
TCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT

Secuencia: R3

Gen: 16S

Especie: *Vibrio alginolyticus*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1357

ATGCAGTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGGACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTA
GGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGAAAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGAC
CTTCGGGCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTACCAAGGCGACGATCCC
TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGT
GAGGAAGGTGGTGTAGTTAATAGCTGCATTACTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTTGTTAAGTCAGATGTG
AAAGCCCGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGA
AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAG
CCGTGGCTTTCGGAGCTAACCGGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTTCGC AAGATTA AAACTCAAATGAATTGACGG
GGGCCCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTTGTGACATCCAGAGAAC
TTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTT
GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACCTCCAGGGAGACTGCCGGT
GATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGC
ATACAGAGGGCGGCCAACTTGCGAAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGAC
TCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT

Secuencia: R4

Gen: 16S

Especie: *Vibrio alginolyticus*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1366

TGCAGTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAG
GAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACC
TTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTACCAAGGCGACGATCCCT
AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGTCGTG
AGGAAGGTGGTGTAGTTAATAGCTGCATTACTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGA
AAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAA
AGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGC
CGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGCAAGATTAATAACTCAAATGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACT
TTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAAGTCCAGGGAGACTGCCGGTG
ATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCA
TACAGAGGGCGGCCAACTTGCGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACT
CCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGATCAGA

Secuencia: R6

Gen: 16S

Especie: *Vibrio spp.*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1357

ATGCAGTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGGACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTA
GGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGAAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGAC
CTTCGGGCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTACCAAGGCGACGATCCC
TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGT
GAGGAAGGTGGTGTAGTTAATAGCTGCATTACTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTTGTAAAGTCAGATGTG
AAAGCCCGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGA
AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAG
CCGTGGCTTTCGGAGCTAACCGGTTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAAACTCAAATGAATTGACGG
GGGCCCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTTGTGACATCCAGAGAAC
TTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTT
GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGT
GATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGC
ATACAGAGGGCGGCCAACTTGCGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGAC
TCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT

Secuencia: R8

Gen: 16S

Especie: *Vibrio spp.*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1358

TGCAGTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAG
GAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACC
TTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTACCAAGGCGACGATCCCT
AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTG
AGGAAGGTGGTGTAGTTAATAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGA
AAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAA
AGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGC
CGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAAAGATTAAAACCTCAAATGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACT
TTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGGCCAGCGAGTAATGTCGGGAAGTCCAGGGAGACTGCCGGTG
ATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCA
TACAGAGGGCGGCCAACTTGCGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACT
CCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCG

Secuencia: R10

Gen: 16S

Especie: *Salinicoccus roseus*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1362

ATACATGCAGTCGACGCGCGGATCAGGAGCTTGCTCCTGTGACGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCT
GCCCATCAGACTGGGATAACCACGGGAAACCGTGGCTAATACCGGATAATCCTTTTCCACACAGGTGGGAAAAGTTGAAAAG
GCGGTCTTTTGGCTGTCACTGATGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTTGTTGGTGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGA
TGCCTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
AATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGT
CAGGGAAGAACGCCGACGGGAGTAAGTCCCGTGGGTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGGCGGTTTCGTTAAGTCTGA
TGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGCGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGGAATTCCAT
GTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGT
GCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTT
TCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAAACCTCAAAGGAATT
GACGGGGACCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTC
TGACCACCCTGGAGACAGGGTTTCCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGAT
GTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCATTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGG
TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGAC
AGGTTACAAAGGGCAGCTAAGCCGCGAGGCCAAGCGAATCCATAAACTGTTCTCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAACTC
GACTCCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATC

Secuencia: R11

Gen: 16S

Especie: *Acetobacter pasteurianus*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1370

ATACATGCAGTCGAGCGCATGAAATTATTTGATTCTCTTCGGAGTGTGACGATAATGGAATGAGCGGCGGACGGGTGAGT
AACACGTAGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCGTGAAACGCGAGCTAATACCGGATAACACTTTTCATCTCCT
GATGAGAAGTTGAAAGGCGGCTTTTGCTGTCACTTACAGATGGGCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCT
TACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACCGG
GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATC
GTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACTATAGTAAGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGC
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCTCGCAGGCG
GTTCTTTAAGTCTGATGTGAAATCTTACGGCTCAACCGTAAACGTGCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGG
AGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCCACTCTCTGGTCTGT
AACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCT
AGGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTG
AAACTCAAAGAATTGACGGGGGCCGACACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA
GGTCTTGACATCCTCTGAACACTCTAGAGATAGAGTTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTC
AGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCAC
TCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA
CACGTGCTACAATGGATGGAACAAAGGGAAGCGAACCCGCGAGGTCAAGCAAATCCACAAAACCATTCAGTTCGGAT
TGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA

Secuencia: R12

Gen: 16S

Especie: *Vibrio harveyi*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1357

TGCAGTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAG
GAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATACCTTCGGGTCAAAGAGGGGGACC
TTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCT
AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTG
AGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGA
AAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAA
AGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGC
CGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAAAGATTAAAACCTCAAATGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACT
TTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTG
GGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGGCCAGCACTTCGGGTGGGAAGTCCAGGGAGACTGCCGGTGA
TAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCAT
ACAGAGGGCTGCCAAGTTCGAGAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTC
CGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATC

Secuencia: R12

Gen: 16S

Especie: *Vibrio natriegens*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1356

TGCAGTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAG
GAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACC
TTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCT
AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGTCGTG
AGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGA
AAGCCCAGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAA
AGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGC
CGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGCAAGATTAATAACTCAAATGAATTGACGGG
GGGCCCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTTGTGACATCCAGAGAAC
TTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTT
GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACCTCCAGGGAGACTGCCGGT
GATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGC
ATACAGAGGGCGGCCAACTTGCAGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGAC
TCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT

Secuencia: R13

Gen: 16S

Especie: *Vibrio natriegens*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1356

TGCAGTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAG
GAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACC
TTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCT
AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGTCGTG
AGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGA
AAGCCCAGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAA
AGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGC
CGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGCAAGATTAATAACTCAAATGAATTGACGGG
GGGCCCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTTGTGACATCCAGAGAAC
TTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTT
GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACCTCCAGGGAGACTGCCGGT
GATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGC
ATACAGAGGGCGGCCAACTTGCAGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGAC
TCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT

Secuencia: R14

Gen: 16S

Especie: *Vibrio alginolyticus*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 732

```
CTCTACCTCGGAATAGCATTGAAATGGGCAGGATAGAGTACTGTCGAGGGGGGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAAT
GCGTAAAGATCTGAAAAGAATTCCTTTGTATAAGTCGTCCCCGCGGACGCGACATGGATACTCAGATGCGATATGGGGGG
CAGCAAACAGTCAGAGCTACCCCTCGTCGTCCACTCCGTGAAGGATGTTTAATTGGAGGTTGGTGCCGGAGCCGTGGGTT
TCGGAGCTAACGCTTAAGTAGACCCCCGGGGAGTACGGTCGCAAGAATAAAAATCAAATGAACCACGGGGGCCCCAGG
ACGGGTGGGGCCCTTCATAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTTTTGACATCCAGAGAATTTCCAGAGAGG
GATTGGTGCCTTCGGGAACTTTGAGACAGGTCCCGCATGGCTGTTCTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGGGAAGTCCC
ACAAAGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACCTCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACGGGAG
GAAGGGGGGGAGGACGTCAATTCTTCATGGCCCTTCCGGGTAGGGTTACACACGTGTTACAATGGGGCATAACAGAGGGCG
GCCAACTTGCAAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTGGTAGTCCGGATTGGAGTCTACAACCTCGACTCCA
```

Secuencia: R15

Gen: 16S

Especie: *Vibrio spp.*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1356

TGCAGTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAG
GAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACC
TTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTACCAAGGCGACGATCCCT
AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTG
AGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGA
AAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAA
AGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGC
CGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCCGCTGGGGAGTACGGTCCGAAGATTAATAACTCAAATGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACT
TTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTG
GGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTG
ATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCA
TACAGAGGGCGGCCAACTTGCGAAAGTGAGCGAATCCAAAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACT
CCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT

Secuencia: R16

Gen: 16S

Especie: *Vibrio hepatarius*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 914

```
TTAAAAAGCACTTCATTTGCCTTTACGACCAGAAAAAACCCTCGGCTACTCCGGGCCCTGCAGCCGCGGAATACGGA
AGGGTCGGGGGTATTAGGAAATACTGGGGTTAAAGCGCTTGCAGGTGGGTTTGTATTTCAGATGTGAAGCCCGGGGC
TCAACCCTCGGAATTGCATTTTAAAACTGGCAGACTAGAGTCCTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAAG
GTGTAGATATATGAAAAATACCGATACGTATGCTACCAGCTGGACCGATAGTACACTTAGATGTGAAAGTAGGGGAGCAA
ACAGAGTTAGATACCCTCCTAGTCCATGCATTAACGATGTCTAATTTAAGGTGGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAG
CTAACGTGTTAAGTAGACCGCTGGGGAGTTCGGTCGCAAGATTAAACTCAAATTAATTGACGGGGGCCGACAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTAATTAGATGCAACGGGAAGAACCTTACTTACTCTTACATCCAGCGAACTTCCAGAGATGGAT
TGGTGCCTTAGGGAAGTGTGAGGCAGGTGATGCATTGCTCTTCTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGAGGAGTCCCGCA
ACGAGCGCATCCTTTTTCTTTTTTGGCCGGGAGTAATGTCGGGTACTCCAGGGAGACTGCCGTTGATAAACGGAGGAA
GGTGGGAGGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTTCGAGTAGGGCTACACACGTGTACAATGGCGCATACAGAGGGCGGCC
AACTTGCGAAAGTGAGCGAATCCAAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATGGAGTCTGCAACTCGACTCCACGAAGTCGAAAT
GG
```

Secuencia: R17

Gen: 16S

Especie: *Vibrio spp.*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1357

TGCAGTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAG
GAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACC
TTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCT
AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTG
AGGAAGGTGGTAGTGTTAATAGCACTATCATTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGA
AAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAA
AGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGC
CGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGCAAGATTAATAACTCAAATGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACT
TTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTG
GGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAAGTCCAGGGAGACTGCCGGTG
ATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCA
TACAGAGGGCGGCCAACTTGCGAAAGTGAGCGAATCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACT
CCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATC

Secuencia: R18

Gen: 16S

Especie: *Vibrio alginolyticus*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1352

TCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAAT
TGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGG
GCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTG
GTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC
AATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAA
GGTGGTAGTGTAAATAGCACCATCATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCC
CGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGT
GGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAATACTCAAATGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACTACTCTTGACATCCAGAGAACTTTC
CAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGT
TAAGTCCGCAACGAGCGCAACCTTATCCTTGTGGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACCTCAGGGGAGACTGCCGGTGATA
AACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATA
AGAGGGCGGCCAACTTGCGAGAGTGAGCGAATCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCA
TGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCG

Secuencia: R19

Gen: 16S

Especie: *Salinicoccus roseus*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1360

ACATGCAGTCGAACGCGGGATCAGGAGCTTGCTCCTGTGACGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTG
CCCATCAGACTGGGATAACCACGGGAAACCGTGGCTAATACCGGATAATCCTTTTCCACACAGGTGGGAAAGTTGAAAGG
CGGTCCTTTTGGCTGTCAGTATGGATGGGCTGCGGCGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCCACCAAGGCGACGAT
GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
ATCTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTC
AGGGAAGAACCCGACGGGAGTAAGTCCCGTGGGTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTCGTTAAGTCTGAT
GTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGAAAACCTGGCGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCATG
TGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGTG
CGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTT
CCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTGAAAACCTCAAAGGAATTG
ACGGGGACCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAAATCTTGACATCCTCT
GACCACCCTGGAGACAGGGTTTCCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATG
TTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCATTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGTT
GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACA
GGTTACAAAGGGCAGCTAAGCCGCGAGGCCAAGCGAATCCATAAAACTGTTCTCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAACTCG
ACTCCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATC

Secuencia: R21

Gen: 16S

Especie: *Vibrio alginolyticus*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1357

TGCAGTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAG
GAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACC
TTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCT
AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTG
AGGAAGGTGGTGTAGTTAATAGCTGCATTACTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGA
AAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAA
AGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGC
CGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGCAAGATTAATAACTCAAATGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTTGTGACATCCAGAGAACT
TTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAAGTCCAGGGAGACTGCCGGTG
ATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCA
TACAGAGGGCGGCCAACTTGCGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACT
CCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATC

Secuencia: R21

Gen: 16S

Especie: *Vibrio alginolyticus*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1357

ATGCAGTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTA
GGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGAAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGAC
CTTCGGGCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTACCAAGGCGACGATCCC
TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGT
GAGGAAGGTGGTGTAGTTAATAGCTGCATTACTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTTGTAAAGTCAGATGTG
AAAGCCCGGGCTCAACCTCGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGA
AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTGTGGCCTTGAG
CCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCTGGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAACCTCAAATGAATTGACG
GGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAA
CTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGT
TGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGG
TGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCG
CATAAGAGGGCGGCAACTTGCAGAAAGTGAGCGAATCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGA
CTCCATGAAATCGGAATCGCTAGTAATCGTGATCAG

Secuencia: R22

Gen: 16S

Especie: *Vibrio harveyi*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1366

ATGCAGTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTA
GGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGAAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGAC
CTTCGGGCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTACCAAGGCGACGATCCC
TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGT
GAGGAAGGTGGTGTAGTTAATAGCTGCATTACTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTTGTAAAGTCAGATGTG
AAAGCCCGGGCTCAACCTCGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGA
AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAG
CCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCTGGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAACCTCAAATGAATTGACG
GGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAA
CTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGT
TGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGG
TGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCG
CATAAGAGGGCGGCAACTTGCAGAAAGTGAGCGAATCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGA
CTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGATCAG

Secuencia: R24

Gen: 16S

Especie: *Vibrio parahaemolyticus*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1365

GTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAA
TTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTTGAAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCG
GGCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCT
GGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA
CAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGA
AGGTAGTGTAGTTAATAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAA
GCCCCGGGCTCAACCTCGGAATTGCCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGGAGGGGGGGGTAGAATTTCAGGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGAAGATCTGAAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATG
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTT
GAGCCGTGGGCTTTCCGAGCTAACCGGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAATAACTCAAATGAATTG
ACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGA
GAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAA
TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGGCCAGCGAGTAATGTCGGAACTCCAGGGAGACTGC
CGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATG
GCGCATAACAGAGGGCGGCCAACTTGCGAAAGTGAGCGAATCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACT
CGACTCCATGAAGTCTGGAATCGCTAGTAATCGTGATC

Secuencia: R25

Gen: 16S

Especie: *Vibrio harveyi*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1367

CATGCAGTCGAGCGGAACGAGTTAACTGAACCTTCGGGGAACGTTAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCT
GGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCAATTGGAACGATGGCTAATACCGCATAATAGCTTCGGCTCAAAGAGGGGGA
CCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTACCAAGGCGACGATCC
CTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
ATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCAG
TGAGGAAGGCGGAGTCGTTAATAGCGGCCTCGTTTGACGTTAGCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGT
GAAAGCCCAGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTAGGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCG
AAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGA
GCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGAGTACGGTTCGCAAGATTA AAACTCAAATGAATTGACG
GGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAA
CTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGT
TGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGG
TGATAAACCGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCG
CATACAGAGGGCAGCAACTTGCGAAAGTGAGCGAATCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGA
CTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGATCAGAA

Secuencia: R27

Gen: 16S

Especie: *Vibrio parahaemolyticus*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1356

TGCAGTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAG
GAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACC
TTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCT
AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTG
AGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGA
AAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAA
AGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGC
CGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGCAAGATTAATAACTCAAATGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACT
TTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTG
GGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGGCCAGCGAGTAATGTCGGGAAGTCCAGGGAGACTGCCGGTG
ATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCA
TACAGAGGGCGGCCAACTTGCGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACT
CCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT

Secuencia: R28

Gen: 16S

Especie: *Vibrio azureus*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1369

TGCAGTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAG
GAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTTGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACC
TTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCT
AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTG
AGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGA
AAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAA
AGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGC
CGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGCAAGATTAATAAACTCAAATGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACT
TTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTG
GGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGGCCAGCGAGTAATGTCGGGAAGTCCAGGGAGACTGCCGGTG
ATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCA
TACAGAGGGCGGCCAACTTGCAGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACT
CCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGATCAGAAT

Secuencia: R29

Gen: 16S

Especie: *Vibrio tubayashi*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1481

TGCAGTCGAGCGGAAACGAGTTAACTGAACCTTCGGGGAACGTTAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTG
GGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATAGCTTCGGCTCAAAGAGGGGGAC
CTTCGGGCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCC
TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTCAGCAGT
GAGGAAGGCGGAGTCGTTAATAGCGGCCTCGTTTGACGTTAGCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTTGTTAAGTCAGATGTG
AAAGCCCGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTAGGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGA
AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAG
CCGTGGCTTTCGGAGCTAACCGGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAGATTAATAAACTCAAATGAATTGACGG
GGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTTGTGACATCCAGAGAAC
TTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTT
GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGT
GATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGC
ATACAGAGGGCAGCCAACCTTGCGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGAC
TCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCG
TCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAAAGAAGTGGGTAGTTAACCTTCGGGAGGACGCTCACCACCTTGTGG

Secuencia: R31

Gen: 16S

Especie: *Vibrio spp.*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1519

CATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTAACTGAACCTTCGGGGAACGTTAACGGCGTCGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGC
CTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTTGAAAACGATGGCTAATACCGCATAATAGCTTCGGCTCAAAGAGGGG
GACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTACCAAGGCGACGAT
CCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACCGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGC
AGTGAGGAAGGCGGAGTCGTTAATAGCGGCCTCGTTTACGTTAGCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCA
GCCGCGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGAT
GTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGG
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATG
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTT
GAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAACCTCAAATGAATTGA
CGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTTTGACATCCAGAG
AACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGAACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAA
TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGACTGC
CGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATG
GCGCATAACAGAGGGCAGCCAACTTGCAAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACT
CGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG
CCCGTACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAAAGAAGTGGGTAGTTAACCTTCGGGAGGACGCTCACCACTTTGTGGTTCAT
GACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCCT

Secuencia: R33

Gen: 16S

Especie: *Vibrio spp.*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1490

```
CATGCAGTCGAGCGGAAACGAGTAACTGAACCTTCGGGGAACGTTAACGGCGTCGAGCGGCGACGGGTGAGTAATGCC
TGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATAGCTTCGGCTCAAAGAGGGGG
ACCTTCGGGCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTACCAAGGCGACGATC
CCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
TATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTTAAAGTACTTTACGA
GTGAGGAAGGCGGTGTCGTTAATAGCGGCCTCATTTGACGTTAGCTGCAGAAGAAGCACGGGCTAACTCCGTGCCAGCAG
CCGGCGGTAATACGGGAGGGTGCGGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAG
ATGTGAAAGCCCGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTCA
GGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGA
TGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCC
TTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACCGGTTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAATACTCAAATGAATT
GACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAG
AGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAA
ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGACTG
CCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGCGCATAACAGAGGGCAGCCAACCTTGCGAAAGTGAGCGAATCCAAAAAGTGCGTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAAC
TCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC
GCCCCGCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAAAGAAGTGGGTAGTTTAACTTCGGGAGGACGCTCACCACCTTGTGGTTCA
TGAC
```

Secuencia: R34

Gen: 16S

Especie: *Vibrio spp.*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1479

TGCAGTCGAGCGGAACGAGTTAACTGAACCTTCGGGGAACGTTAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGG
GAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATAGCTTCGGCTCAAAGAGGGGGACC
TTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCT
AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGCACAATAAGCCCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTATAGTACTTTCAGGAGGA
AGGAAGGGTGCGGACTTAATAGCTGCGGTATTTGACGTTAGCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGA
AAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAA
AGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGC
CGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGCAAGATTAATAACTCAAATGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTTTGACATCCAGAGAACT
TTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTG
GGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGGCCAGCGAGTAATGTCGGGAAGTCCAGGGAGACTGCCGGTG
ATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCA
TACAGAGGGCAGCAACTTGCAGAAAGTGAGCGAATCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACT
CCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGT
CACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAAAGAAGTGGGTAGTTAACTTCGGGAGGACGCTCACCACTTTGTGG

Secuencia: R36

Gen: 16S

Especie: *Vibrio brasiliensis*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1479

ACACATGCAGTCGAGCGGAAACGAGTTAACTGAACCTTCGGGGAACGTTAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAAT
GCCTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATAGCTTCGGCTCAAAGAGG
GGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACG
ATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGCAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCA
GCAGTGAGGAAGGCGGAGTCGTTAATAGCGGCCTCGTTTGACGTTAGCTGCAGGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGGTGGTTTGTAAAGT
CAGATGTGAAAAGCCCGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAAT
TTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACAC
TCAGATGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTG
TGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGAAATGAAACTCAAT
GAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACTACTCTTGACA
TCCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGT
GTGAAATGTGGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGGCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGG
AGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGC
TACAATGGCGCATAACAGAGGGCAGCCAACTTGCGAAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGGCTCGTAGTCCGGATCGGAGTC
TGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
CACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAAAGAAGTGGGTAGTTAACCTTCGGGAGGACGCTCACCACCTTGT
GGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGT

Secuencia: R38

Gen: 16S

Especie: *Vibrio brasiliensis*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1479

CATGCAGTCGAGCGGAAACGAGTTAACTGAACCTTCGGGGAACGTTAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCC
TGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATAGCTTCGGCTCAAAGAGGGGG
ACCTTCGGGCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTACCAAGGCGACGATC
CCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
TATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTTAAAGTACTTTACGA
GTGAGGAAGGCGGAGTCGTTAATAGCGGCCATCGTTTGACGTTAGCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCA
GCCGCGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGAT
GTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGG
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATG
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTT
GAGCCGTGGCTTTTCGGAGCTAACCGGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGGATTAACCTCAAATGAATTGA
CGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTTTGACATCCAGAG
AACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTTCGGGAACCTTCGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAA
ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGTTGCCAGCGAGTAATGTCGGAACCTCCAGGGAGACTG
CCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGCGCATAACAGAGGGCAGCCAACCTTGCAGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAAC
TCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC
GCCCCTCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAAAGAAGTGGGTAGTTAACCTTCGGGAGGACGCTCACCACTTTGTGGTTCA
TACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGT

Secuencia: R40

Gen: 16S

Especie: *Vibrio brasiliensis*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1518

TACACATGCAGTCGAGCGGAACGAGTTAACTGAACCTTCGGGGAACGTTAACGGCGTCGAGCGGGACGGGTGAGTAAT
GCCTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATAGCTTCGGCTCAAAGAGG
GGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACG
ATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGCAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCA
GCAGTGAGGAAGGTATCGTAGTTAATAGCTGCGGTATTTGACGTTAGCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAG
CAGCCGCGGTTAATACGGAGGGGTTGCGAGGCGTTAAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAA
GTCAGATGTGAAAGCCCAGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGTAGAA
TTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAGATACTGACAC
TCAGATGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCTACTTTGGAGGTTG
TGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGAAAGATTAAAACCTCAAT
GAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACA
TCCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGT
GTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGGCCAGCACTTCGGGTGGGAACCTCCAGGGAG
ACTGCCGTTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTA
CAATGGCGCATACAGAGGGCAGCCAACCTTGGCAGAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTG
CAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA
CACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAAAGAAGTGGGTAGTTAACCTTCGGGGGGACGCTCACCCTTTGTGG
TTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGC

Secuencia: R41

Gen: 16S

Especie: *Vibrio tubayashi*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1480

TGCAGTCGAGCGGAAACGAGTTAACTGAACCTTCGGGGAACGTTAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTG
GGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATAGCTTCGGCTCAAAGAGGGGGAC
CTTCGGGCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCC
TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCAGT
GAGGAAGGTGGTGTGTTAATAGCGGCATCATTGACGTTAGCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTTGTTAAGTCAGATGTG
AAAGCCCGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTAGGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGA
AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAG
CCGTGGCTTTCGGAGCTAACCGGTTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAGATTAATAAACTCAAATGAATTGACGG
GGGCCCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTTGTGACATCCAGAGAAC
TTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTT
GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGT
GATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGC
ATACAGAGGGCAGCCAACCTTGCGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGAC
TCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCG
TCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAAAGAAGTGGGTAGTTAACCTTCGGGAGGACGCTCACCACCTTTGTGG

Secuencia: R42

Gen: 16S

Especie: *Vibrio natriegens*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2011.

No. de bases: 1517

CATGCAGTCGAGCGGAAACGAGTTAACTGAACCTTCGGGGAACGTTAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCC
TGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATAGCTTCGGCTCAAAGAGGGGG
ACCTTCGGGCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATC
CCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
TATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTACGCA
GTGAGGAAGGTATCGTAGTTAATAGCTGCGGTATTTGACGTTAGCTGCAGAAGAAGCACCGGGCTAACTCCGTGCCAGCA
GCCGCGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGAT
GTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTCAGG
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATG
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTT
GAGCCGTGGCTTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAACCTCAAATGAATTGA
CGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGA
GAACTTTCCAGAGATGGAATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAA
ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGTTGCCAGCACTTCGGGTGGGAACTCCAGGGAGACTGC
CGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATG
GCGCATAACAGAGGGCAGCCAACCTTGCAGAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACT
CGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG
CCCGTACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAAGAAGTGGGTAGTTAACCTTCGGGGGACGCTCACCACTTTGTGGTTCAT
GACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCC

Secuencia: RO-10

Gen: 16S

Especie: *Vibrio harveyi*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2010.

No. de bases: 960

```
CATTGCCCCACCTTCTGCGGCTGGTTAACGAGAGGGAAAGAGGGGGACCTTCGGGCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAG
GTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACT
GGAAGTGAACACCGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCA
TGCCGCGTGTGTAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTGGTGTAGTTAATAGCTGCATTA
CTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGGGTAATACGACGCCGCGACTTCCCCTCA
TCTCACCACCGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCCTGTCTCCCGAAGGGGGAACGCCGATCTCTCGGGTT
GTTAGGGGATGTCCAGACCTGTTAAGGTTCTTCGCGCTGCTTCTCATTAAATTCATAAGCTCCACCGCTTGTGCGGTTCC
TCTTTAATCCNTTGACCTTCATTCTTGCCATCGTACTCCCCAGGCGNGAGTGCCTAACGCATTAGCTACAGCACTAAAG
GGCGGATACCCTCTAACACTTACCCTCATCGTTTACGGTTGTGTACTACCACGACATCTAATCTTGATTTGCTTCCCAC
GCTCCCCGCTTTANCGTCAATACACACCAGAGATCATCCTTCCCCCTGGTGTCTCTACATCTCTACGCATTCCATTC
CTACCGTGGCTACTCTCCCTACTCTCCCGCACTACGTTTCTCTATTTCTATCGACCTCCACCGGCTGAGCCCCGGCG
CCTCTTCATCAGA
```

Secuencia: RO-11

Gen: 16S

Especie: *Vibrio spp.*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2010.

No. de bases: 974

```
AATCATTGATGGCTTATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCT
AGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA
CTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGC
CATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTGGTGTAGTTAATAGCTGCAT
TACTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGGCTAATACGACTGCGCGGGACTTGCCC
GTCAGCTCACGACCCGAGCTGACAACAACCATGCACCACCTGTCACCCTGTCCCCCGAAGGGGGAACGCCCCGATCTCTC
GGTTTGTAGGGGATGTCCAGACCTGTAAAGTTCTTCCCGTTGTTTCTCATTAAATAAAAATGCTCCACCTTTGTGCGG
GCCCCGTTAATTCCTTGAATTCATTCTGCCTGTTGTTCTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGATAGCTATAGCCAC
TAAGGGGCAGATACCCTCTAACTCTTATCACTCTCGGTTTTACGGTTGTGGAATACCGGGGCATCATAATCTTTGATTTG
CTCCACAACGCTTTTCGGGTCATAGCGGTCAGTTAAAGAACAAGAGCCGCATTGCCCCCTGGAGTTCCCCTACATCTCTA
CACATTGCACTCCTACACGTGCAACTCTCTCTCTCCCGCACTCACCTCCTCCTGTTTTCCAACGACCTCCCACCGGC
TGAGCCTCGCGCCCTCTCATCACACTTCACTGAAC
```

Secuencia: RO-12

Gen: 16S

Especie: *Vibrio alginolyticus*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2010.

No. de bases: 874

GCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA
GGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCG
GGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTGGTGTAGTTAATAGCTGCATTACTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCAC
CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGGGTATACGATCTTTGCGGTCTTATTGTGTTTCTATTGACTTCTGTGAACAACCAT
GACCCACCTGTCTGGGGCCGAAACGAATGGGGCTTGCCCATCTCTCGGGTAGGCATGGCATGTCAAGATCAGGCAAGGT
TCTTCGCCTCTCTTCTAATTAACACACACACACACACACATTTACCCGCATGTGCGAGTCTATTTCAATTACTTTTCAGTTTCACTCTGG
CGAGCGTACTCGGTGGGCGGAGTGGTAATGCATTAGCCACAGGACTAGAGGGCTGATACCCTTAACATTCTCACTATTC
GTTGAGTNCTAGGACTACCCCGGATATATAATTCCGGTTTGCTCTCCACTCGTCTTCGCGGCTAATAGACAATTAAGGAT
TAGCAGAAGTGCCTAGAGCTACTGGTGTCTCTGCATTTCTAGTCATTGCGCGACTACACCTCGCAACCTCCGCTTCTC
CTCTCCTACAACT

Secuencia: RO-13

Gen: 16S

Especie: *Vibrio spp.*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2010.

No. de bases: 386

```
CATTGGAACGATGGCTAATACCGCATAATAGCTTCGGCTCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCC  
CAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCAC  
ACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAG  
CCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCAGTGAGGAAGGTGGATGTGTTAATAGCGCTT  
TCATTTGACGTTAGCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCGGGGTAAAAAAGGAA
```

Secuencia: RO-14

Gen: 16S

Especie: *Vibrio alginolyticus*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2010.

No. de bases: 982

GAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGC
GACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACT
TTCAGTCGTGAGGAAGGTGGTGTAGTTAATAGCTGCATTACTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTG
CCAGCAGCCGGGGCTAATACGACGGTGCGGGACTCATTGCGGATTGCAACTGTCATTCTGGGTACACGCATGACCTGTCT
GTCTGGCGCCCCAACGAATGGGGCCCGCCCTATCTCTGGTTTGTGAGGGATGTCAATGCTCATCTTTTGCTTCGCTT
AGCACCTTATAAACTGGCCATCTCACCTCATGTCCGGATTATGTCCCTTCTTTTAGTTTCAGCCTGGCGCGTCCCCT
CCGCAAGTGTAGTGGGTAATGCCTTAGCCAAAGGACTGAAGAAGCAGGTTCCCTCTACTAATTTTTTGCTCGCTCGTTGA
GTACGAGGGAGTCCCCGGATCTTTAATTCCTGTTTGCCTCCTCTACTGGTTTTCCGGCCTAATAGTAAAGATACAGATC
AACATTGCCGCTTTAATTTCTGCTGTTTCTCTGCATTCGACTCATTCGGAGCAACTCTGGAAAGTCCGCCTCAACTC
TTCTATACCTGCTTACATCGAGCTCCACGGATGATCCTCGGGTCGTATTCTTGACCCGTCACCGATCATATTCAACGAC
ACTTCCCGCCGCGCCCTCAATCCTACCTCTTCCCTGAC

Secuencia: RO-15

Gen: 16S

Especie: *Vibrio alginolyticus*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2010.

No. de bases: 697

```
GTTTAACTAGAGGCAAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAG
GTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCC
TTCGGGTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTGGTGTAGTTAATAGCTGCATTACTTGACGTTAGCGACAGAAGAA
GCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGGTAATACGAAGCGTCTTGTTCCCTCTCACCTCCTCAGTTTCCTGATCTCT
ATCCTCCTGTCCACTTGTCCCCCGTCCCCTTGAGCTCGCATCCTCGGACTGTTTCGGTAGCTCCCTCATCTTCGATTTTC
TAAGGTCTTCTCCTTCTTATAACCACCTTCTACGCTCCGGGACCTGTTTCTTTCCCCCTTACTCTCTTTTCCTCTTT
CCTCTTCCNGCNTAGCCCCGGGGGGAGTGCTATCTGCGTCAACTACAGATCTATCCGCTGAACACACTCTCACTCTT
AGTGTCTCCTCTCACGACTTGACTACAGGGCG
```

Secuencia: RO-16

Gen: 16S

Especie: *Vibrio harveyi*

Fuente: muestra de larvas de camarón *L. vannamei*

Lugar y fecha de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea. 2010.

No. de bases: 901

```
AACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTG
GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGA
ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGC
CGCGTGTGTGAAGAAGGCC TTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCTGCATTATTT
GACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGATCTCGACTACGGTCGCGAGATAGGACTTCA
GCTCACGACCTGAGGTGACA ACTACCATGCACCTCCTGTACCCTGGCTCCCCACCCACTTGCGCCCGATCCACCGGTC
TGTTAGGGGAAGGACCGGCTGATAAGGATCTTCACGGCTTCACTCGATAAATAAAGTCAGGCCTTTGTCAGGGACCTT
TTTTTTCCCTTCTCTCTTTTCGCCTTTCCTCTCCCCAGGGGAGTCGCTGGCAGCAATGGCTTCGCGCGAGAACTGGAA
GATGCTCAGCGGCTGTACATTTTTACTGTTTTTAGTTGTCTACGCCGGACGAGATTAGGACTTTCAGGTGCTTTTTAC
GCTTCGATGGCTATCGCGGTCTAGTTCGAGATCAAAGAGTTATCATACGCCCTTATGCTTCTCCAGTGACTCTACGCTT
TCCATTCCCTCACGTCGCAACTCCACCATCCCCACTCTCACTCCCGTTTCTACTTCTTTTCTATCGGACTCCCC
```

XIII. ANEXOS

Anexo 1

Protocolo de extracción de ADN (Ausubel *et al.*, 2002; Sambrook y Russell, 2001)

A partir de un cultivo masivo de 18 horas de cada una de las cepas aisladas, se tomaron varias asadas y se resuspendieron en tubos Eppendorf de 2 ml con 575 μL de TE pH 8.0 (0.1 M Tris pH 7.6, 0.001 M EDTA pH 7.5), 30 μL de SDS al 10% y 1 μL de Proteinasa K (20 mg mL^{-1}) se agitaron en un vortex y se incubaron durante una hora a 37°C. Transcurrido el tiempo se adicionaron 100 μL de NaCl 5M y 80 μL de CTAB/NaCl mezclando por inversión e incubando 10 minutos a 65°C. Posteriormente se agregó un volumen de fenol;cloroformo:alcohol isoamílico (25;24;1), se agitó en vortex hasta obtener una solución lechosa, se centrifugó a 17,530xg por 10 minutos a 24°C, el sobrenadante se recuperó y fue transferido a tubos de 1.6 mL estériles. Se realizó una segunda extracción con un volúmen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) mezclándose por inversión. Los tubos se centrifugaron a 17,530xg por 2 minutos a 4°C. La fase acuosa se recuperó y la precipitación del ADN se llevó a cabo adicionando 0.6 volúmenes de isopropanol preenfriado a -20°C. Los tubos se incubaron a -20°C durante toda la noche. Transcurrido el tiempo de incubación los tubos se centrifugaron a 17,530xg por 20 minutos a 4°C. Los botones resultantes (ADN) se lavaron con etanol al 70% pre enfriado a -20°C, se centrifugó nuevamente a 17,530xg por 10 minutos a 4°C, el proceso se realizó en dos ocasiones. Los botones se dejaron secar al aire y fueron resuspendidos en 100 μL de TE pH adicionándoles 1 μL de ARNasa (1 μg μL^{-1}). Los tubos se incubaron en un baño maría PRESICION a 37°C por una hora, posteriormente las muestras se incubaron a 65°C para inactivar la enzima. Finalmente el ADN se cuantificó en un espectrofotómetro (Eppendorf falta agregar el modelo) a 260 y 280 nm de absorbancia y se visualizó en geles de agarosa al 1% teñidos con SYBR Gold. Los resultados fueron visualizados bajo luz ultravioleta y documentados en un sistema de fotodocumentación UVITEC (UVP Inc[®]).

Anexo 2

Programa utilizado en el termociclador para amplificación de gen 16s

Primers 25F/1385R

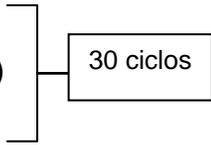
1) 94°C durante 3 min (inicio de desnaturalización)

2) 94°C durante 1 min (desnaturalización)

3) 55°C durante 1 min (alineamiento de oligos)

4) 72°C durante 2 min (extensión, síntesis)

5) 72°C durante 10 min (ultima extensión)



30 ciclos

Primers 27F/1525R

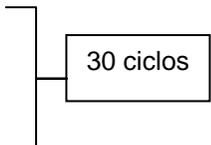
1) 95°C durante 5 min (inicio de desnaturalización)

2) 94°C durante 30 seg (desnaturalización)

3) 55°C durante 30 seg (alineamiento de oligos)

4) 72°C durante 1.3 min (extensión, síntesis)

5) 72°C durante 10 min (ultima extensión)



30 ciclos

Anexo 3

Método de obtención de lisados crudos (Carlson, 2004)

A caldo marino estéril previamente inoculado con la bacteria de interés se le agregaron 100 μ L de un homogeneizado de larvas y se incubó por 24 horas a 30°C. A partir de este cultivo y con ayuda de una jeringa estéril se tomaron 10 mL y se depositaron en tubos de vidrio, estos se centrifugaron a 4,000 rpm a 4°C durante 20 minutos para concentrar la biomasa bacteriana, el sobrenadante se decantó en tubos de vidrio estériles y posteriormente se realizaron las pruebas de puntos (que consisten en colocar una gota de muestra filtrada sobre una capa de bacterias sembradas en agar para posteriormente observar el efecto de la misma) para detectar la presencia de fagos. Cierta transparencia en el área de inóculo indica la presencia de fago; estos lisados crudos pueden contener varios tipos de fagos.