



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**EFFECTOS DE LA CONVERSIÓN LISOGÉNICA
SOBRE LA FISIOLOGÍA Y VIRULENCIA DE**
Vibrio parahaemolyticus

TESIS

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

PRESENTA

DIANA RAMONA BARAJAS SANDOVAL

LA PAZ, B.C.S., DICIEMBRE DEL 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 10 del mes de Noviembre 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:

**"EFECTOS DE LA CONVERSIÓN LISOGÉNICA SOBRE LA FISIOLÓGIA
Y VIRULENCIA DE *Vibrio parahaemolyticus*"**

Presentada por el alumno:

BARAJAS

Apellido paterno

SANDOVAL

materno

DIANA RAMONA

nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	3	5	7
---	---	---	---	---	---	---

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 COMISION REVISORA

Director(a) de Tesis

DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ

DR. DAVID ALFARO SIQUEIROS BELTRONES

DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT

DR. RENATO PEÑA MARTÍNEZ

DRA. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 18 del mes Noviembre del año 2011
el (la) que suscribe BM. DIANA RAMONA BARAJAS SANDOVAL alumno(a) del
Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS
con número de registro B091357 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:

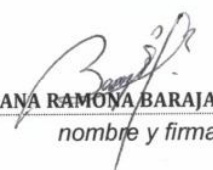
"EFECTOS DE LA CONVERSIÓN LISOGÉNICA SOBRE LA FISIOLOGÍA

Y VIRULENCIA DE *Vibrio parahaemolyticus*"

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: sdiaz@ipn.mx - dbarajass0900@ipn.mx

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


BM. DIANA RAMONA BARAJAS SANDOVAL

nombre y firma

*...y es tan juguetón y travieso que el otro día
descubrí que ha hecho ¡bacterias mutantes!*

(Jaime Sabines)

DEDICATORIA

A mis padres, mi barca

A mi esposo, mi timón

A mis hijos, mi tesoro

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional (IPN) y al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por las becas otorgadas.

Al CICIMAR, por las instalaciones proporcionadas para el desarrollo del presente trabajo. En especial al Laboratorio de Microbiología por facilitar los espacios y material requeridos.

A mi director de tesis, Dr. Sergio Martínez, por su guía y apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A los miembros de mi comité, Dra. Christina Band, Dr. Renato Peña, Dr. David Siqueiros y Dr. Iván Murillo, por involucrarse en mi trabajo en tan poco tiempo.

Un agradecimiento especial a la Dra. Bárbara González, porque además de ser una gran maestra, es una gran amiga.

A todos mis compañeros de laboratorio, Lina, Carlos, Román, Sonia, Cynthia, Jessica, Ismael, Francisco, Claudia y Noemí, por todas esas celebraciones y los gratos momentos que compartimos juntos.

A la granja de camarón Acuacultura Mhar por proporcionar las larvas para realizar las pruebas de reto.

INDICE

LISTA DE TABLAS.....	III
LISTA DE FIGURAS.....	IV
ABREVIATURAS.....	V
GLOSARIO.....	VI
RESUMEN.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2
1.1.1 Importancia de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2
1.2 Factores de virulencia en cepas patógenas.....	3
1.3 Fagos.....	3
1.3.1 Características generales.....	4
1.3.2 Ciclos de replicación.....	4
1.4 Conversión lisogénica.....	5
1.5 Inducción del ciclo lítico en cepas lisogénicas.....	6
2. ANTECEDENTES.....	7
2.1 Fagos lisogénicos asociados a especies bacterianas.....	7
2.1.1 Fagos asociados a <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	7
2.2 Importancia de los fagos lisogénicos en los sistemas de cultivo.....	8
3. JUSTIFICACIÓN.....	10
4. OBJETIVO GENERAL.....	11
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
6. HIPÓTESIS.....	11
7. MATERIAL Y MÉTODO.....	12
7.1 Cepa de prueba.....	12
7.2 Selección de fagos.....	12
7.3 Cultivo de fagos.....	13
7.4 Inducción de lisógenos.....	13
7.5 Evaluación de la producción de enzimas extracelulares con la galería Api Zym.....	15
7.6 Producción de exoenzimas.....	16
7.6.1 Producción de hemolisinas.....	16
7.6.2 Producción de lipasas.....	16
7.6.3 Producción de proteasas.....	16
7.6.4 Producción de amilasas.....	16
7.7 Perfil del uso de fuentes de carbono.....	17
7.8 Hidrofobicidad.....	17
7.9 Evaluación del efecto de los lisógenos en la supervivencia de nauplios de <i>Artemia</i>	18
7.10 Evaluación del efecto de los lisógenos en la supervivencia de larvas de camarón blanco, <i>Litopenaeus vannamei</i>	18
7.11 Evaluación de la producción de toxinas.....	19
7.11.1 Obtención de productos extracelulares de los lisógenos.....	19
7.11.2 Evaluación de la toxicidad de los ECP's.....	20
7.12 Análisis estadísticos.....	20
8. RESULTADOS.....	21

8.1 Inducción de lisógenos.....	21
8.2 Evaluación de la producción de enzimas extracelulares con la galería Api Zym.....	22
8.3 Determinación del uso de fuentes de carbono.....	25
8.4 Hidrofobicidad.....	28
8.5 Efecto de los lisógenos en la supervivencia de <i>Artemia</i>	29
8.6 Efecto de los lisógenos en la supervivencia de camarón.....	31
8.7 Efecto de los ECP's en la supervivencia de <i>Artemia</i>	33
9. DISCUSIÓN.....	35
9.1 Inducción de profagos.....	35
9.2 Cambios en las propiedades de <i>V. parahaemolyticus</i> por conversión lisogénica.....	36
9.3 Incremento en la virulencia bacteriana mediada por fagos.....	39
9.4 Efecto de los ECP's de los lisógenos en la supervivencia de <i>Artemia</i>	41
9.5 Implicaciones de la conversión lisogénica en la camaronicultura.....	42
10. CONCLUSIÓN.....	44
11. RECOMENDACIONES.....	45
12. BIBLIOGRAFÍA.....	46
13. APÉNDICE.....	58

LISTA DE TABLAS

Tabla I	Fuente de aislamiento de fagos lisogénicos.....	12
Tabla II	Parámetros estadísticos de la producción enzimática (media/desviación estándar) y nivel de significancia (<i>p</i>).....	23
Tabla III	Efecto de los fagos en la producción de enzimas de <i>V. parahaemolyticus</i>	24
Tabla IV	Cambios en el uso de fuentes de carbono de <i>V. parahaemolyticus</i> por conversión lisogénica.....	26
Tabla V	Otras fuentes de carbono usadas por <i>V. parahaemolyticus</i> infectada con fagos.....	28
Tabla VI	Hidrofobicidad de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en estado lisógeno...	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Formación de placa del fago ESE sobre un cultivo de <i>V. parahaemolyticus</i>	21
Figura 2	Supervivencia de nauplios de <i>Artemia</i> a las 48 h post-infección con <i>V. parahaemolyticus</i> y lisógenos.....	29
Figura 3	Efecto de los lisógenos en la supervivencia de <i>Artemia</i> . En el caso de Vp/γ y Vp/W ver detalles en el texto.....	30
Figura 4	Supervivencia de larvas de camarón infectadas con lisógenos y mezclas bacteria-fago.....	31
Figura 5	Daños producidos por los lisógenos en larvas de camarón. A) daños en lóbulos furcales; B) melanización; C) excitación de cromatóforos; D) daños en cefalotórax; E) daño en la base de los pedúnculos oculares.....	32
Figura 6	Efecto de los ECP's en la supervivencia de <i>Artemia</i> . A) lote 1, B) lote 2.....	34

ABREVIATURAS

μL	Microlitros
μm	Micrómetros
AM	Agar Marino
ASW	Agua de Mar Artificial
cm	Centímetros
D.O.	Densidad Óptica
ECP's	Productos extracelulares
<i>et al.</i>	Y Colaboradores
h	Horas
DL ₅₀	Dosis Letal Media
M	Molar
mdd	Millones De Dólares
min	Minutos
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
p/v	Peso/Volumen
PBS	Buffer Salino de Fosfatos
rpm	Revoluciones Por Minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
s	Segundos
UV	Ultravioleta

GLOSARIO

Dodecil Sulfato de Sodio: Surfactante aniónico que tiene la capacidad para desnaturalizar proteínas (Piret *et al.*, 2002).

Exoenzimas: Enzimas producidas y liberadas por las células que hidrolizan sustratos a tamaños suficientemente pequeños para ser transportados a través de las membranas celulares (Arnosti, 2011).

Factores de virulencia: Elementos que permiten a un microorganismo colonizar un nicho en su hospedero donde prolifera y causa daños (Chen *et al.*, 2005).

Fago: Virus que infectan específicamente células bacterianas (Moat *et al.*, 2002).

Gnotobiótico: Término usado para describir a un organismo o un sistema en el cual todas las formas de vida son conocidas (Coates, 1975).

Hemolisina: Proteína que produce la lisis de los eritrocitos (Goebel *et al.*, 1988).

Lisogenia: Mecanismo por el cual el material genético del fago mantiene una simbiosis con su hospedero (Ackermann & DuBow, 1987).

Lisógeno: Célula bacteriana portadora de profago (Ackermann & DuBow, 1987).

Mitomicina C: Antibiótico que actúa como agente alquilante del ADN (Moat *et al.*, 2002).

Patogenicidad: Cualidad que posee un organismo para producir infección (Lacey & Brooks, 1997).

Patógenos oportunistas: Microorganismos capaces de causar enfermedad en organismos inmunosuprimidos (Saulnier, 2000).

Plásmido: Molécula de ADN que se replica en el citoplasma bacteriano independientemente de la replicación del cromosoma (Lipps, 2008).

Productos extracelulares: Exoenzimas y exotoxinas generalmente asociadas con la virulencia bacteriana (Rodríguez *et al.*, 2005).

Profago: Estado latente de un fago dentro de la célula bacteriana; frecuentemente asociado al cromosoma bacteriano o mantenido como plásmido (Guttman *et al.*, 2005).

Pruebas de reto: En microbiología, se refiere al estudio destinado a conocer la interacción entre un organismo y un microorganismo o sus componentes extracelulares (Ninawe & Selvin, 2009).

Superinfección: Proceso por el cual una célula que ha sido previamente infectada con un fago, es co-infectada con uno o varios más (Abedon, 1994).

Toxicidad: Medida usada para determinar el grado tóxico de algunas sustancias (Fauci *et al.*, 2008).

Vibriosis: Enfermedad causada por agentes pertenecientes al género *Vibrio*; provoca altas mortalidades en los organismos en cultivo y grandes pérdidas económicas (Saulnier, 2000).

Virión: Partícula vírica morfológicamente completa e infecciosa que se encuentra en fase extracelular (Madigan *et al.*, 1999).

Virulencia: Medida cuantitativa de la patogenicidad de un organismo (Weiss, 2002).

RESUMEN

De manera natural, *Vibrio parahaemolyticus* forma parte de la microbiota de invertebrados marinos, pero también se asocia con brotes infecciosos en la producción acuícola. En varios miembros del género *Vibrio*, se ha determinado que la virulencia se incrementa al estar infectados con ciertos fagos (estado lisogénico), sin embargo, se desconoce si en *V. parahaemolyticus* la virulencia puede ser modulada durante la conversión lisogénica. En el presente estudio se determinó el efecto de la conversión lisogénica sobre la fisiología y virulencia de *V. parahaemolyticus*. Para ello se utilizaron 10 fagos lisogénicos (α , 2, E2, S, ESE, 5c, 5s, 5+++ , γ , W) aislados de almejas y cultivos de camarón. La conversión lisogénica se indujo experimentalmente por exposición directa de *V. parahaemolyticus*, cepa ATCC 17802, a cada uno de los fagos y se evaluó el efecto sobre la hidrofobicidad, producción de enzimas y uso de fuentes de carbono. El cambio en la virulencia se evaluó *in vitro* mediante pruebas de reto con nauplios de *Artemia* y camarón. Y la producción de toxinas extracelulares de los lisógenos fue evaluada en nauplios de *Artemia*. La mayoría de los fagos estudiados inducen cambios en la hidrofobicidad de *V. parahaemolyticus*, de nula a moderada, así como cambios en la producción de enzimas entre las que se incluyen lipasas y proteasas, principalmente. Al mismo tiempo, *V. parahaemolyticus* en estado lisogénico puede aprovechar nuevos sustratos como fuente de carbono. Los fagos α , 2 y E2 incrementan significativamente la virulencia de *V. parahaemolyticus* hacia nauplios de *Artemia* y la mezcla *V. parahaemolyticus*/fago y hacia larvas de camarón. Entre los daños observados en los organismos se incluye el letargo y la melanización. Los productos extracelulares generados por el lisógeno 5+++ indujeron signos de daño y mortalidades significativas en nauplios de *Artemia* ($p < 0.05$), lo que indica la producción de toxinas. Los cambios en las propiedades de *V. parahaemolyticus* producidos por conversión lisogénica ayudan a explicar el efecto variable de esta bacteria en los cultivos de camarón.

Palabras clave: *Vibrio parahaemolyticus*, fagos, lisogenia, virulencia.

ABSTRACT

Naturally, *Vibrio parahaemolyticus* occurs in the microbiota of marine invertebrates, and has been associated to outbreaks in aquaculture. In some members of the genus *Vibrio*, the virulence is increased by the infection of certain lysogenic phages (lysogenic state), however, it is unknown whether *V. parahaemolyticus* virulence can be modulated for the lysogenic conversion. In the present study the effect of lysogenic conversion on the physiology and virulence of *V. parahaemolyticus* was determined. Ten lysogenic phages (named α , 2, E2, S, ESE, 5c, 5s, 5+++ , γ , W) isolated from clam and shrimp culture were used. The lysogenic states were induced experimentally by direct exposure of *V. parahaemolyticus* (strain ATCC 17802) to each phage and evaluated their effect on the hydrophobicity, enzyme production and use of different carbon sources through standard test. Also the changes in virulence were evaluated by challenge test in *Artemia* and shrimp larvae. And the production of toxins was assessed in a standard test of *Artemia* nauplii. The phages included in this study induced changes in the hydrophobicity of *V. parahaemolyticus*, from zero to moderate, and changes in the production of enzymes; including lipases and proteases. Simultaneously, changes in the metabolic profile of use of carbon sources were recorded. The phages named α , 2 and E2 significantly increased the virulence of *V. parahaemolyticus* for *Artemia* nauplii and the mixture *V. parahaemolyticus*/ γ phage for shrimp larvae. The damages observed during the challenge test include lethargy and melanization of the body. The extracellular products produced by the 5+++ lysogen induces signs of damage and significant mortality in *Artemia* nauplii ($p < 0.05$), indicating toxins production. Changes in the properties of *V. parahaemolyticus* by lysogenic conversion help to explain their variable effect during shrimp culture.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, phages, lysogeny, virulence.

1. INTRODUCCIÓN

Con el progreso de la acuicultura, los sistemas intensivos usados para el cultivo de organismos marinos han creado ambientes artificiales que favorecen el crecimiento bacteriano (Skjermo & Vadstein, 1999). Bacterias oportunistas del género *Vibrio* han sido reportadas como causa de serias infecciones y baja productividad en los sistemas de cultivo de todo el mundo. El efecto y severidad de la infección está relacionada con la dosis y especie de *Vibrio* (Lightner, 1996) y los rangos de mortalidad van de insignificantes al 100%, afectando diversos estadios de crecimiento. Particularmente, en el cultivo de camarón, los daños más severos se presentan en los estadios juvenil y postlarva de modo que la vibriosis, conocida también como vibriosis luminiscente, ocasiona pérdidas económicas estimadas en billones de dólares e incluso en el colapso de la producción (Aguirre & Ascencio, 2000).

Entre las especies infecciosas responsables que son reportadas con mayor frecuencia se encuentran *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus* (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000; Gullian, 2001; Leyton & Riquelme, 2008) y *Vibrio alginolyticus*. Sin embargo, las observaciones sobre su papel son controvertidas ya que también existen algunos reportes donde se resaltan sus funciones benéficas; tal es el caso de *V. alginolyticus*, que es reportado como causante de enfermedades y simultáneamente es empleado como probiótico para el cultivo de camarón (Direkbusaram *et al.*, 1998; Vandenberghe *et al.*, 2003). En este sentido, Sotomayor y Balcázar (2003), reportaron el potencial de aplicación que tienen las mezclas de cepas probióticas, entre las que se considera a *V. alginolyticus*, para el control de vibrios patógenos en los sistemas acuícolas. No obstante, Tseng y Chen (2004), reportan que, a concentraciones superiores de 5.15 mg.L⁻¹, el nitrito en el agua causa una depresión del sistema inmune de *Litopenaeus vannamei* y un incremento en la susceptibilidad a la infección por *V. alginolyticus*. Por otro lado, *V. harveyi* libera más de 10 enzimas que degradan la quitina (Suginta *et al.*, 2004), polímero natural y una de las fuentes más abundantes de amino azúcares en el océano (Riemann & Azam, 2002). Existen antecedentes que la asociación de

vibrios y plancton aumenta la supervivencia de *Litopenaeus vannamei* y se ha estimado que *Vibrio* y *Aeromonas* representan hasta el 85% de la microbiota bacteriana en el intestino de camarón (Leyton & Riquelme, 2008).

1.1 *Vibrio parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus es otra especie a la que se le atribuye la capacidad de producir enfermedades y mortalidad en organismos silvestres y cultivados. Son bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, móviles y halofílicos, cuyo tamaño oscila entre 1.4 - 2.6 µm de longitud y 0.5 – 0.8 µm de diámetro, con una temperatura óptima de crecimiento de 35°C a 37°C y un tiempo de generación estimado entre 10 y 12 min (Paris, 2005; Zamora & Quiróz, 2005).

Su hábitat natural son las aguas marinas costeras, especialmente en los estuarios, donde puede permanecer en la columna de agua, en el sedimento o adherido a las superficies de quitina de algunos organismos, principalmente crustáceos, sobre los que incrementa su concentración (Heitmann *et al.*, 2005; Zamora & Quiróz, 2005).

1.1.1 Importancia de *Vibrio parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus ha sido aislado durante infecciones hemorrágicas en reproductores de *Paralabrax maculatofasciatus* y durante la manifestación de tres enfermedades en *Penaeus monodon*: necrosis de la cola, enfermedad roja y el síndrome de la concha suelta (Martínez-Díaz & Anguas-Vélez, 2002; Jayasree *et al.*, 2006). Así mismo, se asocia con mortalidades masivas en cultivos de abulón y, por estar en suspensión en el agua de mar, se concentra en moluscos bivalvos filtradores que son parte importante en la dieta de las poblaciones costeras (Hernández *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2006). En este sentido, numerosos brotes de intoxicaciones alimentarias por *V. parahaemolyticus* han sido reportados en Estados Unidos, Europa y Asia, por lo que también es considerado un problema de salud pública al causar gastroenteritis aguda (Paris, 2005). No obstante, en el medio ambiente, *V. parahaemolyticus* es mayoritariamente no patógeno, generalmente

menos del 1% de los aislados de origen ambiental poseen la capacidad de producir infección en humanos (DePaola *et al.*, 2003a,b).

1.2 Factores de virulencia en cepas patógenas

Las diferencias en el grado de patogenicidad de las bacterias se deben a la presencia y expresión de genes de virulencia en cepas patógenas y a su ausencia en cepas relacionadas (Boyd, 2005). Dentro de los factores de virulencia se incluyen proteínas secretadas como toxinas y enzimas, además estructuras de superficie celular como polisacáridos capsulares, lipopolisacáridos y proteínas de membrana que participan directamente en el proceso de infección (Chen *et al.*, 2005). La hidrofobicidad juega un papel importante en la virulencia bacteriana ya que es considerado como la etapa inicial en el proceso de adhesión bacteriana. En estudios previos se ha determinado que la hidrofobicidad es un factor que influye en la adhesión de bacterias a la mucosa intestinal en humanos (Iñiguez-Palomares & Acedo-Félix, 2006).

Diversos productos extracelulares (ECP's) con efectos tóxicos para el camarón han sido identificados y caracterizados en algunas especies y cepas de *Vibrio* y son propuestos como factores de virulencia. Estos ECP's incluyen proteasas, fosfolipasas y hemolisinas (Liu *et al.*, 1997; Aguirre-Guzmán *et al.*, 2004; Khemayan, 2004). Se ha reportado que los ECP's de algunas especies de *Vibrio* pueden ocasionar mortalidades hasta del 100% en camarón (Goarant *et al.*, 2000).

Algunos factores de virulencia son intrínsecos y otros son adquiridos a través de elementos genéticos como los fagos (Waldor & Mekalanos, 1996; Aguirre-Guzmán *et al.*, 2004).

1.3 Fagos

Los bacteriófagos, o fagos, son virus que infectan específicamente células bacterianas. Fueron descubiertos en 1915 por Felix Twort, sin embargo, Felix d'Hérelle fue quien los denominó "bacteriófagos". Como todos los virus, son

exclusivamente parásitos y representan las entidades biológicas más abundantes en el planeta; su abundancia total se ha estimado en 10^{30} o más (Ackermann, 2003; Chibani-Chennoufi *et al.*, 2004; Guttman *et al.*, 2005).

1.3.1 Características generales

Los fagos son extremadamente heterogéneos en sus propiedades estructurales, fisicoquímicas y biológicas. En su estado extracelular reciben el nombre de virión y se encuentran constituidos por una cubierta proteica o lipoproteica llamada cápside que envuelve el material genético (ADN o ARN) que puede ser de doble o simple cadena (Ackermann, 2005), circular o lineal (Moat *et al.*, 2002). Aunque poseen toda la información genética para dirigir su propia reproducción en un hospedero apropiado, carecen de la maquinaria para generar energía, así como de ribosomas para producir proteínas (Guttman *et al.*, 2005).

Los tipos de fagos más comunes poseen una cola por la cual se adsorben en la célula hospedera (Bradley, 1967). Su tamaño varía entre 20 y 300 nm y morfológicamente presentan un alto grado de simetría geométrica. Los más pequeños poseen material genético de cadena corta por lo que solamente pueden codificar para pocos genes (Moat *et al.*, 2002).

1.3.2 Ciclos de replicación

Los fagos pueden dividirse en dos tipos basados en su ciclo de replicación: líticos o lisogénicos. Los fagos líticos sólo pueden multiplicarse por el ciclo lítico; el virión se adsorbe a la superficie de la célula hospedera e inyecta su genoma, el cual utiliza la maquinaria celular para formar más partículas virales. El ciclo culmina con la lisis y muerte bacteriana, liberando nuevos fagos. En contraste, los fagos lisogénicos pueden seguir dos ciclos reproductivos cuando infectan una bacteria: algunas veces llevan a cabo el ciclo lítico mencionado anteriormente, alternativamente, pueden iniciar el ciclo lisogénico; el genoma del fago permanece en un estado latente llamado profago, frecuentemente integrado en el genoma bacteriano o bien, mantenido como un plásmido. El genoma del fago permanece en este estado

indefinidamente, replicándose con la célula hospedera y dando como resultado células que contienen profagos (Moat *et al.*, 2002; Guttman *et al.*, 2005); este proceso es denominado conversión fágica (Boyd, 2005), conversión lisogénica o lisogenia.

1.4 Conversión lisogénica

La conversión lisogénica, o lisogenia, fue descubierta al inicio de 1950 cuando se observó que un grupo de células bacterianas producía espontáneamente pequeñas cantidades de fagos. Se trata de la introducción del genoma del fago en la célula bacteriana, estado en el que a la célula se le conoce como lisógeno, proporcionándole una serie de nuevos caracteres que van desde cambios en la morfología colonial, hasta inhibición o intensificación de actividad enzimática, resistencia a antibióticos, inmunidad a la superinfección, así como cambios en las propiedades patogénicas (Hershey, 1971; Pumarola *et al.*, 1991; Boyd, 2005; Vidgen *et al.*, 2006). Posteriormente se demostró que la lisogenia es heredable. Cuando una célula lisogénica se divide, ambas células hijas son portadoras de profagos, sólo una pequeña parte de la población bacteriana se libera espontáneamente y los libera (Campbell, 2006). Dentro de la célula bacteriana, los fagos son capaces de existir como un plásmido o integrarse en el cromosoma donde residen como profagos. Por esta razón, la conversión lisogénica no resulta en la lisis bacteriana, sino en una transferencia de genes vertical o incluso horizontal (Boyd, 2005; Flegel *et al.*, 2005).

Algunos de los genes diseminados por los fagos codifican para neurotoxinas, citotoxinas y enterotoxinas (Barksdale & Arden, 1974; Betley & Mekalanos, 1985; Nakayama *et al.*, 1999), de modo que los hospederos no patógenos son transformados en cepas virulentas o bien, su virulencia se incrementa. Así mismo, el genoma de los fagos puede codificar para proteínas correspondientes a la maquinaria fotosintética de las cianobacterias que se expresan a lo largo del proceso infeccioso (Mann *et al.*, 2003; Lindell *et al.*, 2005; Clokie *et al.*, 2006; Dammeyer *et al.*, 2008; Sullivan *et al.*, 2005; Sullivan *et al.*, 2010; Thompson *et al.*, 2011). Estudios recientes han demostrado que el perfil fenotípico de *V. harveyi* se modifica debido a

la infección con fagos (Vidgen *et al.*, 2006) y que el transporte de nutrientes también se ve afectado en cepas lisogénicas. Zabala y colaboradores (2009) detectaron la presencia de un fago en la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* que la hace más susceptible a la radiación solar, contrario a lo que se ha observado en las cianobacterias, donde los fagos inducen la expresión de una proteína que ayuda a proteger el fotosistema II del exceso de energía luminosa (Havaux *et al.*, 2003).

Los vibrios son los principales hospederos de fagos marinos (Proctor, 1997), lisogénicos en su mayoría (Pasharawipas *et al.*, 1998), por lo que múltiples investigaciones acerca del cultivo de crustáceos marinos se han enfocado en el papel que desempeñan los fagos en el incremento en la virulencia de *Vibrio* spp., siendo *V. harveyi* la especie más estudiada al ser uno de los principales patógenos oportunistas reportados como causa de severas infecciones en el cultivo de peces y crustáceos. Aunque a la fecha se sabe que *V. parahaemolyticus* puede ser lisogenizado (Nasu *et al.*, 2000), no se ha comparado su perfil fenotípico con el de la cepa no infectada.

1.5 Inducción del ciclo lítico en cepas lisogénicas

Para la detección de cepas lisogénicas en laboratorio se emplean una serie de tratamientos físicos y químicos que dañan el ADN celular. Entre los tratamientos más comunes para la inducción de profagos se encuentran la mitomicina C (Jiang & Paul, 1998) y la luz UV (Raya & Hébert, 2009) que estimulan el sistema SOS en respuesta al daño del ADN. Cuando el ADN es dañado, se estimula la expresión de la proteína *RecA*, que inactiva las proteínas represoras del profago resultando en la inducción del ciclo lítico (Fink & Zahler, 2006). Existen otros tratamientos para la inducción de profagos como la exposición al peróxido de hidrógeno (Hartford & Dowds, 1992), o bien, cambios de temperatura (Armentrout & Rutberg, 1971).

2. ANTECEDENTES

2.1 Fagos lisogénicos asociados a especies bacterianas

Desde que Freeman (1951) reportó por primera vez que la toxina de *Corynebacterium diphtheria* era codificada por un fago, surgieron más pruebas al respecto con otras bacterias patógenas, incluyendo *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Las toxinas bacterianas codificadas por los fagos son diversas funcionalmente y de las más potentes descritas, como la toxina del tétanos, botulismo y difteria, expresadas en *Clostridium tetani*, *C. botulinum* y *Corynebacterium diphtheriae*, respectivamente (Boyd, 2005).

En bacterias oportunistas, como las del género *Vibrio*, la asociación bacteria-fago también resulta en cambios en la virulencia, inclusive en modificaciones en la superficie celular lo que se refleja en una inmunidad a la infección por otros fagos, lo que conllevaría a una superinfección (Khemayan, 2004).

2.1.1 Fagos asociados a *Vibrio parahaemolyticus*

Algunos fagos temperados han sido aislados de diversas cepas de *V. parahaemolyticus*. Taniguchi y colaboradores (1984) aislaron y caracterizaron el fago Vf33, un fago filamentoso específico de *V. parahaemolyticus* cuya actividad lítica fue resistente a temperaturas menores a 80°C y sensible al cloroformo. Trabajos sucesivos con éste y otro fago filamentoso, Vf12, surgieron con la finalidad de comprobar su relación con el fenómeno de Kanagawa, que es la hemólisis de eritrocitos. Aunque no se detectaron los genes que codifican la síntesis de hemolisinas, *tdh* y *trh*, en el genoma de los fagos, fue posible dilucidar que pueden interactuar con el ADN cromosomal y extracromosomal de *V. parahaemolyticus*, lo que sugiere la posibilidad de que jueguen un papel importante en la movilización de genes de virulencia de esta bacteria (Chang *et al.*, 1998). En este sentido, diversos estudios han señalado el papel que juegan los fagos para la diseminación de genes de virulencia entre las bacterias. Seguritan y colaboradores (2003) aislaron los fagos

VP16T y VP16C que contienen un gen similar al *vapE*, el cual codifica la síntesis de una proteína asociada con la virulencia en *Dichelobacter nodosus*. Sin embargo, no se observaron módulos de lisogenia o genes integrasa por lo que no hay evidencia de lisogenia (Paul & Sullivan, 2005).

En febrero de 1996 se observó un incremento inexplicable en la incidencia de *V. parahaemolyticus* en pacientes hospitalizados en Calcuta, India. El análisis de las cepas reveló que un único serotipo, O3:K6, era el causante del 50 al 80% de los casos. Actualmente, se ha diseminado en cuatro continentes: Asia, América, África y Europa (Nair & Hormazábal, 2005). Desde entonces, sólo 3 fagos temperados han sido asociados con esta cepa: 1) el fago f237 que tiene la capacidad de integrarse en el cromosoma bacteriano y contiene el gen ORF8, un marcador genético empleado para la caracterización de cepas O3:K6 ya que no se ha encontrado en otros fagos filamentosos. Se ha especulado que esta región resulta en una alteración fenotípica desconocida que le proporciona a la cepa el potencial pandémico; 2) el fago VP882 que permanece como un plásmido dentro de la bacteria y contiene genes funcionales putativos denominados adenin metilasa de ADN (DAM). Estos DAM han sido identificados en muchas bacterias como reguladores de la expresión de pilis para adhesión y otros factores de virulencia en *E. coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia pseudotuberculosis* y *V. cholerae*; 3) El fago Vp58.5 que incrementa de 7 a 15 veces la sensibilidad de la cepa O3:K6 cuando ésta es expuesta a la radiación UV, lo cual podría tener un papel significativo en la supervivencia y propagación de *V. parahaemolyticus* pandémico en el océano (Nasu *et al.*, 2000; Low *et al.*, 2001; Lan *et al.*, 2009; Zabala *et al.*, 2009; Bastías *et al.*, 2010). No obstante, ninguno de estos fagos ha sido directamente relacionado con el incremento en la virulencia de la bacteria.

2.2 Importancia de los fagos lisogénicos en los sistemas de cultivo

El papel de los fagos lisogénicos en los sistemas de producción acuícola ha sido evaluado en diversos estudios y se ha encontrado que pueden ocasionar mortalidades masivas de los organismos en cultivo al estar en asociación con

patógenos oportunistas, como los vibrios (Ruangpan *et al.*, 1999; Austin *et al.*, 2003; Munro *et al.*, 2003).

En Tailandia fue aislado un fago temperado para *V. harveyi*, cepa 1114, del cultivo de *Penaeus monodon*, perteneciente a la Familia Siphoviridae por lo que fue denominado VHS1. Se demostró que las cepas infectadas con este fago además de producir una gran cantidad de proteínas extracelulares con un perfil diferente al de la cepa parental VH1114, son más virulentas para *P. monodon* (Puiprom, 2003; Pasharawipas *et al.*, 2005; Khemayan *et al.*, 2006).

Estudios previos hacen referencia al aislamiento y daño causado por *Vibrio parahaemolyticus* de los organismos en cultivo, así como de fagos aislados de sus sistemas (Vandenberghe *et al.*, 1999; Vandenberghe *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2004; Makarov, 2008), sin embargo, no hay información disponible acerca del papel que desempeñan los fagos en la virulencia de *V. parahaemolyticus* en la camaronicultura.

3. JUSTIFICACION

Vibrio parahaemolyticus es una bacteria oportunista que forma parte de la microbiota del camarón y frecuentemente ocasiona fuertes brotes infecciosos, incluso en humanos. Esta condición sugiere, que al igual que en otras especies de bacterias, los fagos lisogénicos pueden ser responsables de la transformación de esta bacteria en los tanques de cultivo ya que aunque es común su presencia en estos sistemas, puede no tener un efecto perceptible en los camarones, provocar retraso en el crecimiento o bien, ocasionar mortalidades masivas.

Debido a que poco se conoce acerca del papel que desempeñan los fagos en la virulencia de *V. parahaemolyticus* en la camaronicultura, en el presente trabajo se evalúa el efecto de algunos fagos lisogénicos aislados de cultivos de camarón blanco (*L. vannamei*) que infectan a *V. parahaemolyticus*, sobre algunos atributos fisiológicos y propiedades asociadas con la virulencia de la especie, así como su efecto en la inducción de mortalidad durante pruebas de reto en larvas de *Artemia* y camarón.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la conversión lisogénica sobre la fisiología y virulencia de *Vibrio parahaemolyticus* cepa ATCC 17802.

5. OBJETIVOS ESPECIFICOS

I. Determinar los cambios en la producción de enzimas, uso de fuentes de carbono e hidrofobicidad de *V. parahaemolyticus* infectado experimentalmente con fagos lisogénicos.

II. Evaluar los cambios en la virulencia de *V. parahaemolyticus* mediante pruebas de reto en *Artemia franciscana* y larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

6. HIPÓTESIS

Los fagos lisogénicos modificarán algunos atributos fisiológicos y la virulencia de *Vibrio parahaemolyticus* lo cual podrá verse reflejado en cambios en la producción enzimática y un incremento significativo en la virulencia de la bacteria.

7. MATERIAL Y MÉTODO

Los métodos descritos a continuación se siguieron con cada uno de los fagos estudiados [α (alfa), 2, E2, S, ESE, 5c, 5s, 5+++ , γ (gamma) y W]. En cada prueba, se incluyó un control de *V. parahaemolyticus* sin fago. Los fagos γ (gamma) y W sólo fueron incluidos en las pruebas descritas en los párrafos 7.9 y 7.10 ya que no se detectó la formación experimental de lisógenos. Estos tratamientos se indican como Vp/ γ y Vp/W.

7.1 Cepa de prueba

La cepa *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 fue empleada en el presente estudio como cepa blanco, por lo que fue sembrada en tubos de agar inclinado y mantenida a 10°C hasta su posterior uso.

7.2 Selección de fagos

Para el presente estudio fueron seleccionados 10 fagos lisogénicos (específicos para *V. parahaemolyticus*) almacenados en el cepario de fagos del Laboratorio de Microbiología del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, CICIMAR. La fuente de aislamiento de cada fago se muestra en la Tabla I. Los fagos fueron seleccionados previamente como muestras diferentes con base en su morfología de placa.

Tabla I. Fuente de aislamiento de fagos lisogénicos.

FAGO	FUENTE DE AISLAMIENTO	REFERENCIA
α (alfa)	<i>Litopenaeus vannamei</i> (enfermo)	Makarov (2009). México*
2	<i>Megapitaria squalida</i>	Makarov (2008). México
E2	<i>Litopenaeus vannamei</i> (enfermo)	Makarov (2008). México
S	<i>Litopenaeus vannamei</i> (sano)	Makarov (2008). México
ESE	<i>Litopenaeus vannamei</i> (sano)	Makarov (2008). México
5c	<i>Megapitaria squalida</i>	Makarov (2008). México
5s	<i>Megapitaria squalida</i>	Makarov (2008). México
5+++	<i>Megapitaria squalida</i>	Makarov (2008). México
γ (gamma)	<i>Litopenaeus vannamei</i> (enfermo)	Makarov (2008). México
W	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Makarov (2009). México*

* Datos no publicados

7.3 Cultivo de fagos

Para la producción masiva de los fagos seleccionados, 500 mL de caldo marino estéril (121°C, 15 libras, 15 min) fueron inoculados con un cultivo de 24 h de *V. parahaemolyticus* e incubados a 35°C por 3 h. Posteriormente, fueron agregados 5 µL de suspensión de fago y mantenidos nuevamente a 35°C por 24 h. La muestra se centrifugó (3000 rpm, 30 min, 4°C) y el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de 0.2 µm (Whatman) para eliminar las células bacterianas. Éste fue recuperado en botellas estériles (Wheaton) de 500 mL cubiertas con papel aluminio y mantenido a 4°C hasta su uso.

7.4 Inducción de lisógenos

Dado que para el presente estudio se propuso determinar los cambios fenotípicos de *V. parahaemolyticus* en estado lisogénico, fue necesario asegurar la formación experimental de lisógenos y su detección con distintos métodos de inducción. Los procedimientos realizados para tales fines se describen a continuación:

a) Infección en caldo e inducción de lisógenos con luz UV

Tubos con 1 mL de caldo marino previamente estéril, fueron inoculados con 100 µL de una suspensión bacteriana (D.O.=1, 585 nm) de *V. parahaemolyticus* y fueron infectados con 100 µL del concentrado de fago obtenido previamente. La muestra se incubó por 3 h a 30°C. Posteriormente con un asa estéril se tomó un inóculo y se sembró por estrías cruzadas en una placa de agar marino (AM). La placa se incubó a 30°C por 24 h. De las colonias formadas, 3 fueron seleccionadas para llevar a cabo el método modificado para inducción de lisógenos descrito por Zabala y colaboradores (2009), por lo que fueron sembradas en placas de AM e incubadas a 30°C por 24 h. Posteriormente, por triplicado, se realizó una suspensión bacteriana (D.O.= 0.2, 585 nm) a partir de cultivos frescos de cada colonia y se vertió a una caja petri de vidrio estéril (121°C, 15 libras, 15 min). Las muestras fueron expuestas a luz UV en un transiluminador (Benchtop 2UV™) por 12.5 min a una distancia de 20 cm de la base para inducir el ciclo lítico de los fagos. Posteriormente,

la solución fue recuperada en tubos estériles y mantenidos en baño maría a 28°C. Se midió la absorbancia a 585 nm en los tubos cada 15 min por un periodo de 2 h con la finalidad de observar una disminución que indicara la lisis de las bacterias por presencia de fagos. Las muestras fueron comparadas con un control de *V. parahaemolyticus* sin fagos, sometido a las mismas condiciones.

b) Infección en placa e inducción de lisógenos con luz UV

Para la obtención de lisógenos por este método se realizó una prueba de gota. A partir de un cultivo fresco de *V. parahaemolyticus* se realizó una siembra masiva en una placa de AM y una gota (10 µL) de la suspensión de fago fue colocada sobre ésta. La placa fue mantenida a temperatura ambiente hasta permitir la completa absorción de la gota y posteriormente fue incubada 24 h a 35°C. De la zona turbia formada, se tomó un inóculo que fue sembrado nuevamente por estrías cruzadas sobre AM; la placa fue incubada bajo las condiciones descritas anteriormente. Tres colonias fueron seleccionadas e inducidas con luz UV mediante el método modificado de Raya y Hébert (2009) para detección de lisógenos. Se inoculó 1 mL de caldo marino con una asada de un cultivo fresco de la colonia seleccionada e incubado a 35°C por 3 h. Posteriormente, la suspensión fue vertida a un tubo con 5 mL de caldo marino estéril e incubado a 35°C por 24 h. Después, las muestras se centrifugaron a 3200 rpm por 30 min; se decantó el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido en 5 mL de MgSO₄ 0.1 M. Una vez homogeneizadas las muestras, fueron vertidas a una placa de vidrio estéril e inducidas con luz UV (302 nm) en un transiluminador (Benchtop 2UVTM) por 30 s. Posteriormente, la suspensión fue colectada en tubos con 5 mL de caldo marino de doble concentración e incubada en baño maría por 4 h a 30°C. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 3200 rpm por 30 min y fueron filtradas por una membrana de 0.2 µm. Con el sobrenadante obtenido se realizaron pruebas de gota sobre placas inoculadas con *V. parahaemolyticus* para detectar la presencia de fagos liberados.

c) Infección en caldo y detección de lisógenos a partir de células lavadas

Tubos con 5 mL de caldo marino fueron inoculados con 500 μ L de una suspensión de *V. parahaemolyticus* (D.O.=1, 585 nm) y se incubaron a 35°C por 1.5 h. Posteriormente, se agregaron 500 μ L de concentrado de fago y nuevamente la muestra fue incubada a la misma temperatura por 2 h. Después de este tiempo, se colectó una alícuota de 1.5 mL en un tubo eppendorf estéril y se centrifugó a 4000 rpm por 30 min. El botón celular fue lavado dos veces con 1.5 mL de agua de mar estéril centrifugando bajo las mismas condiciones descritas anteriormente entre ambos lavados. El botón celular fue resuspendido en 1.5 mL de agua de mar estéril y una vez homogeneizada la muestra se tomó una asada de ésta y se sembró por estrías cruzadas en una placa de agar marino que fue incubada por 24 h a 35°C. Para identificar los lisógenos obtenidos se seleccionaron 30 colonias del cultivo obtenido en la prueba anterior y se sembraron por punción en placas de agar marino; las muestras se incubaron bajo las condiciones descritas previamente. Posteriormente, se llevó a cabo el método propuesto por Raya y Hébert (2009) descrito en el párrafo anterior.

7.5 Evaluación de la producción de enzimas extracelulares con la galería Api Zym

Se realizaron suspensiones bacterianas (D.O.=1, 585 nm) en caldo marino y en agua de mar artificial (ASW) con cultivos bacterianos de 24 h. La galería fue inoculada de acuerdo con las instrucciones del fabricante a partir de suspensiones bacterianas de 0 y 6 h de incubación en caldo marino y de 0 h de incubación en ASW. Una vez inoculadas, las galerías enzimáticas fueron incubadas a 35°C por 4 h. Pasado este tiempo, se añadió una gota del reactivo ZYM A y una gota del reactivo ZYM B dejando en reposo las muestras por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la galería fue expuesta 10 s a 245 nm de radiación UV, a una distancia de 15 cm por encima de las cúpulas con la finalidad de eliminar el fondo amarillo debido al exceso de compuesto que no reaccionó. La actividad enzimática fue determinada y semicuantificada de acuerdo a la intensidad de color usando la ficha de referencia Api Zym (Apéndice I).

7.6 Producción de exoenzimas

Para completar la determinación de actividad enzimática, a partir de cultivos frescos de los lisógenos se tomó un inóculo y se realizó una siembra por picadura en placas de AM enriquecido con diversos sustratos como se describe a continuación:

7.6.1 Producción de hemolisinas.

Los lisógenos fueron sembrados por punción en placas de agar sangre y se incubaron a 35° C por 96 h. El tipo de hemólisis se interpretó de acuerdo al procedimiento estándar que se basa en la coloración que se produce alrededor de la punción después del periodo de incubación. La coloración verde-grisácea se interpretó como hemólisis alfa y la coloración amarilla como hemólisis beta, con base en la degradación parcial o total de los eritrocitos, respectivamente.

7.6.2 Producción de lipasas.

La determinación se llevó a cabo por punción de los lisógenos sobre agar enriquecido con Tween 80 al 1 % (p/v). La producción de lipasa se determinó con base en la aparición de un precipitado opaco alrededor de las colonias una vez transcurridas 96 h de incubación a 35°C.

7.6.3 Producción de proteasas.

La producción de proteasa tipo tripsina se determinó a partir de punción de los lisógenos sobre placas de agar marino suplementadas con caseína al 7.5 % (p/v). La muestra fue incubada a 35°C por 96 h y una zona de aclaramiento alrededor de la colonia indicó la producción de proteasa.

7.6.4 Producción de amilasas.

La determinación se realizó mediante punción de los lisógenos sobre placas de agar marino suplementadas con almidón soluble al 0.2 % (p/v). La muestra fue incubada a 35°C por 24 h. Posteriormente, a las placas se le agregó una solución de Yoduro de Lugol en la superficie, el cual tiñe de color púrpura el medio cuando

contiene almidón. Una zona sin teñirse alrededor de la colonia indicó actividad de la amilasa.

7.7 Perfil del uso de fuentes de carbono

El perfil del uso de fuentes de carbono se determinó mediante el sistema Microlog usando placas Biolog GN2. La inoculación se hizo de acuerdo al procedimiento establecido para bacterias marinas a partir de suspensiones bacterianas realizadas en ASW en la que se ajustó la turbidez con cultivos de 24 h de cada uno de los lisógenos. Las placas se incubaron por 24 h a 35°C. Éstas constan de 95 celdas cada una con una fuente de carbono diferente y un control sin fuente de carbono. La prueba se considera positiva cuando se observa un vire de color de transparente a violeta dado por el indicador violeta de tetrazolio.

7.8 Hidrofobicidad

Se siguió el método propuesto por Rosenberg y colaboradores (1980) con algunas modificaciones. Por triplicado, suspensiones bacterianas de los lisógenos fueron ajustadas a una D.O.=0.5 a 585 nm en buffer salino de fosfatos (pH 7.2). La suspensión fue mezclada con 1 mL de xileno e incubada a 30°C por 10 min. Posteriormente, las muestras fueron homogenizadas suavemente por 2 min y posteriormente se mantuvieron en reposo por 15 min. Finalmente, la absorbancia de la fase acuosa fue medida a 585 nm y el porcentaje de partición en la fase del hidrocarburo fue calculado empleando la siguiente fórmula:

$$\frac{A_{585}(\text{suspensión bacteriana original}) - A_{585}(\text{fase acuosa})}{A_{585}(\text{suspensión bacteriana original})} \times 100$$

La interpretación de acuerdo al porcentaje de partición estuvo dada como sigue:

> 50% = fuertemente hidrofóbico, 20 – 50% = moderadamente hidrofóbico, < 20% = no hidrofóbico.

7.9 Evaluación del efecto de los lisógenos en la supervivencia de nauplios de *Artemia*.

Para este estudio se utilizó el modelo experimental desarrollado en el Laboratorio de Microbiología y Biología Experimental de CICIMAR, que consiste en infectar nauplios axénicos de *Artemia*. Para ello, quistes de *Artemia* (INVE®) se hidrataron por un lapso de 30 min en agua destilada. Posteriormente, se pasaron a un tamiz, se descapsularon con una solución de hipoclorito de sodio al 50% por 20 s y se enjuagaron repetidas veces con agua destilada estéril. Después, se realizó la desinfección en una solución de cloruro de benzalconio al 3% durante 15 s; la solución fue retirada y los quistes se lavaron con abundante agua destilada estéril. Los quistes desinfectados fueron puestos a eclosionar en 100 mL de agua de mar artificial estéril, con aireación continua (filtrada por 0.2 μ m) por 24 h. Una vez eclosionados, 100 nauplios fueron colocados en unidades experimentales con 100 mL agua de mar artificial previamente esterilizada. Se infectaron por triplicado con 600 μ L de una suspensión bacteriana de cada lisógeno de *V. parahaemolyticus* (D.O.=1, 585 nm). En el caso de los fagos γ y W, los nauplios fueron infectados con 600 μ L de suspensión bacteriana de *V. parahaemolyticus* (D.O.=1, 585 nm) y 100 μ L del concentrado de fago. Las unidades experimentales fueron incubadas a 30°C por 48 h y posteriormente se evaluó la supervivencia de los nauplios. Las supervivencias en los tratamientos con fagos fueron comparadas con un control axénico y un control con *V. parahaemolyticus* sin fago.

7.10 Evaluación del efecto de los lisógenos en la supervivencia de larvas de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*.

Para este estudio se utilizó el modelo experimental desarrollado en el Laboratorio de Microbiología y Biología Experimental de CICIMAR, que consiste en infectar nauplios de camarón blanco en condiciones gnotobióticas (Lomelí-Ortega, 2011, datos sin publicar). Muestras de camarón en estadio nauplio II-III, provenientes de la granja de camarón Acuacultura Mahr (Pichilingue, B.C.S. México), fueron transportadas en una hielera al laboratorio de microbiología donde se mantuvieron en aclimatación por 24 h. Los nauplios en estadio IV-V fueron tratados con una solución

de dióxido de cloro (50 ppm) por 5 min y enjuagados con una solución de tiosulfato de sodio (0.05 gr/500 ml), con la finalidad de obtener nauplios libres de bacterias. Posteriormente, por triplicado, 100 nauplios fueron colocados en unidades experimentales con ASW estéril y mantenidos 24 h a 30°C. Posteriormente, las larvas en estadio zoea I fueron infectadas con 600 µL de una suspensión (D.O.=1, 585nm) del lisógeno a evaluar. Las unidades fueron incubadas bajo las mismas condiciones descritas previamente en los experimentos con *Artemia* y los organismos alimentados diariamente con *Chaetoceros calcitrans* a una densidad de 100 000 cel·mL⁻¹. Finalmente, la supervivencia de las larvas fue evaluada a las 96 h post-infección comparándolas con un control sin bacterias y un control con *V. parahaemolyticus* sin fago.

7.11 Evaluación de la producción de toxinas

Ya que se ha reportado que *Vibrio* libera diversos compuestos con efectos tóxicos, se hizo una comparación entre la toxicidad de los ECP's de los lisógenos y de *V. parahaemolyticus*. Así mismo, se realizó una prueba preliminar con dos lotes de quistes de *Artemia* para determinar la Dosis Letal Media (DL₅₀) del dodecil sulfato de sodio (SDS) sobre los nauplios, usándola como referencia de toxicidad de los ECP's (Apéndice III). La diferencia entre ambos lotes es el tiempo de apertura de la lata; lote 1, con un tiempo de apertura mayor a 2 años y lote 2, con un tiempo de apertura menor de 6 meses.

7.11.1 Obtención de productos extracelulares de los lisógenos

Los productos extracelulares (ECP's) de los lisógenos y de *V. parahaemolyticus* en estado natural fueron recuperados mediante el método estandarizado de la capa de celofán descrito en Austin y colaboradores (2005). Hojas de papel celofán fueron esterilizadas y colocadas sobre placas de AM estéril; las placas fueron mantenidas 30 min a 35°C para permitir la completa adsorción del celofán sobre el agar. Posteriormente, fueron inoculadas a partir de cultivos frescos de los lisógenos en caldo marino e incubadas 48 h a 35°C. La biomasa celular fue cosechada y recuperada en tubos con buffer salino de fosfatos estéril (PBS; NaCl

137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄, 1000 mL agua desionizada, pH 7.2) en una proporción de 40 mg/mL. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 13 rpm por 5 min. El sobrenadante con los ECP's fue filtrado a través de una membrana de 0.02 µm, recuperado en tubos previamente esterilizados y mantenido a -50°C hasta su uso.

7.11.2 Evaluación de la toxicidad de los ECP's

Por separado, los quistes de ambos lotes fueron descapsulados y desinfectados de acuerdo al método descrito previamente en el párrafo 7.9 y mantenidos a 30°C con aireación continua y filtrada a través de una membrana de 0.02 µm para su eclosión. Por quintuplicado, 30 nauplios fueron colocados en tubos con 10 mL de ASW estéril e inoculados con 600 µL de los ECP's. Los tubos fueron mantenidos por 48 h a 35°C y la supervivencia de los nauplios fue comparada con 4 controles: 1) control axénico, 2) control de los ECP's de *V. parahaemolyticus* sin fago, 3) control de PBS y 4) control de SDS (DL₅₀) como referencia de toxicidad.

7.12 Análisis estadísticos

Se realizaron pruebas de normalidad y homocedasticidad de los datos; en los casos en que se cumplieron ambos supuestos, los datos fueron analizados mediante ANDEVA, de lo contrario, se realizó el análisis no paramétrico Kruskal-Wallis usando el programa Statistica®. Para detectar el tratamiento o los tratamientos que presentaron diferencias significativas, se aplicó una prueba de Tukey.

8. RESULTADOS

8.1 Inducción de lisógenos

La incorporación de los fagos a las bacterias o infección experimental ocurrió tanto en medio sólido como en medio líquido, sin embargo, el método de inducción parece ser determinante para la detección de lisógenos. Se observó que los fagos probados en el presente estudio no responden a las condiciones de inducción propuestas por Zabala y colaboradores (2009) puesto que no se detectaron fagos viables después 12 min de radiación con luz UV, mientras que con el método propuesto por Raya y Hébert (2009) fue posible detectar la formación experimental de lisógenos. Cabe mencionar que con el lavado de las células previo a la radiación con luz UV, se reducen los fagos libres y con ello se elimina la posibilidad de que el efecto sobre *V. parahaemolyticus* en prueba de gota después de la inducción sea causada por éstos.

De este modo, se obtuvieron lisógenos de *V. parahaemolyticus* con 8 de los fagos probados (α , 2, E2, S, ESE, 5c, 5s y 5+++). Lo anterior fue corroborado con la observación de zonas turbias en pruebas de gota posterior al método de inducción (Figura 1). Un lisógeno de cada fago se seleccionó y criopreservó en glicerol al 50% hasta su posterior uso.



Figura 1. Formación de placa del fago ESE sobre un cultivo de *V. parahaemolyticus*.

Los lisógenos de los fagos γ y W no fueron detectados con ninguno de los métodos de inducción utilizados en el presente estudio por lo que no pudieron ser utilizados en la determinación de los cambios bioquímicos de *V. parahaemolyticus*.

8.2 Evaluación de la producción de enzimas extracelulares con la galería Api Zym

Se observó que el caldo marino interfiere con la coloración establecida en la galería Api Zym y dificulta la determinación enzimática, por lo que se empleó ASW como medio de suspensión bacteriana. Por otra parte, ya que no se observaron diferencias en las enzimas producidas en las suspensiones de 0 y 6 h, se optó por inocular la galería a partir de suspensiones de 0 h de incubación.

En las galerías API, se observaron diferencias en la cantidad de algunas enzimas producidas por los lisógenos entre las que se incluyen lipasas, proteasas, oxidasas y una fosfatasa; sin embargo, estas diferencias sólo fueron significativas ($p < 0.05$) en la producción de Lipasa C14. Así mismo, se observó que los fagos E2 y S, inducen la producción de otras enzimas en *V. parahaemolyticus*: α -glucosidasa y α -galactosidasa, respectivamente (Tabla II).

Tabla II. Parámetros estadísticos de la producción enzimática (media/desviación estándar) y nivel de significancia (*p*)

Enzima	Control Vp	Lisógeno								<i>p</i>
		α	2	E2	S	ESE	5c	5s	5+++	
3. Esterasa (C4)	20/sv	40/sv	11.67/7.64	30/sv	16.67/11.55	16.67/5.77	13.33/5.77	13.33/5.77	13.33/5.77	0.3180
4. Esterasa lipasa (C8)	23.33/5.77	23.33/5.77	20/sv	30/sv	23.33/5.77	20/sv	20/sv	20/sv	20/sv	0.0620
5. Lipasa (C14)	13.33/5.77 ^{ab}	10/sv ^a	6.67/2.89 ^{ac}	13.33/5.77 ^{ab}	16.67/5.77 ^b	5/sv ^c	13.33/5.77 ^{ab}	10/sv ^b	8.33/2.89 ^{ab}	0.0336
6. Leucina arilamidasa	30/sv	26.67/5.77	23.33/11.55	33.33/5.77	30/sv	10/sv	26.67/5.77	30/sv	23.33/11.55	0.1044
7. Valina arilamidasa	10/8.66	6.67/2.89	6.67/2.89	10/8.66	6.67/2.89	5/sv	6.67/2.89	6.67/2.89	5/sv	0.9512
8. Cistina arilamidasa	10/8.66	6.67/2.89	6.67/2.89	10/8.66	6.67/2.89	5/sv	6.67/2.89	6.67/2.89	5/sv	0.9512
10. α -quimiotripsina	6.67/2.89	6.67/2.89	5/sv	6.67/2.89	6.67/2.89	5/sv	6.67/2.89	6.67/2.89	5/sv	0.8819
12. Naftol fosfohidrolasa	13.33/5.77	10/sv	6.67/2.89	6.67/2.89	8.33/2.89	13.33/5.77	13.33/5.77	10/sv	13.33/5.77	0.1267
13. α -galactosidasa	0/0	0/0	0/0	0/0	2.33/2.89	0/0	0/0	0/0	0/0	0.0341
16. α -glucosidasa	0/0	0/0	0/0	3.33/2.89	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0.0341
18. Quitinasa	1.67/2.89	3.33/2.89	1.67/2.89	3.33/2.89	6.67/5.77	3.33/2.89	3.33/2.89	0/0	3.33/2.89	0.5877

sv sin variación

El perfil enzimático completo de *V. parahaemolyticus* sin fago se muestra en el Apéndice I.

Las siguientes enzimas se mantuvieron sin cambios en *V. parahaemolyticus* con y sin fago: a) enzimas no producidas, β -galactosidasa, β -glucuronidasa, β -glucosidasa, α -manosidasa y α -fucosidasa; b) enzimas producidas, fosfatasa alcalina, tripsina y fosfatasa ácida.

Por otra parte, se determinó que los fagos no inducen cambios evidentes en la producción de lipasas, proteasas, amilasas y hemolisinas de la bacteria (Tabla III).

Tabla III. Efecto de los fagos en la producción de enzimas de *V. parahaemolyticus*.

LISÓGENO	LIPASAS	PROTEASAS	AMILASAS	TIPO DE HEMÓLISIS
Control Vp	+	+	+	α
α	+	+	+	α
2	+	+	+	α
E2	+	+	+	α
S	+	+	+	α
ESE	+	+	+	α
5c	+	+	+	α
5s	+	+	+	α
5+++	+	+	+	α

+ actividad enzimática positiva α hemólisis alfa

8.3 Determinación del uso de fuentes de carbono

Los fagos probados inducen cambios en el perfil del uso de fuentes de carbono de *V. parahaemolyticus* (Tabla IV). Los lisógenos α , 2, E2, S, ESE y 5+++ mostraron actividad frente a nuevos sustratos que no son empleados por la bacteria en ausencia de los fagos (Tabla V).

La actividad de *V. parahaemolyticus* sobre los siguientes sustratos no se vio modificada por la presencia de los fagos: A) Sustratos no oxidados, N-Acetil-D-Galactosamina, Adonitol, l-Eritritol, Gentiobiosa, M-Inositol, Xylitol, Ácido Lactona D-Galactónico, Ácido D-Galacturónico, Ácido D-Glucosamínico, Ácido D-Glucurónico, Ácido β -Hidroxibutírico, Ácido γ -Hidroxibutírico, Ácido Itacónico, Ácido Malónico, Ácido D-Sacárico, Ácido Sebácico, Glucuronamida, L-Fenilalanina, D-Serina, D,L-Carnitina, Ácido γ -Aminobutírico, Fenietilamina, 2-Aminoetanol, 2,3-Butanediol; B) Sustratos oxidados, α -Ciclodextrina, Dextrina, Glicógeno, N-Acetil-D-Glucosamina, L-Arabinosa, D-Fructosa, D-Galactosa, D-Manitol, D-Manosa, β -Metil-D-Glucósido, D-Trealosa, Ácido D-Glucónico, Ácido D,L-Láctico, Ácido L-Aspártico, Ácido L-Glutámico, Ácido Glicil-L-Glutámico.

Las fuentes de carbono usadas por *V. parahaemolyticus* sin fago se muestran en el Apéndice II.

Tabla IV. Cambios en el uso de fuentes de carbono de *V. parahaemolyticus* por conversión lisogénica

Fuente de carbono	Mayor actividad	Menor actividad	Inhibición de actividad
Tween 40		2, E2, ESE, 5s	
Tween 80		2, E2, 5s	
D-celobiosa			E2, S, 5s, 5+++
α -D-glucosa		E2	
α -D-lactosa			Todos
Lactulosa			Todos
D-melibiosa	α		E2, S, 5s, 5+++
D-psicosa		2, E2, S, 5+++	
L-ramnosa			Todos
D-sorbitol	α		E2, S, ESE, 5s, 5+++
Sucrosa			Todos
Turanosa		ESE	2, E2, S, 5s, 5+++
Ácido pirúvico metil-ester		2, E2, 5+++	
Ácido succínico mono-metil-ester		E2	
Ácido acético		E2	2
Ácido cis-aconítico		2,E2, S, ESE,5s,5+++	
Ácido cítrico	α		Todos, excepto α
Ácido α -hidroxibutírico	α		E2, 5s, 5+++
Ácido α -ketobutírico	α		2, E2, S, ESE, 5s, 5+++
Ácido α -ketoglutárico	α , 2		5s
Ácido α -ketoalérico			2, E2, S, ESE, 5s, 5+++
Ácido succínico		E2, 5s	

Ácido bromosuccínico		5+++	
Ácido succinámico		2, E2, S, ESE, 5s, 5+++	
L-alaninamida	α , 2		5s
D-alanina	α		5s
L-alanina	α		2, E2, S, 5s, 5+++
L-alanilglicina	α		2, E2, 5s
L-asparagina		E2, 5+++	5s
Ácido glicil-L-aspartico		5s	
L-histidina			ESE, 5s
Hidroxi-L-prolina		Todos	
L-ornitina		ESE	E2, S, 5s, 5+++
L-prolina		2, E2, S, 5+++	
L-serina		2, E2, S, 5s, 5+++	
D,L- α -glicerolfosfato		E2, S, 5s	
α -D-glucosa-1-fosfato		E2	2

Tabla V. Otras fuentes de carbono usadas por *V. parahaemolyticus* infectada con fagos.

Fuente de carbono	Lisógeno
Maltosa	Todos los lisógenos
L-fucosa	α
D-rafinosa	α , 2
Ácido fórmico	2
Ácido p-hidroxi fenilacético	α
Ácido propiónico	α , E2, S, 5+++
Ácido quínico	α
Ácido L-piroglutámico	2, S, 5+++
L-treonina	α , 2, S
Ácido urocánico	α , ESE
Putrescina	2, S, 5+++

8.4 Hidrofobicidad

La hidrofobicidad de *V. parahaemolyticus* en estado lisogénico se modifica de nula a moderada para todos los lisógenos, excepto con los lisógenos 5c y 5s. Sin embargo, los análisis estadísticos demuestran que las diferencias en la hidrofobicidad de *V. parahaemolyticus* sólo son significativas ($p < 0.05$) cuando es lisogenizado por los fagos E2 y ESE (Tabla VI).

Tabla VI. Hidrofobicidad de *Vibrio parahaemolyticus* en estado lisógeno.

Cepa	Hidrofobicidad	<i>p</i>
Vp sin fago	12.66667	
Lis 5c	8.000000	0.968095
Lis 5s	10.66667	0.999902
Lis α	25.333333	0.136952
Lis 2	22.66667	0.369459
Lis E2	29.66667	0.019369
Lis S	23.333333	0.295181
Lis ESE	30.00000	0.016532
Lis 5 +++	20.66667	0.638512

8.5 Efecto de los lisógenos en la supervivencia de *Artemia*

En la prueba de reto con *Artemia*, se observó una disminución significativa ($p < 0.01$) de la supervivencia a las 48 h en los tratamientos con los lisógenos α , 2 y E2 (Figura 2, Apéndice IV).

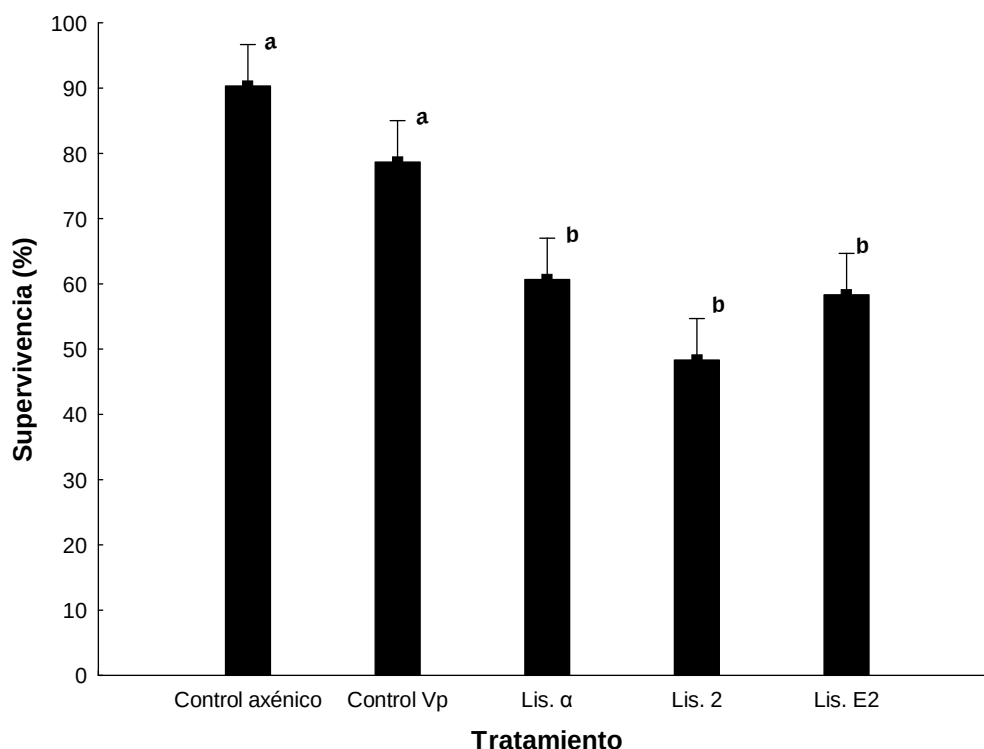


Figura 2. Supervivencia de nauplios de *Artemia* a las 48 h post-infección con *V. parahaemolyticus* y lisógenos.

Por medio de los resultados obtenidos con ANDEVA se determinó que la supervivencia de los nauplios infectados con los lisógenos S, ESE, 5c, 5s, 5+++ y las mezclas Vp/fago γ y Vp/fago W no es significativa ($p > 0.05$) con respecto a la supervivencia encontrada en los tratamientos con *V. parahaemolyticus* sin fago (Figura 3, Apéndice IV).

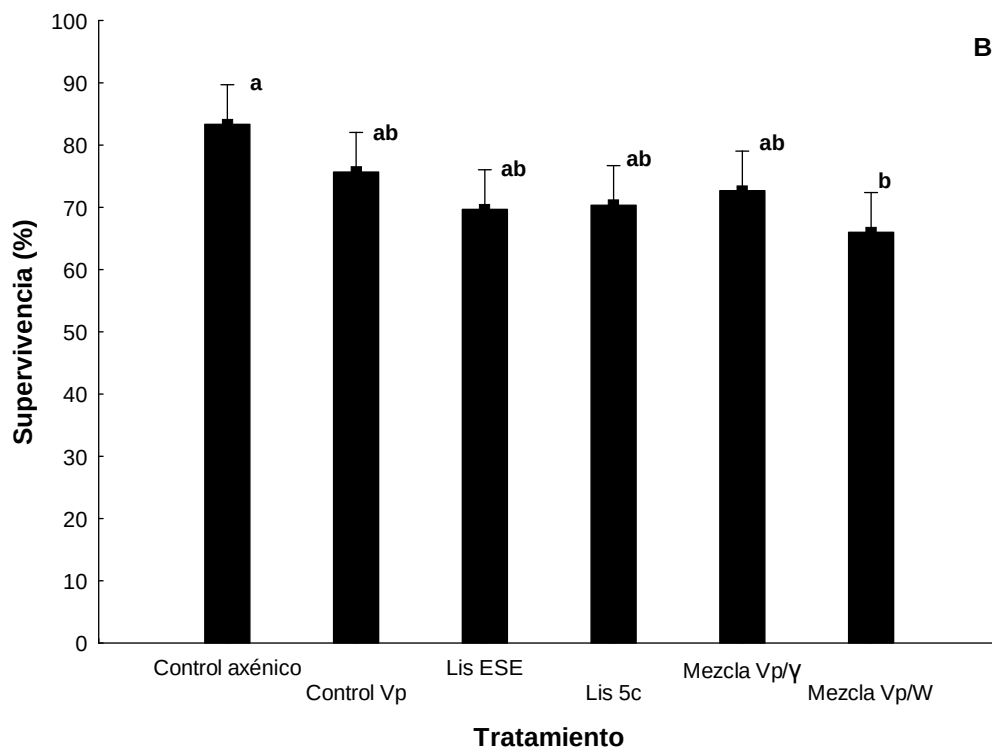
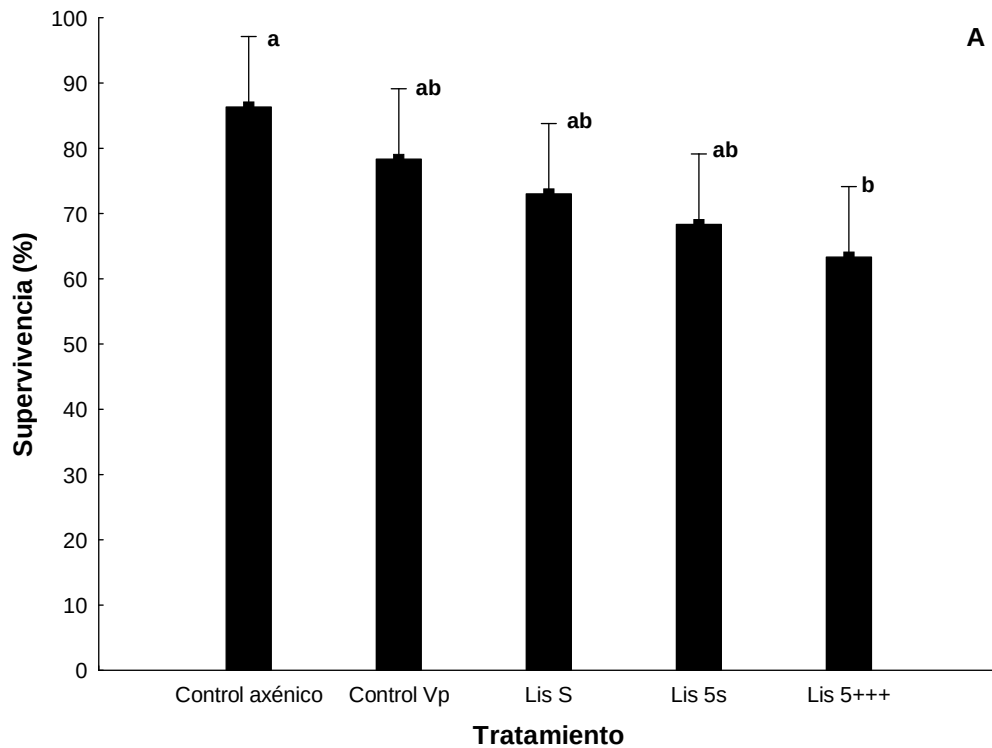


Figura 3. Efecto de los lisógenos en la supervivencia de *Artemia*. En el caso de Vp/γ y Vp/W ver detalles en el texto.

Los nauplios dañados mostraron letargo en el nado, lesiones intestinales identificadas por distensión en el tracto posterior y presencia de coloración roja y/o negra a lo largo de todo el cuerpo.

8.6 Efecto de los lisógenos en la supervivencia de camarón

Hay diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la supervivencia obtenida en el control axénico y la todos los tratamientos, incluyendo el control de *V. parahaemolyticus*. Sin embargo, la supervivencia en los tratamientos con la mezcla Vp/γ fue significativamente menor que el resto por lo que ésta disminución podría sugerir el incremento en la virulencia de la bacteria debida al fago (Figura 4, Apéndice IV). En las larvas de todos los tratamientos, exceptuando las del control axénico, se observaron daños en los lóbulos furcales y excitación de cromatóforos; en algunos tratamientos las larvas presentaron anorexia y letargo (Figura 5).

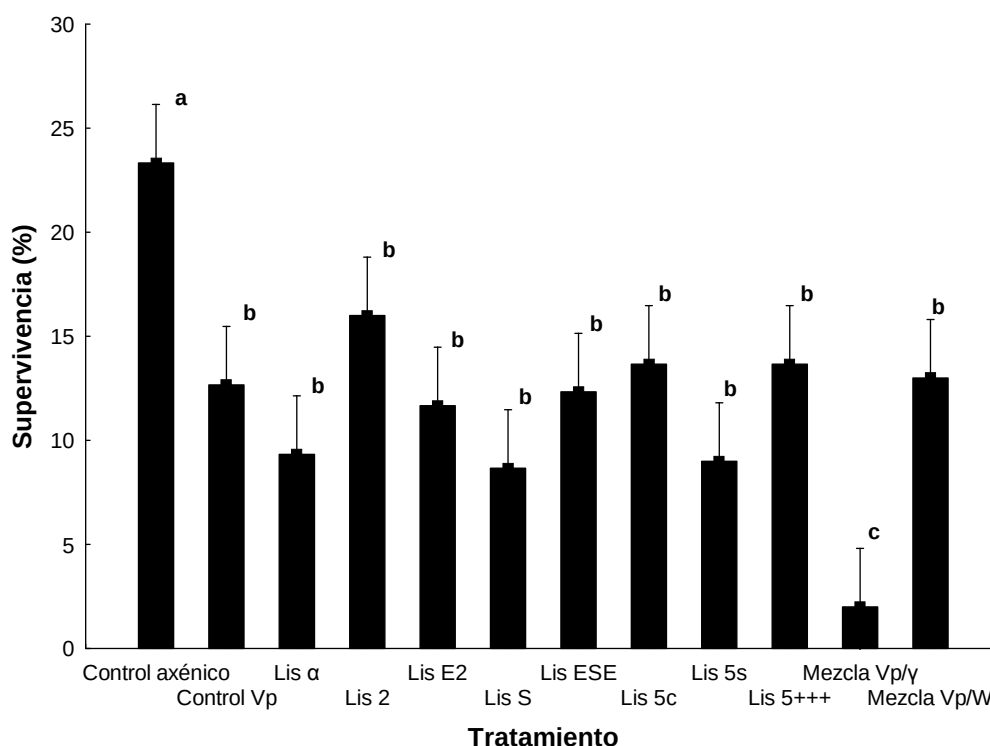


Figura 4. Supervivencia de larvas de camarón infectadas con lisógenos y mezclas bacteria-fago.

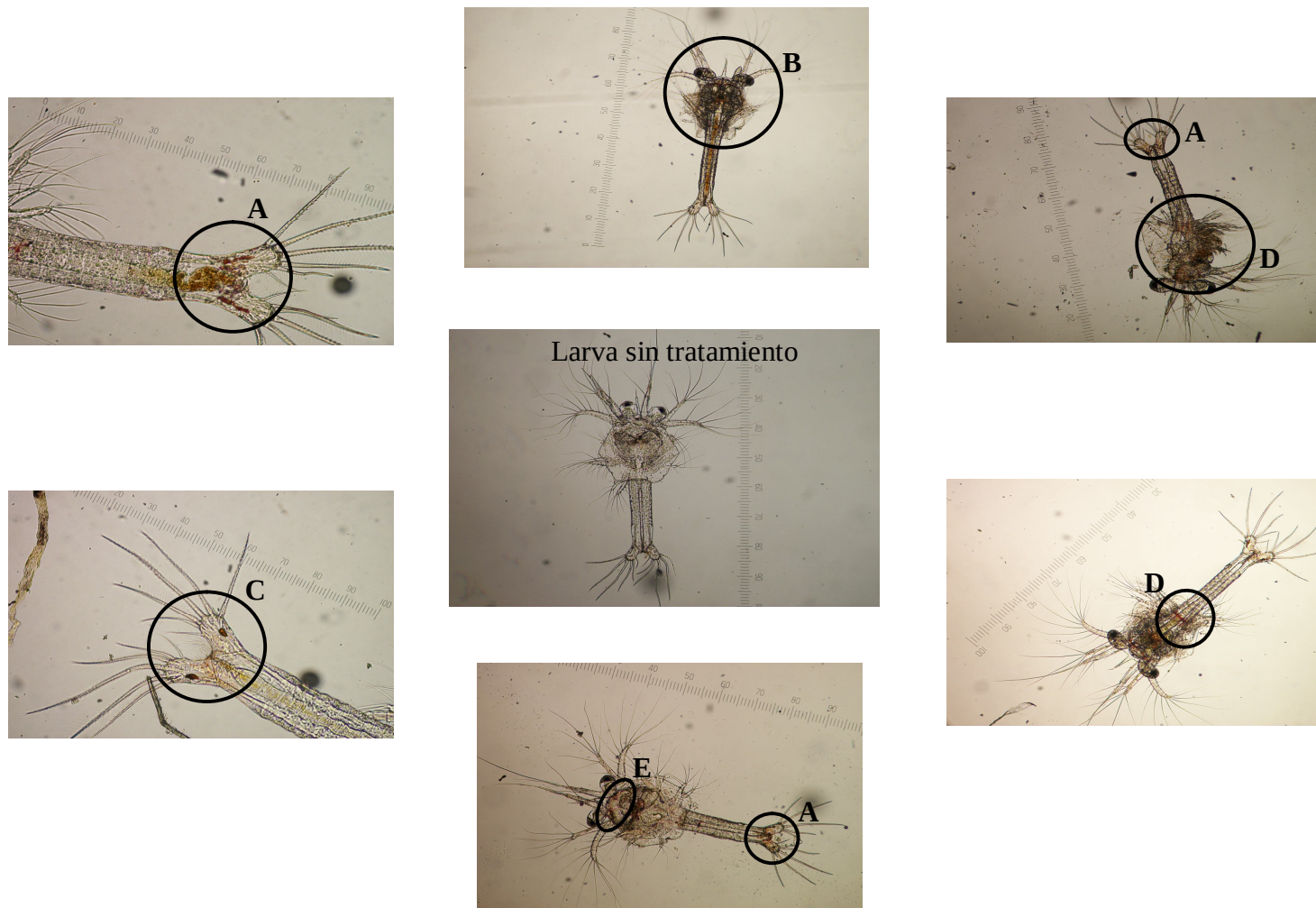


Figura 5. Daños producidos por los lisógenos en larvas de camarón. A) daños en lóbulos furcales; B) melanización; C) excitación de cromatóforos; D) daños en cefalotórax; E) daño en la base de los pedúnculos oculares.

8.7 Efecto de los ECP's en la supervivencia de *Artemia*

En las pruebas realizadas con el lote 1 se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en la supervivencia de los nauplios con los tratamientos de los lisógenos 5c y 5+++ comparada con los demás tratamientos, incluyendo la DL_{50} de SDS (Figura 6A, Apéndice V). Los nauplios del lote 2, sólo fueron sensibles a los ECP's del lisógeno 5+++ lo que se vio reflejado en una disminución significativa ($p < 0.05$) en la supervivencia (Figura 6B, Apéndice V). Al igual que con la DL_{50} de SDS, la sensibilidad de los nauplios a los ECP's aparentemente depende de la calidad del lote y, en consecuencia, del estado de salud de los organismos.

Cabe mencionar que en ambos lotes los nauplios fueron más sensibles a los ECP's del lisógeno 5+++ que al SDS, lo cual sugiere que podría tratarse de una toxina.

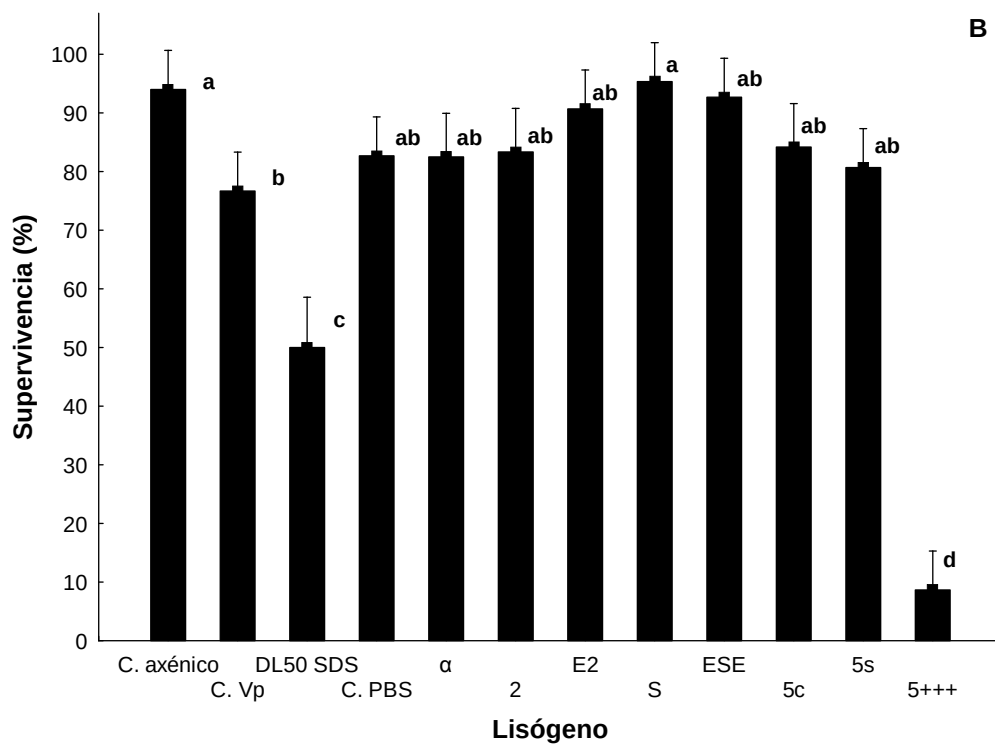
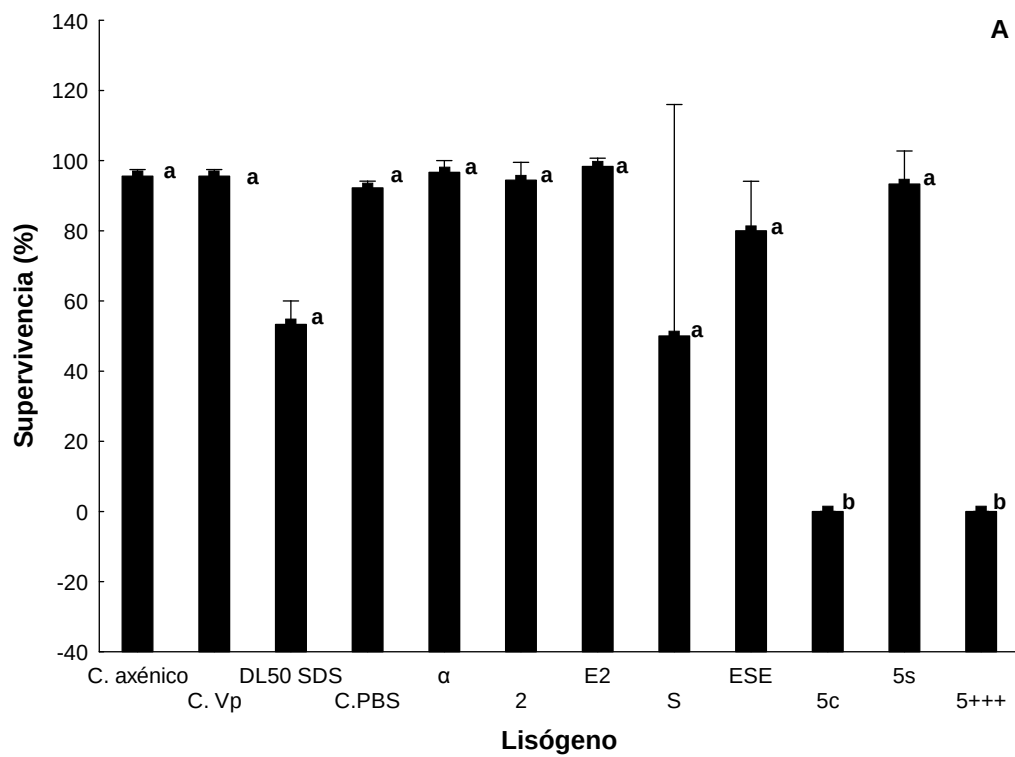


Figura 6. Efecto de los ECP's en la supervivencia de *Artemia*. A) lote 1, B) lote 2

9. DISCUSIÓN

9.1 Inducción de profagos

Cuando una bacteria es lisogenizada puede adquirir nuevas características que están involucradas o no en la virulencia. De manera natural las bacterias liberan compuestos, ya sea con actividad antimicrobiana, o relacionados con la virulencia, así como enzimas que hidrolizan diversas moléculas (Nair & Simidu, 1987; Arnosti & Repeta, 1994; Manefield *et al.*, 2000). Por lo anterior es importante asegurar la formación de lisógenos, ya que son indispensables para poder evaluar los cambios que ocurren en las bacterias tras la infección con fagos.

A pesar que se ha reportado que la infección con fagos no es un proceso sencillo (Rojas, 2005) en el presente trabajo la formación experimental de lisógenos ocurrió con dos de los métodos usados. Sin embargo, la detección de las colonias lisogénicas implica ajustes en el método y el tiempo de inducción, pues no todos los lisógenos son inducidos con un solo tratamiento. Aunque se ha reportado que la producción de fagos inducidos con mitomicina C es mayor que la inducida con luz UV (Weinbauer & Suttle, 1996), este último es un tratamiento menos agresivo y tóxico por lo que fue seleccionado como agente inductor para el presente estudio. En la mayoría de los reportes de inducción con UV, se indican tiempos cortos de exposición (Lwoff *et al.*, 1950; Jiang & Paul, 1998; Raya & Hébert, 2009). Esto también coincide con lo observado en el presente trabajo donde fueron suficientes 30 s para la inducción de lisógenos. Se ha reportado que tiempos de 60, 90 y 120 s resultan en la activación del ciclo lítico de profagos (Lwoff *et al.*, 1950). No obstante que Zabala y colaboradores (2009) establecieron que 12 min de exposición de los lisógenos a la luz UV es suficiente para inducir la replicación del fago, la inducción de los lisógenos reportados en este estudio se afectó a los 3 min de exposición a luz UV, ya que no se detectaron fagos sobre *V. parahaemolyticus* en la prueba de gota. Tark (2009) menciona que el espectro de luz UV de 295 a 320 nm es absorbido por el ADN, lípidos y proteínas, por lo que de acuerdo con lo observado, es posible deducir que tiempos de exposición a luz UV superiores a 3 min causaron daños

irreparables en el ADN y posiblemente en algunas proteínas involucradas en la reparación de la molécula, lo que a su vez inhibió la activación del ciclo lítico de los fagos por lo que no fueron detectados en las pruebas de gota.

Los fagos γ y W no fueron detectados después de aplicar el método de inducción. Existen casos de lisogenia donde el genoma del fago se inserta en el cromosoma bacteriano y se requiere de métodos de inducción con mitomicina C que ha sido reportada como un agente inductor más potente que la luz UV para lisógenos de *Listeria* spp. (Loessner *et al.*, 1991; Khemayan *et al.*, 2006; Pasharawipas *et al.*, 2008). Es probable que los fagos γ y W hayan requerido de sustancias químicas como ésta, ya que no fue posible detectar la liberación de estos fagos aun exponiendo las células hasta 12 min a luz UV, por lo que a falta de evidencias de la formación de lisógeno se decidió omitirlos.

9.2 Cambios en las propiedades de *V. parahaemolyticus* por conversión lisogénica

En el presente estudio se determinó que los fagos lisogénicos modifican de formas diversas las propiedades de *V. parahaemolyticus*. Todos los fagos estudiados modifican algunos atributos fisiológicos de la bacteria, relacionados básicamente con su crecimiento y reproducción, como es el uso de determinadas fuentes de carbono y la producción de algunas enzimas.

Los grupos enzimáticos en los que se observaron más modificaciones por la presencia de los fagos fueron las lipasas (esterasa C4, esterasa lipasa C8 y lipasa C14) y proteasas (leucina arilamidasa, valina arilamidasa, cistina arilamidasa y α -quimiotripsina) involucradas básicamente en el crecimiento bacteriano. Y, aunque no se observaron diferencias significativas en la cantidad de enzima liberada con respecto a la bacteria sin fago, se observó una tendencia a disminuir su producción, lo que podría sugerir una menor necesidad energética de la bacteria. Vidgen y colaboradores (2006) encontraron que el fago VHML inhibe la producción de algunas enzimas así como el uso de D-gluconato. Así mismo, Chen y colaboradores (2005)

encontraron que después de la infección con el fago λ el gen *pckA* de *E. coli*, que codifica un gen crítico para la gluconeogénesis, se suprime completamente. Ya que se ha propuesto que la lisogenia es una estrategia para la supervivencia del fago bajo condiciones desfavorables (Mobberley *et al.*, 2010), es posible que estas características se empleen para conservar energía y asegurar la supervivencia bajo determinadas condiciones (Paul, 2008). Así mismo, el uso de fuentes de carbono de la bacteria también se modifica por la infección con fagos lisogénicos. De acuerdo con los resultados obtenidos en el sistema BIOLOG se determinó que *V. parahaemolyticus* asimila parcialmente la melibiosa como fuente de carbono, sin embargo, cuando es infectada con el fago S la utilización de esta fuente se suprime; a su vez, el fago induce la expresión de la enzima α -galactosidasa que actúa sobre la melibiosa liberando glucosa y galactosa que *V. parahaemolyticus* utiliza de manera más eficiente. Esta enzima ha sido reportada en otras especies como el hongo *Aspergillum niger* y la bacteria hipertermófila *Thermotoga marítima* donde es altamente estable a 85°C (Liebl *et al.*, 1998; Vries *et al.*, 1999). La enzima también es utilizada para el tratamiento de la enfermedad de Fabry en humanos (Ortiz y Marrón, 2003). De igual manera se determinó que la maltosa no es utilizada como fuente de carbono por *V. parahaemolyticus* sin fago, sin embargo, como lisógeno es capaz de utilizarla o hidrolizarla ya que el fago E2 indujo la expresión de maltasa, una enzima que hidroliza la maltosa liberando los mismos monosacáridos ya mencionados anteriormente. Resultados similares obtuvieron Blashka y colaboradores (1982), quienes detectaron una baja utilización de glucosa y glucosa-6-fosfato en células no infectadas de *Anacystis nidulans*, sin embargo, después de la infección con el fago AS-1 la asimilación de estos compuestos se incrementó marcadamente. En este sentido la conversión lisogénica puede proporcionar a la bacteria ventajas adaptativas sobre cepas relacionadas no lisógenas bajo situaciones ecológicas especiales. Es decir, los lisógenos de *V. parahaemolyticus* podrían ocupar nuevos nichos y aprovechar nuevos sustratos si estos se encuentran disponibles, al mismo tiempo pueden emplear rutas alternativas para la obtención de sus requerimientos nutricionales o inhibir algunas de ellas para conservar energía hasta que se presenten condiciones favorables para el crecimiento y reproducción bacterianos.

Campbell (2006) menciona que durante la lisogenia los fagos inhiben o codifican algunas enzimas usadas para su replicación, cuando se encuentran insertados en el cromosoma o como plásmidos, respectivamente. Por otra parte, Vidgen y colaboradores (2006) sugieren que las variaciones en el fenotipo son producidas por los sitios en los que se inserta el fago dentro del cromosoma bacteriano. Los resultados obtenidos en el presente estudio apoyan esta hipótesis dado que *V. parahaemolyticus* pudo utilizar o no determinadas fuentes de carbono al estar en asociación con cada fago.

Se ha sugerido que las hemolisinas pueden contribuir a la patogenicidad de una bacteria (Liu *et al.*, 1996). Estudios previos han reportado que la infección de *V. harveyi* con el fago denominado VHML (Oakey & Owens, 2000) incrementa la actividad hemolítica de la bacteria y, en consecuencia, la capacidad de la bacteria para inducir mortalidades en el salmón del Atlántico y *Artemia* (Austin *et al.*, 2003; Munro *et al.*, 2003). Sin embargo, no todas las bacterias patógenas poseen esta propiedad. Sudhesh y Xu (2001) determinaron una baja producción de hemolisinas en la cepa 25C de *V. parahaemolyticus* siendo altamente virulento para *Penaeus monodon*. Así mismo, en el presente estudio no se observó un incremento en la actividad hemolítica de los lisógenos con respecto a la actividad hemolítica de *V. parahaemolyticus* sin fago y en consecuencia no hubo una relación directa entre estas observaciones y la virulencia hacia *Artemia* y camarón.

Con respecto a la hidrofobicidad de la bacteria, se observó que ésta también se modifica después de la infección con fagos lisogénicos de nula a moderada. Resultados similares obtuvieron Lachica y colaboradores (1984), quienes observaron un incremento en la hidrofobicidad de *Yersinia enterocolitica* al ser infectada con un plásmido virulento y sugieren que esta característica modula la adherencia de la bacteria al tejido epitelial durante la patogénesis. Por lo tanto, el carácter hidrofóbico de la superficie bacteriana es una propiedad importante en la interacción parásito-hospedero (Dai *et al.*, 1992). La mayoría de los fagos del presente estudio incrementaron la hidrofobicidad de *V. parahaemolyticus*, no obstante, tampoco se

observó una relación directa entre estas observaciones y las mortalidades inducidas en las pruebas de reto.

Se ha reportado que todos los *Vibrios* patógenos liberan quitinasas (Baumann *et al.*, 1980), lo que coincide con los resultados obtenidos en este estudio. La galería Api Zym incluye 1-naftil-N-acetil- β D-glucosaminido como sustrato para determinar la producción de quitinasa. La mayoría de los fagos incrementó la producción de esta enzima en *V. parahaemolyticus* lo que en conjunto con el carácter hidrofóbico, podrían explicar la variación en la manifestación de los daños producidos por la bacteria en los larvicultivos de camarón. Finalmente, la patogenicidad es un mecanismo multifactorial, y un sólo factor no puede ser determinante del grado de virulencia bacteriana.

9.3 Incremento en la virulencia bacteriana mediada por fagos

En el presente estudio se demostró que algunos fagos lisogénicos pueden mediar la virulencia de *V. parahaemolyticus* hacia *Artemia* y camarón.

Por cuestiones de manejo, la prueba de reto con *Artemia* se llevó a cabo en tres partes, incluyendo en cada caso un control axénico y un control con la bacteria sin fago. En el primer reto (fagos α , 2 y E2), se observaron mortalidades altamente significativas ($p < 0.01$) en los nauplios; del 32% con el lisógeno α , del 36% con el lisógeno E2 y hasta un 47% con el lisógeno 2, comparadas con las mortalidades producidas por la bacteria sin fago (12%). Estos resultados coinciden con lo reportado por Austin y colaboradores (2003), quienes observaron un incremento en la mortalidad hasta del 100% en nauplios de *Artemia* a las 48 h de ser infectados con lisógenos de *V. harveyi*. En el segundo (fagos S, 5s y 5+++) y tercer reto (fagos ESE, 5c y las mezclas Vp/fago γ y Vp/fago W) no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

En lo que respecta al camarón el porcentaje de mortalidad con los lisógenos α , S y 5s, fue mayor que el observado en nauplios de *Artemia* (61%) sin embargo, en

este caso la bacteria sin fago también provocó una mortalidad significativa (43%). No obstante, en el tratamiento con la mezcla Vp/fago y se observó una mortalidad del 91%, siendo ésta significativa ($p < 0.01$) con respecto al control axénico y al control de la bacteria sin fago.

De manera general, los crustáceos poseen un sistema de defensa basado en efectores celulares y humorales para eliminar microorganismos potencialmente infecciosos (Rendón & Balcázar, 2003), por lo que se esperaba que los resultados obtenidos con el modelo de camarón fueran similares a los obtenidos con el modelo de *Artemia*. Sin embargo, de acuerdo con los datos obtenidos, los nauplios de *Artemia* fueron más sensibles a la virulencia de los lisógenos. Se ha reportado que el exoesqueleto de *Artemia* es fino (< 1 mm), flexible y no está calcificado (Bartolomé, 2005) a diferencia del exoesqueleto del camarón que se encuentra mineralizado con carbonato de calcio como principal componente inorgánico y trazas de magnesio y fosfato (Vijayan & Diwan, 1996). Es probable que esta característica influyera en los resultados obtenidos, pues como se mencionó previamente, los fagos incrementaron la hidrofobicidad y producción de quitinasa de *V. parahaemolyticus*, lo que convierte a la *Artemia* en una presa más susceptible reflejándose en los daños producidos en los nauplios y las altas mortalidades encontradas con algunos lisógenos.

Por otra parte, en la prueba de reto con camarón, la mortalidad producida en todos los tratamientos podría ser consecuencia de la baja calidad de las larvas, lo que también se vio reflejado en la baja supervivencia del control axénico (23%). Para alcanzar la maduración de los camarones en los laboratorios, se les somete a un proceso de ablación unilateral, es decir, la eliminación de un pedúnculo ocular de las hembras que inhibe la hormona inhibidora de la gónada y permite que la maduración de los ovarios sea de forma continua, lo que trae como consecuencia un deterioro en la calidad del desove (Bray & Lawrence, 1990; Harrison, 1990; Hidalgo, 1997). Los desoves de las hembras producen un gran desgaste fisiológico y con el tiempo la cantidad y calidad de los nauplios disminuye (Hidalgo, 1997). Cabe mencionar que cuando se realizó la prueba de reto con camarón la producción en la granja estaba

por concluir por lo que los organismos proporcionados probablemente provenían de hembras con un gran desgaste fisiológico, lo cual se vio reflejado en la baja supervivencia de los organismos en el control axénico y en el mayor grado de infección con *V. parahaemolyticus* con y sin fago. Por este motivo es importante realizar las pruebas de reto con larvas de los desoves de las hembras tienen un desgaste fisiológico menor.

9.4 Efecto de los ECP's de los lisógenos en la supervivencia de *Artemia*

Productos extracelulares (ECP's) obtenidos a partir de algunas cepas de *Vibrio* han sido reportados como factores de virulencia en un amplio rango de organismos marinos (Fukasawa *et al.*, 1988; Austin *et al.*, 2005). Entre los productos extracelulares del género *Vibrio* se incluyen exoenzimas y exotoxinas, sin embargo, en acuicultura poco se sabe acerca de los cambios en la toxicidad de los mismos después de una infección con fagos lisogénicos.

En este estudio, la toxicidad de los ECP's de los lisógenos de *V. parahaemolyticus* fue evaluada en nauplios de *Artemia* por la facilidad de su manejo y porque ha sido reportada en pruebas estándar de toxicidad. El daño producido por los ECP's de los lisógenos α , 2 y E2, que causaron altas mortalidades en la prueba de reto con *Artemia*, no fue significativamente diferente al efecto de la bacteria sin fago. Por el contrario, los ECP's del lisógeno 5+++ causaron una disminución significativa en la supervivencia de *Artemia*. Es posible que el proceso de patogénesis del lisógeno 5+++ involucre la presencia de compuestos altamente tóxicos. Se ha reportado que las exotoxinas pueden ser secretadas al medio de cultivo bacteriano o permanecer temporalmente en el citoplasma o periplasma y ser liberadas durante la lisis bacteriana (Salyers & White, 1994). Esto explicaría el hecho de que el lisógeno 5+++ no causó mortalidades significativas en las pruebas de reto, pero sí sus productos extracelulares. Así mismo, teniendo en cuenta que el SDS es un compuesto puro y que los ECP's están constituidos por una serie de compuestos donde sólo una pequeña parte correspondería a una posible toxina, se sugiere que el lisógeno 5+++ induce la expresión de una molécula altamente tóxica. Nair y Simidu

(1987) reportaron que la cepa *V. parahaemolyticus* 17802 produce una forma anhidrada de la tetrodotoxina, una forma ligeramente tóxica, que es convertida a tetrodotoxina en suspensión, una forma altamente tóxica. Esto sugiere que el fago 5+++ podría haber inducido un incremento en la expresión de esta toxina o alguna similar lo que explicaría algunos de los síntomas observados en *Artemia* y camarón, como el letargo. Ruangpan y colaboradores (1999) también sugirieron la posibilidad de que el incremento en la virulencia de lisógenos de *V. harveyi* podría estar relacionado con la producción de una toxina ya existente promovida por el fago. No obstante, es probable que el genoma del fago sea el que codifique un compuesto con propiedades altamente tóxicas.

En el presente estudio se trabajó con dos lotes de *Artemia*, tanto para estandarizar el ensayo con SDS como para evaluar la toxicidad de los ECP's. La DL₅₀ de SDS fue evaluada con cada 2 lotes con fechas de apertura diferentes. Se ha reportado que la baja calidad de los quistes se ve reflejado en una baja eclosión si han permanecido enlatados por mucho tiempo (Valverde, 2006), lo que coincide con lo observado con el lote 1, así mismo esto podría reflejarse en la susceptibilidad de los quistes y nauplios a infecciones. Los resultados del presente estudio demuestran que los nauplios del lote 1 fueron más susceptibles, pues los ECP's de los lisógenos 5c y 5+++ causaron 100% de mortalidad en 48 h, en tanto que en los nauplios del lote 2 se observó un 91% de mortalidad en los tratamientos con los ECP's del lisógeno 5+++.

Esta condición apoya la idea de que las infecciones por parte de los patógenos oportunistas se presentan con mayor frecuencia en organismos inmunosuprimidos.

9.5 Implicaciones de la conversión lisogénica en la camaronicultura

En acuicultura de camarón, la lisogenia tiene implicaciones importantes, pues un fago puede ser portador de genes de resistencia y cuando éste es capaz de infectar a más de un hospedero, surge la posibilidad de intercambio genético entre las bacterias, que desde el punto de vista de salud humana, puede implicar el intercambio de genes de resistencia a los antibióticos (Flegel *et al.*, 2005). Por otra

parte, cuando los fagos aislados de patógenos de camarón son portadores de genes de virulencia, inducen mayores mortalidades en los cultivos.

10. CONCLUSION

- ✚ Los fagos lisogénicos estudiados en el presente estudio modifican los atributos fisiológicos de *V. parahaemolyticus*, los cuales se ven reflejados en cambios en la hidrofobicidad, así como en la producción de enzimas y el uso de determinadas fuentes de carbono.
- ✚ Los cambios en la fisiología de *V. parahaemolyticus* inducidos por fagos no son determinantes de virulencia para *Artemia* y camarón.
- ✚ Los fagos lisogénicos α , 2 y E2 incrementan significativamente la virulencia de *V. parahaemolyticus* hacia nauplios de *Artemia*.
- ✚ La mezcla Vp/ γ induce un incremento significativo en la virulencia de *V. parahaemolyticus* hacia larvas de camarón, en tanto que los demás lisógenos median los signos aparentes de vibriosis en los organismos.
- ✚ El efecto de los lisógenos en la supervivencia de *Artemia* no está directamente relacionado con lo observado en larvas de camarón.
- ✚ Los productos extracelulares del lisógeno 5+++ inducen mortalidades significativas en *Artemia*.

11. RECOMENDACIONES

- ✚ Puesto que los fagos γ y W no fueron inducibles con luz UV, se recomienda el uso de sustancias químicas como la mitomicina C.
- ✚ Diversos estudios han comparado métodos para la determinación de hidrofobicidad obteniendo resultados distintos con cada uno de ellos, por lo que se recomienda analizar la hidrofobicidad de los lisógenos de *V. parahaemolyticus* con otros métodos.
- ✚ Para las pruebas de reto con camarón, se recomienda usar organismos de los desoves iniciales para obtener una mejor calidad de los nauplios.

12. BIBLIOGRAFIA

- Abedon, S.T. 1994. Lysis and the interaction between free phages and infected cells. En: J. Karam, J.W. Drake, K.N. Kreuzer, G. Mosig, D.H. Hall, F.A. Eiserling & L.W. Black (eds). Molecular Biology of Bacteriophage T4. Amer. Soc. Microbiol. Washington, D.C.
- Ackermann, H.W. 2003. Bacteriophage observations and evolution. Res. Microbiol. **154**: 245-251
- Ackermann, H.W. 2005. Chapter 4: Bacteriophage Classification. En: E. Kutter & A. Sulakvelidze (eds). Bacteriophages: Biology and Applications. CRC Press. New York.
- Ackermann, H.W. & M.S. DuBow. 1987. Viruses of prokaryotes. CRC Press Inc. Boca Raton, Fl. 480 p
- Aguirre, G.G. & V.F. Ascencio. 2000. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. Resent Res. Devl. Microbiol. **4**: 333-348
- Aguirre-Guzmán, G., H. Mejía & F. Ascencio. 2004. A review of extracelular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. Aquacult. Res. **35**: 1395-1404
- Armentrout, R.W. & L. Rutberg. 1971. Heat induction of $\phi 105$ in *Bacillus subtilis*: replication of the bacterial and bacteriophage genomes. J. Virol. **8**: 455-468
- Arnosti, C, 2011. Microbial extracellular enzymes and the marine carbon cycle. Ann. Rev. Mar. Sci. **3**: 401-425.
- Arnosti, C. & D.J. Repeta. 1994. Extracellular enzyme activity in anaerobic bacterial cultures: evidence of pullulanase activity among mesophilic marine bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **60**: 840-846
- Austin, B., A.C. Pride, & G.A. Rhodie. 2003. Association of a bacteriophage with virulence in *Vibrio harveyi*. J. Fish. Dis. **26**: 55–58.
- Austin, B. D. Austin, R. Sutherland, F. Thompson & J. Swings. 2005. Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia* nauplii. Environ. Microbiol. **7**: 1488-1495.
- Barksdale, L. & S.B. Arden. 1974. Persisting bacteriophage infections, lysogeny, and phage conversions. Annu. Rev. Microbiol. **28**:265–299

- Bartolomé, C. M. Valoración del riesgo toxicológico sobre larvas de “Artemia” de desinfectantes utilizados en torres de refrigeración. Memoria. Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. Madrid. 2005. 201 p
- Bastías, R., G. Higuera, W. Sierralta & R.T. Espejo. 2010. A new group of cosmopolitan bacteriophages induce a carrier state in the pandemic strain of *Vibrio parahaemolyticus*. Environ. Microbiol. **12**: 990-1000
- Baumann, P., L. Baumann, S. Bang & M. Woolkalis. 1980. Reevaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckea*, and *Photobacterium*: abolition of the genus *Beneckea*. Curr. Microbiol. **4**: 127-132
- Betley, M.J. & J.J. Mekalanos. 1985. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by a phage. Sci. **229**: 185-187
- Blashka, K.H., L. Hwang-Lee, G. Cohn, J. Blamire & R.E. McGowan. 1982. Altered metabolite incorporation into the cyanobacterium *Phormidium uncinatum* after cyanophage LPP- infection. FEMS Microbiol. Lett. **33**: 69-72
- Boyd, F. Bacteriophages and bacterial virulence. 2005. Chapter 8. En: E. Kutter & A. Sulakvelidze (eds). Bacteriophages: Biology and Applications. CRC Press. Washington, D.C.
- Bradley, D.E. 1967. Ultraestructure of bacteriophages and bacteriocins. Bacteriol. Rev. **31**: 230-314
- Bray, W. & A. Lawrence. 1990. Reproduction of eyestalk-ablated *Penaeus stylirostris* fed various levels total dietary lipids. World Aquacult. Soc. **21**: 41-52
- Cai, J., Y. Han & Z. Wang. 2006. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from abalone (*Haliotis diversicolor supertexta* L.) postlarvae associated with mass mortalities. Aquacult. **257**: 161-166
- Campbell, A. 2006. Chapter 7: General aspects of lysogeny. En: R. Calendar (ed). The bacteriophages. Oxford. New York
- Chang, B., H. Taniguchi, H. Miyamoto & S. Yoshida. 1998. Filamentous bacteriophages of *Vibrio parahaemolyticus* as a posible clue to genetic transmission. J. Bacteriol. **180**: 5094-5101

- Chen, F.R., P.C Liu & K.K. Lee. 2000. Lethal attribute of serine protease secreted by *Vibrio alginolyticus* strains in Kurama Prawn *Penaeus japonicus*. Zool. Natur. **55**: 94–99
- Chen, L., Y. Yang, J. Yu, Z. Yao, L. Sun, Y. Shen & Q. Jin. 2005. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. Nucleic Acids Res. **33**: 325-328
- Chen, Y., I. Golding, S. Sawai, L. Guo & E.C. Cox. 2005. Population fitness and the regulations of *Escherichia coli* genes by bacterial viruses. PLoS Biol. **3**: 1276-1282.
- Chibani-Chennoufi, S., A. Bruttin, M.L. Dillmann & H. Brussow. 2004. Phage-host interaction: An ecological perspective. J. Bacteriol. **186**: 3677-3686
- Clokier, M., J. Shan, S. Bailey, Y. Jia, H. Krisch, S. West & N. Mann. 2006. Transcription of a 'photosynthetic' T4-type phage during infection of a marine cyanobacterium. Environ. Microbiol. **8**: 827-835
- Coates, M. 1975. Gnotobiotic animals in research: their uses and limitations. Lab. Anim. **9**: 275-282
- Dai, J., Y. Lee & H. Wong. 1992. Effects of iron limitation on production of a siderophore, outer membrane proteins, and hemolysin and on hydrophobicity, cell adherence, and lethality for mice of *Vibrio parahaemolyticus*. Infect. Immun. **60**: 2952-2956
- Dammeyer, T., S.C. Bagby, M.B. Sullivan, S.W. Chisholm & N. Frankenberg-Dinkel. 2008. Efficient phage-mediated pigment biosynthesis in oceanic cyanobacteria. Curr. Biol. **18**: 1-7
- DePaola, A., J. Ulaszek, C.A. Kaysner, B.J. Tenge, J.L. Nordstrom & J. Wells. 2003a. Molecular, serological, and virulence characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from environmental, food, and clinical sources in North America and Asia. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 3999-4005
- DePaola A., J.L. Nordstrom, J.C. Bowers, J.G. Wells & D.W. Cook. 2003b. Seasonal abundance of total and pathogenic *V. parahaemolyticus* in Alabama oysters. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 1521-1526

- Direkbusaram, S, M. Yoshimizu, Y. Ezura, L. Ruangpan & Y. Danayadol. 1998. *Vibrio* spp. the dominant flora in shrimp hatchery against some fish pathogenic viruses. Short Communication. J. Mar. Biotechnol. **6**:266-267.
- Fauci, A., E. Braunwald, D.L. Kasper, S.L. Hauser, D.L. Longo, J.L. Jameson & J. Loscalzo. 2008. Harrison's principles of internal medicine. McGraw-Hill Professional. United States.
- Fink, P.S. & S.A. Zahler. 2006. Chapter 35: Temperate bacteriophages of *Bacillus subtilis*. En: R. Calendar (ed). The bacteriophages. Oxford University Press. New York.
- Flegel, T.W., T. Pasharawipas, L. Owens & H.J. Oakey. 2005. Evidence for phage-induced virulence in the shrimp pathogens *Vibrio harveyi*. En: P. Walter, R. Lester & M.G. Bondad-Reantaso (eds). Diseases in Asian Aquaculture V. Fish Health Section, Asian Fisheries Society. Manila.
- Freeman, V.J. 1951. Studies on virulence of bacteriophage infected strains of *Corynebacterium diphtheria*. J. Bacteriol. **61**: 675-688.
- Fukasawa, S., K. Nakamura, M. Miyahira & M. Kurata. 1988. Some properties of two proteinases from a luminous bacterium, *Vibrio harveyi* strain FLN-108. Agric. Biol. Chem. **52**: 3009-3014
- Goarant, C., J. Herlin, R. Brizard, A.L. Marteau, C. Martin & B. Martin. 2000. Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp. Dis. Aquat. Org. **40**: 101-107
- Goebel, W., T. Chakraborty & J. Kreft. 1988. Bacterial hemolysins as virulence factors. A. van Leeuw. **54**: 453:463.
- 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. En: F. Páez-Osuna (ed). Camaronicultura y Medio Ambiente. UNAM. México.
- Gullian, K.M. 2001. Efecto del estudio inmunoestimulante de bacterias prebióticas asociadas al cultivo de *Penaeus vannamei*. Tesis. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. 64 p

- Guttman, B., R. Raya & E. Kutter. 2005. Chapter 3: Basic phage biology. En: Kutter, E. y A. Sulakvelidze (eds). Bacteriophages: Biology and Applications. CRC Press. New York.
- Harrison, K., 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. J. Shellfish Res. **9**: 1-28
- Hartford, O.M. & B.C.A. Dowds. 1992. Cloning and characterization of genes induced by hydrogen peroxide in *Bacillus subtilis*. J. Gen. Microbiol. **138**: 2061-2068
- Havaux, M., G. Guedeney, Q. He & A.R. Grossman. 2003. Elimination of high-light-inducible polypeptides related to eukaryotic chlorophyll *a/b*-binding proteins results in aberrant photoacclimation in *Synechocystis* PCC6803. Biochim. Biophys. Acta. **1557**: 21-33
- Heitmann, G.I., L. Jofré, J.C. Hormázabal, A. Olea, C. Vallebuona & C. Valdés. 2005. Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por *Vibrio parahaemolyticus*. Rev. Chil. Infect. **22**: 131-140
- Hernández, C., J. Ulloa, J.A. Vergara, R. Espejo & F. Cabello. 2005. Infecciones por *Vibrio parahaemolyticus* e intoxicaciones por algas: problemas emergentes de salud pública en Chile. Rev. Méd. Chile. **133**: 1081-1088
- Hershey, A.D. 1971. The bacteriophage lambda. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour. New York.
- Hidalgo, Z.M. 1997. Efecto de la composición nutricional de Artemia enriquecida en la reproducción de Penaeus vannamei. Tesis. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador. 81 p
- Iñiguez-Palomares, C. & E. Acedo-Félix. 2006. Mecanismos de adhesión al tracto intestinal y antagonismo de *Bifidobacterium*. Rev. Salud Públ. Nutr. Vol. 7. No. 2
- Jayasree, L., P. Janakiram & R. Madhavi. 2006. Characterization of *Vibrio* spp. Associated with Diseased Shrimp from Culture Ponds of Andhra Pradesh (India). J. World Aquacult. Soc. **37**: 523-532.
- Jiang, S.C. & J.H. Paul. 1998. Significance of lysogeny in the marine environment: studies with isolates and a model of lysogenic phage production. Microb. Ecol. **35**: 235-243

- Khemayan, K. 2004. Study of lysogeny of bacteriophage VHS1 in *Vibrio harveyi*. Tesis. Facultad de Estudios Graduados de la Universidad de Mahidol. Bangkok, Tailandia. 124 p
- Khemayan, K., T. Pasharawipas, O. Puiprom, S. Sriurairatana, O. Suthienkul & T.W. Flegel. 2006. Unstable lysogeny and pseudolysogeny in *Vibrio harveyi* Siphovirus-like phage 1. Appl. Environ. Microbiol. **72**: 1355-1363
- Lachica, R.V., D.L. Zink & W.R. Ferris. 1984. Association of fibril structure formation with cell surface properties of *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun. **46**: 272-275
- Lacey, L.A. & W.M. Brooks. 1997. Initial handling and diagnosis of diseased insects. En: L.A. Lacey (ed). Manual of techniques in insect pathology. Academic Press. San Diego, CA.
- Lan, S., Ch. Huang, Ch. Chang, W. Liao, I. Lin, W. Jian, Y. Wu, S. Chen & H. Wong. 2009. Characterization of a new plasmid-like prophage in a pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strain. Appl. Environ. Microbiol. **75**: 2659-2667
- Lavilla-Pitogo, C.R., E.M. Leano & M.G. Paner. 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp *Penaeus monodon* associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. Aquacult. **164**: 337-349.
- Leyton, Y. & C. Riquelme. 2008. Vibrios en los sistemas marinos costeros. Rev. Biol. Mar. Oceanogr. **43**: 441-456.
- Liebl, W., B. Wagner & J. Schellhase. 1998. Properties of an α -galactosidase, and structure of its gene gala, within an α - and β -galactosidase utilization gene cluster of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. Syst. Appl. Microbiol. **21**: 1-11
- Lightner, D.V. 1996. Disease of culture penaeid shrimp. En: J.P. McVey (ed). Handbook of Mariculture. Crustacean Aquaculture. 2a Edic. CRC. Press. Boca Raton.
- Lindell, D., J.D. Jaffe, Z.I. Johnson, G.M. Church & S.W. Chisholm. 2005. Photosynthesis genes in marine viruses yield proteins during host infection. Nat. **438**: 86-89

- Lipps, G. 2008. Plasmids: current research and future trends. Caister Academic Press. Germany. 264 p
- Liu, P.C., K.K. Lee, K.C. Yii, G.H. Kou & S.N. Chen. 1996. Isolation of *vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Penaeus japonicas*. Curr. Microbiol. **33**: 129-132
- Liu, P.C., K.K. Lee, C.C. Tu & S.N. Chen. 1997. Purification and characterization of cysteine protease produced by pathogenic luminous *Vibrio harveyi*. Curr. Microbiol. **35**: 32-39
- Loessner, M.J., S. Goepl & M. Busse. 1991. Comparative inducibility of bacteriophages in naturally lysogenic and lysogenized strains of *Listeria* spp. by U.V. light and mitomycin C. Lett. Appl. Microbiol. **12**: 196–199.
- Low, D. A., N. J. Weyand & M. J. Mahan. 2001. Roles of DNA adenine methylation in regulating bacterial gene expression and virulence. Infect. Immun. **69**: 7197–7204
- Lwoff, A., L. Siminovitch & N. Kjeldgaard. 1950. Induction de la lyse bactériophagique de la totalité d’une population microbienne lysogène. Extrait comptes rendus des séances de l’ Académie des Sciences. **231**: 190-191
- Madigan, M.T., J.M. Martinko & J. Parker. 1999. Biología de los microorganismos. Prent. Hall. España. 1064 p.
- Makarov, R. 2008. Aislamiento y caracterización de vibriófagos de muestras de almeja chocolate *Megapitaria squalida* y camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis. UABCS. La Paz, México. 76 p
- Manefield, M., L. Harris, S.A. Rice, R. de Nys & S. Kjelleberg. 2000. Inhibition of luminescence and virulence in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) pathogen *Vibrio harveyi* by intracellular signal antagonists. Appl. Environ. Microbiol. **66**: 2079-2084
- Mann, N.H., A. Cook, A. Millard, S. Bailey & M. Clokie. 2003. Marine ecosystems: bacterial photosynthesis genes in a virus. Nat. **424**: 74.
- Martin, G.G., N. Rubin & E. Swanson. 2004. *Vibrio parahaemolyticus* and *V. harveyi* cause detachment of the epithelium from the midgut trunk of the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*. Dis. Aquat. Org. **60**: 21-29

- Martínez-Díaz, S.F. & B. Anguas-Vélez. 2002. Incidencia de *Vibrio* durante infecciones dérmicas y sistémicas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus* Steindacher: 1868) en cautiverio. Cienc. Mar. **28**: 347-356
- Moat, A.G., J.W. Foster & M.P. Spector. Microbial Physiology. Wiley-Liss. 4th edition. 2002. New York. 714 p
- Mobberley, J., R.N. Authement, A. M. Segall, R.A. Edwards, R.A. Slepecky & J.H. Paul. 2010. Lysogeny and sporulation in *Bacillus* isolates from the Gulf of Mexico. Appl. Environ. Microbiol. **76**: 829-842
- Munro, J., J. Oakey, E. Bromage & L. Owens. 2003. Experimental bacteriophage-mediated virulence in strains of *Vibrio harveyi*. Dis. Aquat. Org. **54**: 187–194.
- Nair, S. & U. Simidu. 1987. Distribution and significance of heterotrophic marine bacteria with antibacterial activity. Appl. Environ. Microbiol. **53**: 2957-2962
- Nair, G.B. & J.C. Hormazábal. 2005. The *Vibrio parahaemolyticus* pandemic. Rev. Chil. Infect. **22**: 125-130.
- Nakayama, K., S. Kanaya, M. Ohnishi, Y. Terawaki & T. Hayashi. 1999. The complete nucleotide sequence of phi CTX, a cytotoxin-converting phage of *Pseudomonas aeruginosa*: implications for phage evolution and horizontal gene transfer via bacteriophages. Mol. Microbiol. **31**: 399–419.
- 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* 03:K6 strains. J. Clin. Microbiol. **38**: 2156-2161.
- Ninawe, A.S. & J. Selvin. 2009. Probiotics in shrimp aquaculture: avenues and challenges. Crit. Rev. Microbiol. **35**: 43-66.
- 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**: 702–709.
- Ortiz, A. & B. Marron. 2003. Tratamiento de la enfermedad de Fabry: ¿a quién, cuándo y cómo?. Nefrol. **13**: 7-9
- Paris, M.E. 2005. Intoxicación por *Vibrio parahaemolyticus*. Cuad. Méd. Soc. **45**: 43-47

- Pasharawipas, T., S. Sriurairatana, S. Direkbusarakom, Y. Donayadol, S. Thaikua, L. Ruangpan & T.W. Flegel. 1998. Luminous *Vibrio harveyi* associated with tea brown gill syndrome in black tiger shrimp. En: T.W. Flegel (ed). Advances in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. Bangkok, Tailandia.
- Pasharawipas, T., S. Thaikue, S. Sriurairatana, L. Ruangpan, S. Direkbusarakom, J. Manopvisetcharean & T. Flegel. 2005. Partial characterization of a novel bacteriophage of *V. harveyi* isolated from shrimp culture ponds in Thailand. Virus Res. **114**: 63–69.
- Pasharawipas, T., N. Wetchakit & S. Sriurairatana. 2008. The cycle for a Siphoviridae-like phage (VHS1) of *Vibrio harveyi* is dependent on the physiological state of the host. Virus Res. **135**: 332-335
- Paul, J. 2008. Prophages in marine bacteria: dangerous molecular time bombs or the key to survival in the seas. ISME J. **2**: 579-589
- Paul, J. & M. Sullivan. 2005. Marine phage genomics: what have we learned? Environ. Biotechnol. **16**: 299-307
- Piret, J., A. Desormeaux & M.G. Bergeron. 2002. Sodium Lauryl Sulfate, a microbicide effective against enveloped and nonenveloped viruses. Curr. Drug Target. **3**: 17-30
- Prayitno, S.B. & J.W. Latchford. 1995. Experimental infection of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. Aquacult. **132**: 105-112
- Proctor, L.M. 1997. Advances in the study of marine viruses. Microsc. Res. Tech. **37**: 136-161
- Puiprom, O. 2003. Characterization of a bacteriophage VHS1 that increases the virulence of *Vibrio harveyi* to shrimp. Tesis. Universidad de Mahidol. Bangkok, Tailandia. 92 p
- Pumarola, A., A. Rodríguez, J.A. García-Rodríguez & G. Piedrola-Angulo. Microbiología y parasitología médica. Salvat. 2da edición. Barcelona. 1991. 916 p

- Raya, R.R. & E.M. Hébert. 2009. Chapter 3: Isolation of phage via induction of lysogens. En: M. Clokie y A.M. Kropinski (eds.). Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization and Interactions. Humana Press. New York.
- Rendón, L. & J.L. Balcázar. 2003. Inmunología de camarones: conceptos básicos y recientes avances. Rev. Aquat. **19**: 27-33
- Riemann, L. & F. Azam. 2002. Widespread *N*-acetyl-D-glucosamine uptake among pelagic marine bacteria and its ecological implications. Appl. Environ. Microbiol. **68**: 5554-5562.
- Rodríguez, M., E. Botero, C.A. Iregui & J. Figueroa. 2005. *Aeromonas hydrophila* extracellular products extraction and its effects on tilapia roja (*Oreochromis* spp.) and cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Acta Biol. Col. **10**: 75-93.
- Rojas, M.F. 2005. Bacteriófagos específicos para *Rhodobacter spaeroides*: aislamientos, caracterización y potenciales transductores. Tesis. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayaguez. Puerto Rico. 110 p
- Rosenberg, M., D. Gutnick & E. Rosenberg. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell surface hydrophobicity. FEMS Microbiol. Lett. **9**: 29-33
- Ruangpan, L., Y. Danayadol, S. Direkbusarakom, S. Siurairatana & T.W. Flegel. 1999. Lethal toxicity of *Vibrio harveyi* to cultivated *Penaeus monodon* induced by a bacteriophage. Dis. Aquat. Org. **35**: 195-201
- Salyers, A.A. & D.D. White. Bacterial pathogenesis, a molecular approach. ASM Press. Washington, USA. 1994. 47-62 p
- Saulnier, D., P. Haffner, C. Goarant, P. Levy & D. Ansquer. 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: review. Aquacult. **191**: 133-144.
- Seguritan, V., I. Feng, F. Rohwer, M. Swift & A. Segall. 2003. Genome sequences of two closely related *Vibrio parahaemolyticus* phages, VP16T and VP16C. J. Bacteriol. **185**: 6434-6447.
- Skjermo, J & O. Vadstein. 1999. Techniques for microbiological control in the intensive rearing of marine larvae. Aquacult. **177**: 333-343

- Sotomayor, M.A. & J.L. Balcázar. 2003. Inhibición de vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas. Aquat. **19**: 9-15
- Sudheesh, P. & H. Xu. 2001. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricus: possible role of extracellular proteases. Aquacult. **196**: 37-46
- Suginta, W., A. Vongsuwan, C. Songsiriritthigul, H. Prinz, P. Estibeiro, R.R. Duncan, J. Svasti & L.A. Fothergill-Gilmore. 2004. An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: cloning, expression, mass and sequence analyses, and chitin hydrolysis. Arch. Biochem. Biophys. **424**: 171:180
- Sullivan, M.B., M.L. Coleman, P. Weigele, F. Rohwer & S.W. Chisholm. 2005. Three *Prochlorococcus* cyanophage genomes: signature features and ecological interpretations. PLoS Bios. **3**: 790-806
- Sullivan, M.B., K.H. Huang, J.C. Ignacio-Espinoza, A.M. Berlin, L. Kelly, P.R. Weigele, A.S. DeFrancesco, S.E. Kern, L.R. Thompson, S. Young, C. Yandava, R. Fu, B. Krastins, M. Chase, D. Sarracino, M.S. Osburne, M.R. Henn & S.W. Chisholm. 2010. Genomic analysis of oceanic cyanobacterial myoviruses compared with T4-like myoviruses from diverse hosts and environments. Environ. Microbiol. **12**: 3035-3056
- Taniguchi, H., K. Sato, M. Ogawa, T. Odou & Y. Mizuguchi. 1984. Isolation and characterization of a filamentous phage, Vf33, specific for *Vibrio parahaemolyticus*. Microbiol. Immun. **28**: 327-337
- Thompson, L.R., Q. Zeng, L. Kelly, K.H. Huang, A.U. Singer, J. Stubbe & S. Chisholm. 2011. Phage auxiliary metabolic genes and the redirection of cyanobacterial host carbon metabolism. PNAS. **108**: 57-64
- Tseng, I.T. & J.C. Chen. 2004. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. Fish Shellfish Immun. **17**: 325-333
- Valverde, M.J. Manual para el cultivo del langostino autóctono (*Macrobrachium carcinus*) en las Barras de Colorado, Parismina y Tortuguero en la Provincia de Limón, Costa Rica. Proyecto Cobodes. 2006.

- Vandenberghe, J., L. Verdonck, R. Robles-Arozarena, G. Rivera, A. Bolland, M. Balladares, B. Gómez-Gil, J. Calderón, P. Sorgeloos & J. Swings. 1999. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. Appl. Environ. Microbiol. **65**: 2592-2597
- Vandenberghe, J., F.L. Thompson, B. Gómez-Gil & J. Swings. 2003. Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. Aquacult. **219**: 9-20
- Vidgen, M., J. Carson, M. Higgins & L. Owens. 2006. Changes to the phenotypic profile of *Vibrio harveyi* when infected with the *Vibrio harveyi* myovirus-like (VHML) bacteriophage. J. Appl. Microbiol. **100**: 481-487
- Vijayan, K.K. & A.D. Diwan. 1996. Fluctuations in Ca, Mg and P levels in the hemolymph, muscle, midgut gland and exoskeleton during the moult cycle of the Indian White Prawn, *Penaeus indicus* (Decapoda: Penaeidae). Comp. Biochem. Physiol. **114**: 91-97
- Vries, R., H. Broeck, E. Dekkers, P. Manzanares, L. Graaf & J. Visser. 1999. Differential expression of three α -galactosidase genes and a single β -galactosidase gene from *Aspergillus niger*. Appl. Environ. Microbiol. **65**: 2453-2460.
- Waldor, M.K. & J.J. Mekalanos. 1996. Lysogenic conversion by filamentous phage encoding cholera toxin. Sci. **272**: 1910-1914
- Weinbauer, M.G. & C.A. Suttle. 1996. Potential significance of lysogeny to bacteriophage production and bacterial mortality in coastal waters of the Gulf of México. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 4374-4380
- Weiss, R.A. 2002. Virulence and pathogenesis. Trends Microbiol. **10**: 314-317
- Zabala, B., K. García & R.T. Espejo. 2009. Enhancement of UV light sensitivity of a *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pandemic strain due to natural lysogenization by telomeric phage. Appl. Environ. Microbiol. **75**: 1697-1702
- Zamora, P.D. & C. Quiróz. 2005. Un enemigo marino silencioso: *Vibrio parahaemolyticus*. Rev. Dig. Univ. **6**: 1-9

13. APÉNDICE

APÉNDICE I

MÉTODO API ZYM

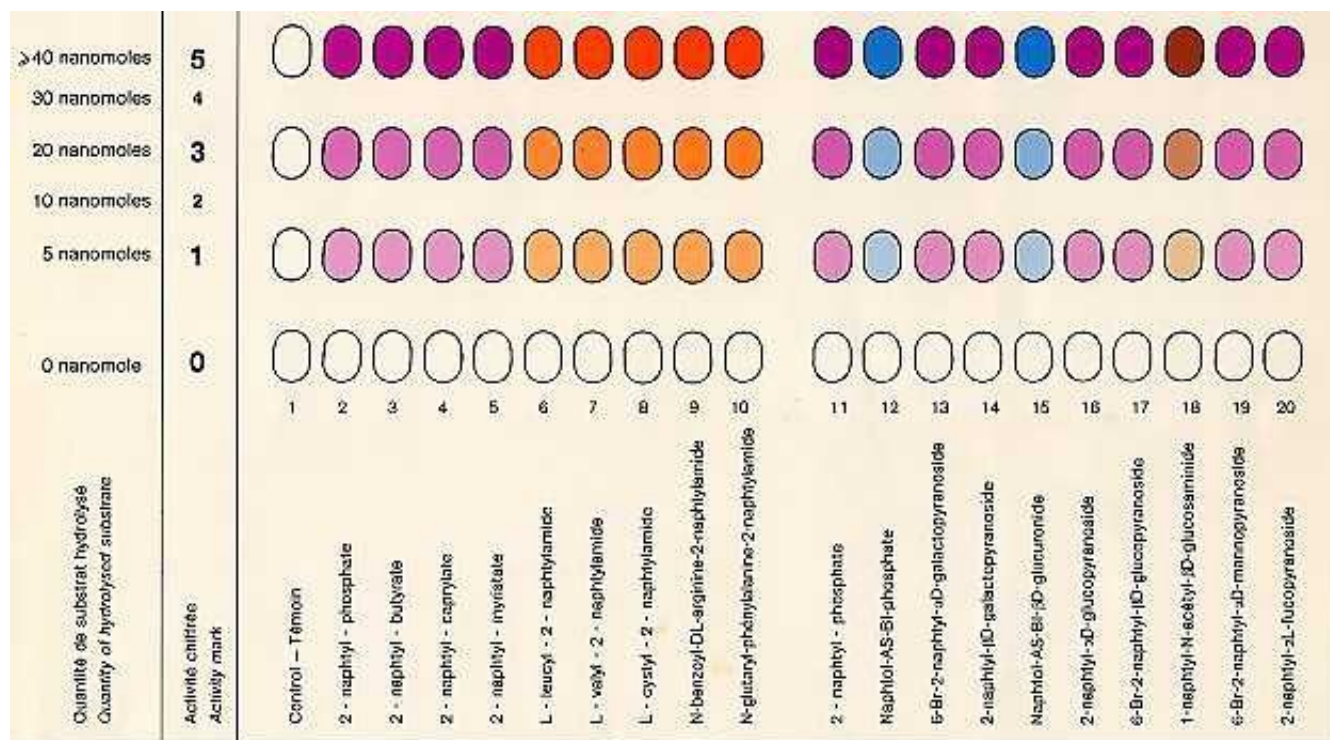


Figura 1. Ficha de referencia de color de la galería Api Zym

Tabla I. Perfil enzimático de *Vibrio parahaemolyticus* determinado a través de la galería Api Zym

Enzima	nanomoles	Enzima	nanomoles
Fosfatasa alcalina	>40	Cistina arilamidasa	20
Esterasa (C4)	20	Tripsina	>40
Esterasa lipasa (C8)	20	α-quimiotripsina	10
Lipasa (C14)	20	Fosfatasa ácida	>40
Leucina arilamidasa	30	Naftol AS-BI-fosfohidrolasa	20
Valina arilamidasa	20	N-acetil-β-glucosaminidasa	5

APÉNDICE II

FUENTES DE CARBONO USADAS POR *V. parahaemolyticus*

Tabla IV. Fuentes de carbono utilizadas por *V. parahaemolyticus* sin infectar

Fuente de carbono		
A2. α -Ciclodextrina	C7. Sucrosa ($\pm$)	F7. L-Alanilglicina ($\pm$)
A3. Dextrina	C8. D-Trealosa	F8. L-Asparagina
A4. Glicógeno	C9. Turanosa	F9. Ácido L-Aspártico
A5. Tween 40	C11. Ácido pirúvico Metil Ester	F10. Ácido L-Glutámico
A6. Tween 80	C12. Ácido succínico Mono-Metil-Ester	F11. Ácido Glicil-L-Aspártico
A8. N-Acetil-D-Glucosamina	D1. Ácido acético	F12. Ácido Glicil-L-Glutámico
A10. L-Arabinosa	D2. Ácido Cis-Aconítico	G1. L-Histidina ($\pm$)
A12. D-Celobiosa ($\pm$)	D3. Ácido cítrico ($\pm$)	G2. Hidroxi-L-Prolina
B2. D-Fructosa	D7. Ácido D-Glucónico	G4. L-Ornitina
B4. D-Galactosa	D10. Ácido α -Hidroxibutírico ($\pm$)	G6. L-Prolina
B6. α -D-Glucosa	E3. Ácido α -Ketobutírico ($\pm$)	G9. L-Serina
B8. α -D-Lactosa ($\pm$)	E4. Ácido α -Ketoglutárico ($\pm$)	H2. Inosina
B9. Lactulosa	E5. Ácido α -Ketoaléico ($\pm$)	H3. Uridina
B11. D-Manitol	E6. Ácido D,L-Láctico	H4. Timidina
B12. D-Manosa	E12. Ácido Succínico	H9. Glicerol
C1. D-Melibiosa ($\pm$)	F1. Ácido Bromosuccínico	H10. D,L- α -Gliceolfosfato
C2. β -Metil-D-Glucósido	F2. Ácido Succínico	H11. α -D-Glucosa-1-Fosfato
C3. D-Psicosa	F4. L-Alaninamida ($\pm$)	H12. D-Glucosa-6-Fosfato
C5. L-Ramnosa ($\pm$)	F5. D-Alanina ($\pm$)	
C6. D-Sorbitol ($\pm$)	F6. L-Alanina ($\pm$)	

($\pm$) oxidación parcial de la fuente de carbono

APÉNDICE III

Dosis Letal Media del SDS

3.2.3 Dosis letal media (DL₅₀) del SDS sobre nauplios de *Artemia*

El Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) es una sustancia tóxica usada comúnmente como referencia en las pruebas de toxicidad. En nuestro estudio se evaluaron diferentes dosis del mismo para obtener la DL₅₀ sobre dos lotes de quistes. Se preparó una solución stock pesando 8 mg de SDS (Sigma®) diluidos en 400 mL de agua desionizada para obtener una concentración final de 20 µg/mL. De manera simultánea y por triplicado, 30 nauplios de *Artemia* de cada lote, fueron colocados en tubos con 10 mL de ASW previamente estéril y ajustados a diferentes concentraciones de SDS a partir de la solución stock. Las concentraciones evaluadas fueron 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8 y 10 µg/mL. Los tubos fueron incubados 48 h a 30°C y la supervivencia de los nauplios de fue comparada con un control axénico.

4.1.3 DL₅₀ de SDS

Los análisis estadísticos demuestran que la calidad del lote influye directamente en la sensibilidad de *Artemia* ante compuestos tóxicos (Figura 1). La DL₅₀ en el lote 1 fue menor que la del lote 2, lo que podría reflejar el estado de salud de los organismos.

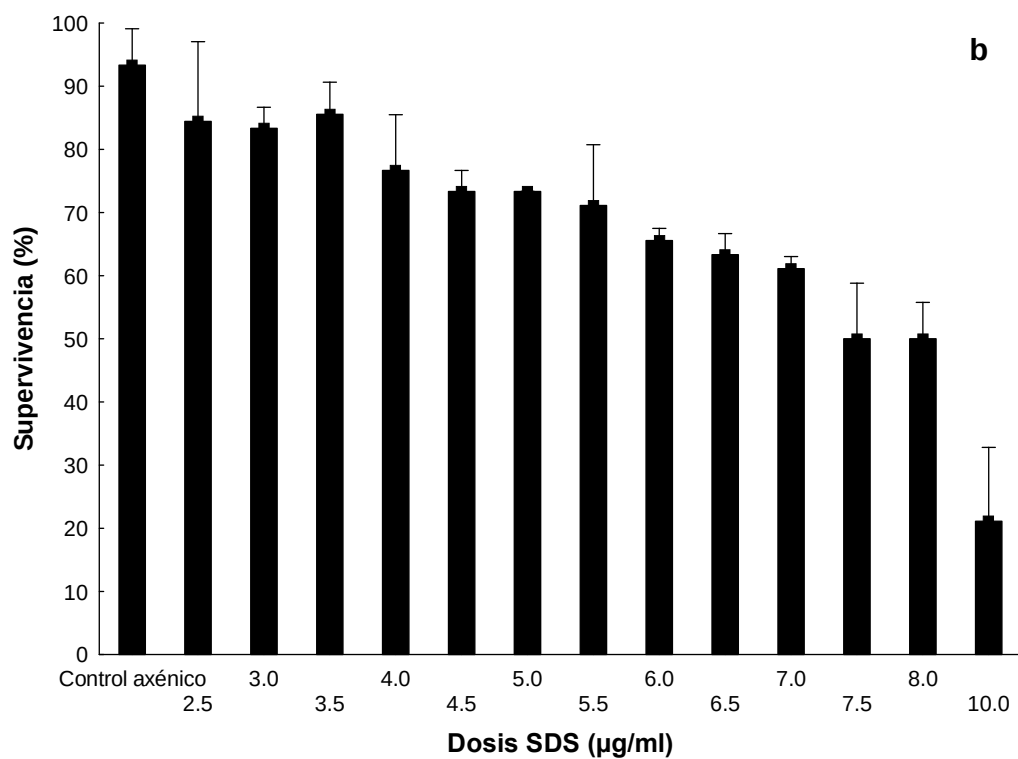
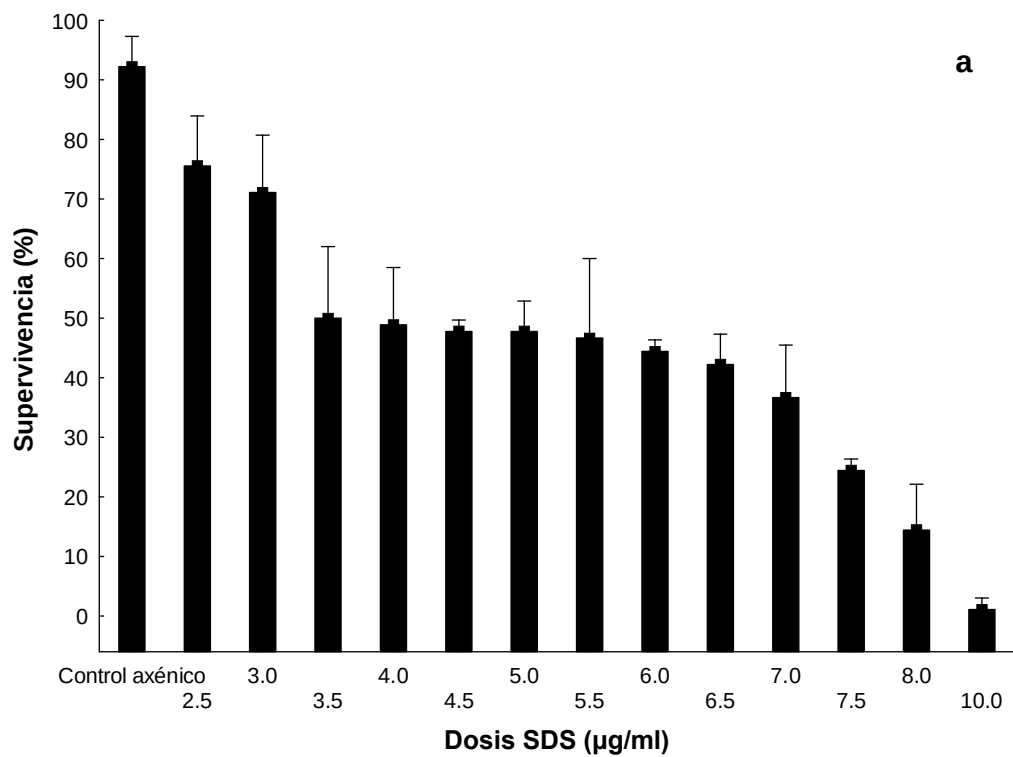


Figura 1. DL₅₀ de SDS sobre nauplios de *Artemia*. a) lote 1, b) lote 2

APÉNDICE IV

ESTADÍSTICOS DE LAS PRUEBAS DE RETO

Tabla I. Nivel de significancia entre los tratamientos en *Artemia*

	Muestra	(1)	(2)	(3)	(4)
1	Control axénico				
2	Control Vp	0.0919			
3	Lisógeno α	0.0003	0.0083		
4	Lisógeno 2	0.0001	0.0002	0.0713	
5	Lisógeno E2	0.0002	0.0036	0.9752	0.1707

	Muestra	(1)	(2)	(3)	(4)
1	Control axénico				
2	Control Vp	0.7690			
3	S	0.3554	0.9313		
4	5s	0.1383	0.6078	0.9562	
5	5+++	0.0453	0.2585	0.6353	0.9446

	Muestra	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
1	Control axénico					
2	Control Vp	0.4701				
3	Lisógeno ESE	0.0545	0.6978			
4	Lisógeno 5c	0.0713	0.7846	0.9999		
5	Mezcla Vp/ γ	0.1756	0.9747	0.9747	0.9916	
6	Mezcla Vp/W	0.0122	0.2510	0.9425	0.8921	0.6058

Tabla II. Nivel de significancia entre los tratamientos en camarón

	Muestra	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)
1	Control axénico											
2	Control Vp	0.001										
3	Lisógeno α	0.000	0.837									
4	Lisógeno 2	0.032	0.837	0.068								
5	Lisógeno E2	0.000	1.000	0.983	0.532							
6	Lisógeno S	0.000	0.641	1.000	0.032	0.908						
7	Lisógeno ESE	0.000	1.000	0.908	0.745	1.000	0.745					
8	Lisógeno 5c	0.002	1.000	0.532	0.983	0.995	0.333	1.000				
9	Lisógeno 5s	0.000	0.745	1.000	0.047	0.956	1.000	0.837	0.427			
10	Lisógeno 5+++	0.002	1.000	0.532	0.983	0.995	0.333	1.000	1.000	0.427		
11	Mezcla Vp/ γ	0.000	0.001	0.032	0.000	0.002	0.068	0.001	0.000	0.047	0.000	
12	Mezcla Vp/W	0.001	1.000	0.745	0.908	1.000	0.532	1.000	1.000	0.641	1.000	0.000

APÉNDICE V

ESTADÍSTICOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD

Tabla II. Nivel de significancia entre los tratamientos con los ECP's de los lisógenos en *Artemia* (lote 1)

	Muestra	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)
1	Control axénico											
2	Control Vp	1.0000										
3	DL50 SDS	0.0994	0.0994									
4	Control PBS	1.0000	1.0000	0.1608								
3	Lisógeno α	1.0000	1.0000	0.0841	1.0000							
4	Lisógeno 2	1.0000	1.0000	0.1171	1.0000	1.0000						
5	Lisógeno E2	1.0000	1.0000	0.1327	0.9999	1.0000	1.0000					
6	Lisógeno S	0.1235	0.1235	1.0000	0.1876	0.1068	0.1424	0.1484				
7	Lisógeno ESE	0.9913	0.9913	0.7586	0.9988	0.9853	0.9952	0.9849	0.7301			
8	Lisógeno 5c	0.0001	0.0001	0.0169	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0679	0.0008		
9	Lisógeno 5s	1.0000	1.0000	0.2436	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.2561	0.9989	0.0002	
10	Lisógeno 5+++	0.0001	0.0001	0.0169	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0679	0.0008	1.0000	0.0002

Tabla II. Nivel de significancia entre los tratamientos con los ECP's de los lisógenos en *Artemia* (lote 2)

	Muestra	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)
1	Control axénico											
2	Control Vp	0.0250										
3	DL50 SDS	0.0001	0.0007									
4	Control PBS	0.4071	0.9763	0.0001								
3	Lisógeno α	0.4739	0.9878	0.0001	1.0000							
4	Lisógeno 2	0.5859	0.9669	0.0001	1.0000	1.0000						
5	Lisógeno E2	0.9998	0.1421	0.0001	0.8503	0.8788	0.9369					
6	Lisógeno S	1.0000	0.0114	0.0001	0.2516	0.3125	0.4097	0.9999				
7	Lisógeno ESE	1.0000	0.0524	0.0001	0.5941	0.6533	0.7590	0.9999	0.9999			
8	Lisógeno 5c	0.6969	0.9772	0.0001	1.0000	1.0000	1.0000	0.9724	0.5182	0.8489		
9	Lisógeno 5s	0.1911	0.9992	0.0001	0.9999	1.0000	0.9999	0.5941	0.1036	0.3240	0.9998	
10	Lisógeno 5+++	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.000	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001