

Instituto Politécnico Nacional
Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas

Departamento de Desarrollo de Tecnologías



**Evaluación de la patogenicidad de *Vibrio* spp y
Aeromonas spp en eleuteroembriones y larvas de Cabrilla
arenera *Paralabrax maculatofasciatus***

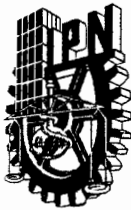
Tesis:

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias con
Especialidad en Manejo de Recursos Marinos

Presenta:

Biól. Jorge Macayo Alvear

La Paz, Baja California Sur, Abril de 2004



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

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 17 del mes de Noviembre del 2003 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

"EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE *Vibrio spp* Y *Aeromonas spp* EN ELEUTEROEMBRIONES Y LARVAS DE CABRILLA ARENERA *Paralabrax maculatofasciatus*"

Presentada por el alumno:

MACAYO

Apellido paterno

ALVEAR

materno

JORGE

nombre(s)

Con registro:

A	9	8	0	1	0	4
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

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

LA COMISION REVISORA

Director de tesis
PRIMER VOCAL

Maurilia Rojas
DRA. MAURILIA ROJAS CONTRERAS

PRESIDENTE
Co-Directora de Tesis

Silvie Dumas
DRA. SILVIE DUMAS

SECRETARIO

Sergio Hernandez Trujillo
DR. SERGIO HERNANDEZ TRUJILLO

SEGUNDO VOCAL

Laura Sanchez Velasco
DRA. LAURA SANCHEZ VELASCO

TERCER VOCAL

Jose Luis Ortiz Galindo
MC. JOSÉ LUIS ORTIZ GALINDO

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Francisco Arreguin Sanchez
DR. FRANCISCO ARREGUIN SANCHEZ



L. P. N.
CICIMAR
DIRECCION

DEDICATORIA

A mis padres

Demóstenes Macayo G. por tus sabios consejos que siempre han sido una guía en mi vida; y ha Esperanza Alvear G., por ensañarme con tu entereza y esfuerzo que todo lo que se inicia se debe concluir, a pesar de las adversidades y bajo cualquier circunstancia.

A mi hijo

Jahir, has sido el mejor regalo que Dios me haya concedido y un aliciente importante para terminar esta tesis, después de un largo camino de sacrificios, incertidumbre y esfuerzos. Con todo mi amor Hijo, porque algún día veas en este trabajo un camino para que seas mejor cada día de tu vida.

A mi esposa

Andrea Medellín Rubio, por los momentos que juntos supimos superar, apoyándonos mutuamente tanto en nuestra vida como en el trabajo, por los buenos e incluso por los tiempos difíciles que vivimos recién llegamos a La Paz, por tus opiniones en este escrito y especialmente por compartir tu vida conmigo y darme un tesoro como hijo.

A mis hermanos

Albertina, Noelia, Carmen, Gloria, José Luis, Guadalupe y Miguel Ángel, por su apoyo incondicional y sus ánimos para seguir adelante hasta terminar con la meta que me propuse y de la cual ustedes fueron parte importante durante mi ausencia.

A mis sobrinos

Jesús, Dulce Angélica, Alberto Neftali, Mayra Gabriela, Julio Alejandro, Itzuli Fernanda, Nahomi Alejandra y Maximiliano, por todos los momentos que dejamos de compartir cuando estuve lejos. Con mucho cariño para ustedes y que algún día logren todas las metas que se han propuesto en su vida y sean un orgullo para sus padres.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Maurilia Rojas Contreras por haber aceptado la dirección de esta tesis a pesar de las circunstancias y de la distancia, sus sugerencias durante las revisiones fueron de gran ayuda para poder concluir la y con ello, una etapa más en mi vida profesional.

Al M. en C. José Luis Ortiz Galindo por su apoyo, sus comentarios y la ayuda incondicional durante el desarrollo de esta tesis. Por los buenos momentos que llegamos a compartir y sobre todo por su amistad.

Al comité revisor de esta tesis, por sus sugerencias y comentarios acertados para mejorarla, Dra. Sivile Dumas, Dra. Laura Sánchez Velasco y Dr. Sergio Hernández Trujillo, por brindarle el tiempo y dedicación tan valiosos para la revisión de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme una beca durante dos años del posgrado de Maestría en Ciencias con el No. de registro: A980104.

Al Programa Institucional de Formación de Investigadores del Instituto Politécnico Nacional (PIFI-IPN), por su apoyo económico otorgado.

A los compañeros del CICIMAR, Francisco Hernández (“que onda compa”), Mario Osuna, Antonio Ocampo, Martín Oscar Rosales, Tanos Grayeb, Alfonso Alvarez, Renato Peña, Manuel Moreno y a todos aquellos con los que de alguna manera compartimos un espacio y tiempo durante mis años en este Instituto, gracias por las enseñanzas en los buenos y malos momentos, que de una u otra manera siempre me dejaron algo que aprender.

A los compañeros del Departamento de Desarrollo de Tecnologías, a Sonia Estudillo y Barbara González por esos momentos tan agradables que compartimos durante mi estancia en La Paz y en el Instituto, al Dr. Ludwing Neagel por sus recomendaciones y ha Pedro González por confiar en mi cuando estuve a cargo del criadero de jaibas. Además a Tere Barriga, Martina y Juan (Biblioteca) por los momentos que compartimos juntos mientras hubo oportunidad.

A Manuel Zetina y Gladis López, por los momentos (que no fueron pocos) que logramos compartir juntos durante nuestra estancia en La Paz, a pesar del tiempo los momentos siempre estarán presentes mientras podamos recordarlos, gracias por su amistad.

Especialmente al Dr. Francisco López Gutiérrez (a pesar de ya no pertenecer al Instituto), por sus consejos académicos durante el desarrollo de esta tesis, porque a pesar de las adversidades entendí que la ecuanimidad y la ética profesional, son cualidades que se aprenden día a día y reflejan el valor de las personas. Gracias sobre todo por su amistad desinteresada, por aquellas tardes soleadas en una buena sombra, donde un buen café o té siempre fueron el inicio de largas y provechosas charlas.

CONTENIDO

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
CONTENIDO	III
GLOSARIO	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XIII
RESUMEN	XIV
ABSTRACT	XV
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	4
2.1 Infecciones experimentales en organismos marinos	4
2.2 Taxonomía, aspectos fisiológicos y bioquímicos de los géneros de <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i>	7
2.3 Principales microorganismos patógenos de peces y factores potenciales de virulencia en <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i>	9
3 JUSTIFICACIÓN	14
4 OBJETIVOS	15
4.1 Objetivo general	15
4.2 Objetivos particulares	15
5 MATERIALES Y MÉTODOS	16
5.1 Bacterias utilizadas en el presente trabajo; método de cultivo e identificación	16

5.2	Ajuste de la densidad óptica para relacionarla con las unidades formadoras de colonias (UFC)	17
5.3	Evaluación del rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> como vector de las cepas de los géneros <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i>	19
5.3.1	Efecto de las bacterias sobre la supervivencia de <i>Brachionus plicatilis</i>	19
5.3.2	Bioencapsulación de las bacterias en el rotífero <i>Brachionus plicatilis</i>	21
5.4	Patogenicidad de <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i> en eleuteroembriones de la cabrilla arenera (<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>)	23
5.5	Infección experimental en larvas de cabrilla arenera (<i>P. maculatofasciatus</i>) usando al rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> como vector	24
5.6	Análisis de factores potenciales de virulencia en cepas de <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i>	26
5.6.1	Adhesión de bacterias a la superficie mucosal de la piel de eleuteroembriones de cabrilla arenera (<i>P. maculatofasciatus</i>)	26
5.6.2	Hidrofobicidad (aglutinamiento) de células bacterianas de <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i>	26
5.6.3	Producción de exoenzimas y hemolisinas por bacterias de los géneros de <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i>	27
5.7	Tratamiento estadístico	28
6	RESULTADOS	29
6.1	Identificación preliminar de las cepas bacterianas usadas en este estudio	29
6.2	Evaluación del rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> como vector de las cepas de los géneros <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i>	30
6.2.1	Efecto de la acción de cepas de <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i> sobre la supervivencia del rotífero <i>Brachionus plicatilis</i>	30
6.2.2	Bioencapsulación de las cepas de <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i> en el rotífero <i>Brachionus plicatilis</i>	31

6.3	Patogenicidad de cepas de los géneros <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i> en eleuteroembriones de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	33
6.3.1	Bioensayo 1	33
6.3.2	Bioensayo 2	35
6.4	Infección experimental de larvas de cabrilla arenera <i>Paralabrax maculatofasciatus</i>, usando al rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> como vector de infección de <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i>	36
6.4.1	Bioensayo 1	36
6.4.2	Bioensayo 2	37
6.4.3	Bioensayo 3	38
6.4.4	Bioensayo 4	39
6.5	Factores potenciales de virulencia de <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i>	40
6.5.1	Adhesión a la superficie mucosal de la piel de eleuteroembriones de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	40
6.5.2	Hidrofobicidad de células de <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i> por el método de SAT	41
6.5.3	Producción de exoenzimas y hemolisinas por bacterias de los géneros de <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i>	42
7	DISCUSIÓN	44
7.1	Identificación de las bacterias de los géneros de <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i>	44
7.2	Evaluación del rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> como vector de las cepas de los géneros de <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i>	44
7.3	Patogenicidad de cepas de los géneros <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i> sobre eleuteroembriones de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	47
7.4	Infección experimental de larvas de cabrilla arenera <i>Paralabrax maculatofasciatus</i>, usando al rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> como vector de las cepas de los géneros de <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i>	49
7.5	Factores potenciales de virulencia de <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i>	51
7.5.1	Adhesión a la superficie mucosal de los eleuteroembriones de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	51
7.5.2	Hidrofobicidad de las células de <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i> por el método del SAT	53
7.5.3	Producción de exoenzimas y hemolisinas por bacterias de los géneros de <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i>	54

8	CONCLUSIONES	57
9	RECOMENDACIONES	58
10	LITERATURA CITADA	59
11	ANEXOS	71

GLOSARIO

Adhesina. Moléculas involucradas en la adhesión de microorganismos a superficies sólidas; factores que incrementan adsorción (Atlas y Bartha, 1993).

Aglutinación. Grupos o agregaciones visibles de células o partículas, debido a la reacción de antígenos con anticuerpos (Atlas, 1990).

Bioensayo. Prueba en la que se usan microorganismos vivos para determinar el efecto y/o concentración de una sustancia con base a la magnitud del desarrollo o de la actividad de un organismo bajo condiciones controladas (Atlas, 1990).

Citotoxinas. Sustancias capaces de dañar a determinadas células sin causarles lisis (Atlas, 1990).

Colonización. Establecimiento de un microorganismo en una superficie de un organismo o material para su reproducción, sin necesariamente resultar en invasión o lesión de los tejidos (Atlas, 1990).

Eleuteroembrión. Fase del período embrionario de los peces que comienza al momento de la eclosión y culmina hasta que se absorbe completamente el saco vitelino (Balon, 1984).

Especificidad. La restricción de interacción; en los anticuerpos, se refiere a la cantidad de antígenos con los que un anticuerpo se combina; en las enzimas, se refiere al substrato sobre el que actúa la enzima; en los microorganismos patógenos o parásitos, se refiere a la variedad de huéspedes susceptibles (Atlas, 1990).

Exotoxinas. Sustancias tóxicas producidas por algunos patógenos y excretadas al medio circundante donde se propaga a distintos tejidos causando daño celular independientemente del patógeno productor (Brock y Brock, 1978).

Fenotípico. Relativo a las características físicas de un individuo sin considerar su constitución genética; en taxonomía, sistema de clasificación que no toma en consideración relaciones evolutivas (Atlas, 1990).

Fimbrias (Pili). Proteínas filamentosas en la superficie de células bacterianas que pueden actuar como adhesinas para una adherencia específica (Todar, 1998).

Hidrofobicidad. El concepto hidrofobicidad refleja las propiedades de los diluyentes, la fase acuosa en la cual las bacterias son suspendidas (Ben-Naim, 1976).

Hospedero. Organismo que alberga y provee habitat o alimento para otro organismo (latín hospes = recibir un invitado) (Todar, 1998).

Gnotobiotico. Animales libres de bacterias o aquellos que viven en asociación con uno o más microorganismos conocidos (griego *gnotos* = conocido y *biota* = flora o fauna de una región) (Prescott *et al.*, 1993; Hooper *et al.*, 1998).

Inducción. Proceso por el cual una enzima es sintetizada en respuesta a la presencia de una sustancia externa, el inductor (Brock y Brock, 1978).

Infeción. Proceso mediante el cual se da un primer paso necesario para la producción de una enfermedad por bacterias, hongos o virus (Freeman, 1989).

Inmunidad. Es el estado relativo de resistencia de un hospedero a un patógeno específico (Todar, 1998).

Interacción hidrofóbica. Es el decremento en la energía libre asociada con lo que provocan dos cuerpos en contacto, dependientes de la fase acuosa misma, posiblemente debido a la fuerte fuerza de cohesión entre las moléculas del agua o la estructura única del agua (Ben-Naim, 1976).

Moco. Capa mucopolisacárida de glucosaminoglicanos que cubren la superficie mucosa de la célula animal (Today, 1998).

Neonatos. Organismos recién eclosionados.

Patogenicidad. Se refiere a la capacidad potencial de un microorganismo para causar una enfermedad en un hospedero (Falkow, 1990).

Patógenos oportunistas. Son microorganismos de vida libre, pero que requieren de condiciones favorables para su propia proliferación en los sistemas de crianza o en asociación con el hospedero para causar una enfermedad (Elston, 1984).

Probiótico. Es un suplemento alimenticio microbiano vivo, el cual afecta benéficamente al hospedero animal mejorando su balance microbiano intestinal (Fuller, 1989).

Unidad experimental. Término empleado para denominar a cada uno de los recipientes (1000, 500 y 250 ml de capacidad) utilizados durante todos los bioensayos en el presente trabajo.

Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Es una unidad celular viable capaz de dividirse y formar una colonia (Atlas, 1990).

Vector. Un agente, generalmente insecto u otro animal, capaz de transmitir patógenos de un hospedero a otro (Brock y Brock, 1978).

Virulencia. Grado por el cual un patógeno dado puede causar una enfermedad (Brock y Brock, 1978), se mide generalmente por el número de microorganismos necesarios para producir la enfermedad (Freeman, 1989).

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Esquema del ajuste de la densidad óptica con respecto a las unidades formadoras de colonia (UFC`s), para las cepas 226, 227, 228, 279, 280, 281, 282, 301, 302, 303, <i>Vibrio harveyi</i> y <i>Vibrio alginolyticus</i> , que fueron probadas durante los bioensayos en el presente trabajo.....	18
Figura 2.- Diagrama del efecto de las bacterias 226, 227, 279 y 282 sobre la supervivencia del rotífero <i>Brachionus plicatilis</i>	20
Figura 3.- Esquematación para la evaluación de la bioencapsulación de las bacterias 226, 228, 282, 302, 303 y <i>Vibrio harveyi</i> en el rotífero <i>Brachionus plicatilis</i>	22
Figura 4.- Esquema para evaluar la mortalidad de eleuteroembriones de cabrilla arenera (<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>) con las cepas 226, 227, 228, 279, 280, 281, 282, 301, 302, 303, <i>Vibrio harveyi</i> y <i>Vibrio alginolyticus</i> , después de 48 h de exposición.....	24
Figura 5.- Esquematación para evaluar la mortalidad de larvas de cabrilla arenera a través de una infección experimental con <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i> después de 48 h de su exposición, usando al rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> como vector de la infección.....	25
Figura 6.- Supervivencia del rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> después de 48 h de exposición a las cepas bacterianas <i>Am226</i> , <i>Vp279</i> , <i>Vp282</i> y <i>V227</i> . El control fue adicionado con levadura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>). Los valores representan la media \pm EE de seis replicas por tratamiento con un nivel de confianza de 0.05.....	30
Figura 7.- Tasa de filtración promedio de las cepas <i>Vh</i> , <i>Am226</i> , <i>Vp282</i> , <i>Asp302</i> , <i>Vsp303</i> y <i>V228</i> por el rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> durante 24 h de exposición. Los valores de cada tiempo de muestreo representan la media \pm EE de cuatro replicas por tratamiento.....	32
Figura 8.- Bioencapsulación de las bacterias(UFC's) <i>Vh</i> , <i>Am226</i> , <i>Vp282</i> , <i>Asp302</i> , <i>Vsp303</i> y <i>V228</i> por rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> después de 24 h de exposición. Los valores de cada tratamiento representan la media \pm EE de cuatro replicas. El control negativo fue adicionado con levadura viva y la cepa <i>Vh</i> representó el control positivo.....	33

Figura 9.- Mortalidad de los eleuteroembriones de *Paralabrax maculatofasciatus* después de 48 h de exposición a las cepas *Vh*, *Valg.*, *Am226*, *Am281*, *Vp279*, *Vp282*, *Vc280*, *Vsp303*, *Ai301*, *Asp302*, *V227* y *V228*. Los valores representan la media \pm EE, con triplicados por tratamiento y un valor de confianza de 0.05.....34

Figura 10.- Mortalidad de los eleuteroembriones de *Paralabrax maculatofasciatus* después de 48 h de exposición a las cepas *Vh*, *Valg.*, *Am226*, *Am281*, *Vp279*, *Vp282*, *Vc280*, *Vsp303*, *Ai301*, *Asp302*, *V227* y *V228*. Los valores representan la media \pm EE, con triplicados por tratamiento y un valor de confianza de 0.05.....35

Figura 11.- Mortalidad de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* después de 48 h de exposición a las cepas de *Vh*, *Am226*, *Am281*, *Vp282*, *Asp302*, *Vsp303* y *V228* bioencapsuladas en el rotífero *Brachionus plicatilis*. Los valores representan la media \pm EE, con triplicados por tratamiento y un valor de confianza de 0.05.....36

Figura 12.- Mortalidad de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* después de 48 h de exposición a las cepas *Vh*, *Valg.*, *Am226*, *Vp282*, *Vc280*, *Ai301*, *Vsp303* y *V227* bioencapsuladas en el rotífero *Brachionus plicatilis*. Los valores representan la media \pm EE, con triplicados por tratamiento y un valor de confianza de 0.05.....37

Figura 13.- Mortalidad de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* después de 48 h de exposición a las cepas *Vh*, *Am226*, *Am281*, *Vp282*, *Asp302*, *Vsp303* y *V228* bioencapsuladas en el rotífero *Brachionus plicatilis*. Los valores representan la media \pm EE, con triplicados por tratamiento y un valor de confianza de 0.05.....38

Figura 14.- Mortalidad de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* después de 48 h de exposición a las cepas *Vh*, *Valg.*, *Am226*, *Am281*, *Vp279*, *Vp282*, *Vc280*, *Vsp303*, *Ai301*, *Asp302*, *V227* y *V228* bioencapsuladas en el rotífero *Brachionus plicatilis*. Los valores representan la media \pm EE, con triplicados por tratamiento y un valor de confianza de 0.05.....39

Figura 15.- Adhesión de bacterias (UFC/eleuteroembrión) al moco de los eleuteroembriones y sus mortalidades después de 48 h de exposición. Los valores están representados por triplicados para cada tratamiento.....40

Figura 16.- Adhesión de bacterias (UFC/eleuteroembrión) al moco de los eleuteroembriones y sus mortalidades después de 48 h de exposición. Los valores están representados por triplicados para cada tratamiento.....41

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Sistemática de especies de bacterias patógenas para peces y sus principales características patológicas.....	8
Tabla 2.- Principales características bioquímicas de los géneros <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i>	9
Tabla 3.- Bacterias utilizadas en el presente trabajo.....	16
Tabla 4.- Criterio para determinar el grado de hidrofobicidad según Santos <i>et al.</i> (1990).....	27
Tabla 5.- Identificación de las cepas de estudio con el Programa BIOLOG®	29
Tabla 6.- Análisis de varianza de una vía de los tratamientos con bacterias con respecto al control.....	31
Tabla 7.- Análisis de varianza de una vía de seis bioensayos, donde se observaron diferencias significativas de los tratamientos con bacterias con respecto a sus controles.....	34
Tabla 8.- Hidrofobicidad de las bacterias de estudio por el método del SAT (Salt Aggregation Test) propuesto por Lindahl <i>et al.</i> (1981).....	42
Tabla 9.- Producción de exoenzimas y hemolisinas involucradas en la virulencia de cepas de los géneros <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i> (Balebona <i>et al.</i> , 1998).....	43

RESUMEN

El cultivo de peces marinos se ha visto afectado por mortalidades masivas durante la crianza larvaria. En estudios recientes se ha relacionado la presencia de bacterias patógenas oportunistas con dichas mortalidades, en especial de los géneros *Vibrio* y *Aeromonas*. El objetivo de este trabajo fue desarrollar una infección experimental para evaluar la patogenicidad de cepas de *Vibrio* y *Aeromonas* aisladas de los sistemas de crianza larvaria de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). Para ello se utilizaron las cepas *Aeromonas media* (226, 281), *Vibrio proteolyticus* (279, 282), *Vibrio charchariae* (280), *Aeromonas ichthiosmia* (301), *Aeromonas* sp. (302), *Vibrio* sp. (303) y *Vibrionaceae* (227, 228) y dos cepas de referencia, *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus*. Primeramente se evaluó al rotífero *Brachionus plicatilis* como vector de infección, así como su tasa de bioencapsulación. Los resultados indicaron un incremento de la supervivencia del rotífero en presencia de las cepas *Aeromonas media* 226 (133 %) y *Vibrio proteolyticus* 279 (176 %) y la tasa de bioencapsulación promedio fue entre 900-8000 UFC/rotífero, después de 24 h. La infección experimental se evaluó en cuatro bioensayos durante 48 h, utilizando unidades experimentales (UE) de 250 ml con 100 ml de agua de mar estéril, colocados en baño a $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ con fotoperíodo de 12 h luz:12 h oscuridad; las densidades de organismos fueron 80 huevos/UE de cabrilla arenera, 5 rotíferos/ml y alrededor de 10^8 UFC/ml. Las cepas que produjeron mayores mortalidades en promedio durante tres bioensayos fueron: *Vibrio proteolyticus* 282 (48 %), *Vibrio* sp. 303 (42 %) y *Aeromonas* sp. 302 (46 %), registrándose diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto a sus controles (19 %) sin la adición de bacterias. Así mismo, se determinaron algunos factores potenciales de virulencia de las cepas de prueba, como: la adhesión a la superficie mucosal de la piel de eleuteroembriones, la hidrofobicidad, la producción de exoenzimas y hemolisinas, así como, la formación de una película en medio BHI. En donde todas las cepas demostraron capacidad para reaccionar y producir dichos factores. Con los resultados obtenidos, se concluye que las bacterias (*Vibrio harveyi*, *Aeromonas media* 226 y 281, *Vibrio proteolyticus* 282, *Aeromonas ichthiosmia* 301, *Vibrio* sp. 303 y *Aeromonas* sp. 302) asociadas al cultivo larvario de la cabrilla arenera fueron patógenas para los eleuteroembriones y larvas, y se sugiere que el rotífero *Brachionus plicatilis* podría actuar como vector de dichos patógenos.

ABSTRACT

The culture of marine fish has been affected by massive mortalities during larval rearing. In recent studies the presence of opportunistic pathogen bacteria has been related to this mortality, especially bacteria of the *Vibrio* and *Aeromonas* genera. Our objective was to develop an experimental infection to evaluate the pathogenicity of *Vibrio* and *Aeromonas* isolated from the larval-rearing systems of the spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*). For this we used the strains *Aeromonas media* (226, 281), *Vibrio proteolyticus* (279, 282), *Vibrio charchariae* (280), *Aeromonas ichthiosmia* (301), *Aeromonas* sp. (302), *Vibrio* sp. (303) and *Vibrionaceae* (227, 228), and two reference strains, *Vibrio harveyi* and *Vibrio alginolyticus*. First was evaluated the rotifer *Brachionus plicatilis* as the infection vector, and also evaluated its bioencapsulation rate. Bioencapsulation increased rotifer survival in the presence of the strains *Am226* (133 %) and *Vp279* (176 %). The bioencapsulation rate average was 900-8000 UFC/rotifer, after 24 hours. The experimental infection was evaluated in four trials for 48 hours, using experimental units (EU) of 250 ml with 100 ml of sterile sea water. The tests were run at 23 +/- 1°C with a photoperiod of 12 h light:12 h darkness; the organisms of densities were 80 eggs/EU of spotted sand bass, 5 rotifers/ml and about 10⁸ UFC/ml. The strains causing mortalities greater than average were *Vp282* (48 %), *Vibrio* sp. 303 (42 %) and *Aeromonas* sp. 302 (46 %), showing significant differences ($P < 0.05$) from the controls (19 %). Some potential factors of virulence of the test strains were determined; the adhesion to the mucosal surface of the eleutheroembryos skin, the hydrophobicity, the axoenzymatic production and hemolysis, and the formation a film in BHI medium. All strains demonstrated a positive capacity to produce these factors. With the results obtained, we conclude that the bacteria (*Vibrio harveyi*, *Aeromonas media* 226 and 281, *Vibrio proteolyticus* 282, *Aeromonas ichthiosmia* 301, *Vibrio* sp. 303 and *Aeromonas* sp. 302) associated with the larval culture of the spotted sand bass were pathogens for the eleutheroembryos and larvae, and it is suggested that the rotifer *Brachionus plicatilis* could act as vector of this pathogen.

1 INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas en la acuicultura de peces marinos son las altas mortalidades que se presentan durante sus primeros estadios de vida (Muroga *et al.*, 1987; Munro *et al.*, 1994). Dichas mortalidades se han asociado a diversos factores, como la calidad nutricional del alimento vivo, factores ambientales, así como el desequilibrio entre el hospedero, el ambiente y las bacterias patógenas (Nicolas *et al.*, 1989). En los últimos años, se ha documentado la presencia de bacterias patógenas (*Vibrio* y *Aeromonas*) dentro de los sistemas de producción larvaria como uno de los principales factores desestabilizadores, siendo su introducción a través del rotífero *Brachionus plicatilis*, utilizado como primer alimento en la etapa larvaria (Gatesoupe, 1982, 1989).

Es por ello, que se han desarrollado métodos para establecer un control microbiano en todas las etapas de los procesos del cultivo (Vadstein, 1997). Por un lado, la introducción de bacterias seleccionadas en la cadena alimenticia de larvas ha permitido mejorar su tasa de supervivencia, como en el caso de *Scophthalmus maximus* infectadas con *Vibrionaceae* (Gatesoupe, 1994). Por otro lado, aunque la información es limitada al respecto, se sabe que las larvas presentan un desarrollo incipiente de su sistema inmunológico. Una alternativa para incrementar su supervivencia durante las primeras etapas de vida ha sido la inmunoestimulación, la cual consiste en métodos que permiten mejorar la capacidad tanto del sistema específico como el no específico, mejorando la resistencia de las larvas a infecciones bacterianas (Vadstein, 1997). Otros métodos alternativos han sido la utilización de *Lactobacillus plantarum* y esporas de *Bacillus*, de las que se sabe disminuyeron la presencia de *Vibrionaceae* cuando fueron utilizadas como alimento en rotíferos (Gatesoupe, 1991a).

En algunos trabajos se han estandarizado métodos de exposición *in vivo* con *Vibrio* y *Aeromonas* (Nordmon *et al.*, 1997). De los métodos más frecuentes se encuentran: inyección intraperitoneal, baños con determinadas dosis de bacterias y

por cohabitación. Estos métodos han sido descritos en diversas publicaciones (Colorni *et al.*, 1981; Bruno *et al.*, 1986; Hjeltnes *et al.*, 1987; Lillehaug *et al.*, 1990; Gjedrem y Gjøen, 1995; Nordmon *et al.*, 1997; Bruno *et al.*, 1998; Madsen y Dalsgaard, 1999).

La cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, es una especie que se encuentra distribuida a lo largo de la costa Oeste de México, es un pez carnívoro, que tiene hábitos diurnos y se alimenta de pequeños crustáceos, bivalvos, gasterópodos, pelecipodos y pequeños peces (Ferry *et al.*, 1997). Esta especie ha demostrado adaptabilidad a las condiciones de cultivo al ser muy resistente al manejo, logrando con éxito su madurez sexual y reproducción, reflejándose en su capacidad de desovar durante todo el año bajo condiciones controladas de laboratorio, además de su baja territorialidad, por lo que se ha considerado una especie potencial para su cultivo comercial en México (Rosales-Velázquez *et al.*, 1992; Rosales-Velázquez, 1997). Se ha reportado que puede llegar a medir hasta 45 cm de longitud total en 3.5 años bajo condiciones de cultivo y su carne blanca de excelente calidad se puede encontrar a un precio comercial de 5 dólares/kg en el mercado (Avilés-Quevedo y Mazón-Suástegui, 1996).

Los estudios realizados en el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del IPN (CICIMAR), han sido enfocados ha desarrollar técnicas para establecer el cultivo de la cabrilla arenera, como establecer la densidad de siembra (Alvarez-González, 1999), sus diferentes requerimientos nutricionales (Rosales-Velázquez, 1997; Anguas-Vélez *et al.*, 2000; Peña-Martínez, 2000), así como su dieta durante el desarrollo de la etapa larvaria (Alvarez-González, 2001). A pesar de que los avances han sido considerables, no existe información específica acerca del papel que juegan las bacterias patógenas dentro de los sistemas de crianza larvaria, donde han sido registradas mortalidades del 90-95% durante los primeros días de crianza; lo que ha representado un obstáculo para llevar a cabo su cultivo de manera extensiva.

De ahí surge el interés del presente trabajo, en el que se evaluó una infección experimental con diez cepas de bacterias de los géneros *Vibrio* y *Aeromonas* provenientes del sistema de cultivo donde se registraron altas mortalidades, así como del rotífero, *Brachionus plicatilis*, utilizado como alimento vivo durante la crianza larvaria. Así mismo, se contó con dos cepas patógenas de referencia, provenientes de una vibriosis en un cultivo de camarón y una septicemia hemorrágica en peces marinos. Por otro lado, se determinó la tasa de filtración de bacterias por parte de los rotíferos, evaluando el papel del rotífero como vector en la infección experimental. Finalmente se evaluaron determinantes potenciales de virulencia de las cepas: adhesión al moco de los eleuteroembriones, hidrofobicidad de las células bacterianas y producción de exoenzimas y hemolisinas por parte de las bacterias, evaluando así la capacidad de las bacterias para causar mortalidades significativas tanto en los eleuteroembriones como en las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*.

2 ANTECEDENTES

2.1 INFECCIONES EXPERIMENTALES EN ORGANISMOS MARINOS.

Son pocos los trabajos sobre infecciones experimentales en peces marinos donde se haya evaluado la patogenicidad de bacterias de los géneros *Vibrio* y *Aeromonas*, principalmente durante las primeras etapas de su desarrollo larvario. Sin embargo, éstas evaluaciones se han realizado en algunos invertebrados marinos durante sus primeras etapas larvianas. En este sentido, Robertson *et al.* (1998) llevaron a cabo infecciones experimentales con *Vibrio harveyi* en larvas de camarón (*Penaeus vannamei*). Se infectaron en baños por 2 h, a una concentración de 10^4 - 10^7 bacterias/ml. Se reportaron altas mortalidades en los organismos, las cuales estuvieron asociadas a una rápida multiplicación de bacterias, quedando claro que el protocolo de infección fue correcto.

Así mismo, Prayitno y Latchford (1995) realizaron una infección experimental en crustáceos, por el método de baños con bacterias por 48 h. Reportaron que las cepas de *Vibrio harveyi* y *Photobacterium phosphoreum* fueron patógenas de nauplios de artemia y larvas de *Penaeus monodon*, con dosis de 10^4 y 10^3 UFC/ml, respectivamente, y concluyeron que la virulencia de ambas cepas mantuvo una estrecha relación con la edad de las larvas.

Otro reporte de infección experimental con larvas y postlarvas de abulón rojo (*Halotis rufescens*) fue reportado por Anguiano-Beltran *et al.* (1998), quienes evaluaron la patogenicidad de *Vibrio alginolyticus* a diferentes concentraciones de bacterias (10^2 - 10^6 células/ml) por 24-48 h. Los resultados sugirieron que *V. alginolyticus* causó mortalidades masivas en las larvas en 24 h con 10^5 células/ml y en postlarvas 10^6 células/ml fueron requeridas para producir el mismo efecto.

Para evaluar la patogenicidad de *Vibrio alginolyticus* sobre larvas de la almeja catarina, *Argopecten ventricosus* (= *circularis*), Sainz *et al.* (1998) realizaron una

infección experimental, adicionando diferentes concentraciones de la bacteria (0.1×10^5 - 90×10^5 células/ml) en un medio con las larvas. Los resultados se estimaron en porcentaje, tanto la actividad de nado de las larvas como la supervivencia total, observándose que con una dosis de 0.5×10^5 células/ml del 79-80% de las larvas nadaron activamente hasta el último día (20) del experimento y con una concentración de 5×10^5 células/ml no hubo larvas vivas al día 12 del experimento. Se observó una alta virulencia de *V. alginolyticus* en una concentración de 90×10^5 células/ml y no se mantuvo ninguna larva viva al día 2 del experimento.

Los trabajos antes mencionados realizaron las evaluaciones en diversos organismos distintos a los peces marinos. A pesar de ello, algunas semejanzas han sido observadas en la metodología sobre las infecciones experimentales bajo condiciones de laboratorio. Por lo tanto, es de fundamental importancia desarrollar y estandarizar modelos de infección experimental (Skjermo y Vadstein, 1999) para evaluar la patogenicidad de bacterias asociadas a los cultivos de peces marinos (Iwata *et al.*, 1978; Masamura *et al.*, 1989; Muroga *et al.*, 1990).

En las últimas décadas se han desarrollado diferentes métodos y técnicas para evaluar la patogenicidad de bacterias asociadas por lo general a los sistemas de crianza larvaria de peces marinos, con la finalidad de tener una idea más clara del papel que juegan dentro de estos ambientes acuícolas (Muroga *et al.*, 1987; Nicolas *et al.*, 1989). También se ha documentado que la presencia de dichas bacterias (especialmente *Vibrio* y *Aeromonas*) dentro de los sistemas de crianza larvaria son uno de los principales problemas para su producción (Munro *et al.*, 1994; Blanch *et al.*, 1997).

Aunado a esto, se ha documentado sobre el incipiente desarrollo del sistema inmunológico que presentan las larvas de peces, uno de los trabajos que se ha realizado con la finalidad de reforzar dicho sistema es el realizado por Vadstein (1997), quien propone el método de la inmunoestimulación, el cual pretende

establecer un control microbiano en todas las etapas de desarrollo del cultivo y obtener un mejoramiento en la capacidad del sistema inmunológico tanto específico como no específico de las larvas, lo que les permitirá resistir la invasión de algún patógeno, logrando así minimizar las pérdidas dentro de la crianza larvaria.

Gatesoupe (1994) evaluó una infección experimental con una cepa patógena de *Vibrio* sp. en larvas de *Scopthalmus maximus*. El método consistió en enriquecer un cultivo de rotíferos con un inoculo diario de 10^7 UFC/ml de bacterias lácticas. El resultado más significativo fue el mejoramiento de la tasa de supervivencia de las larvas expuestas a una concentración de 2×10^7 UFC/ml de *Vibrio* sp. cuando los rotíferos fueron enriquecidos con bacterias lácticas, reportando un 50% de supervivencia en los tratamientos expuestos a *Vibrio*, después de 72 h de iniciado el experimento. Concluyendo que altas concentraciones de bacterias lácticas en el cultivo de rotíferos pueden incrementar su valor dietético para larvas de *S. maximus* y como consecuencia mejorar su supervivencia.

Nordmon *et al.* (1997) y Madsen y Dalsgaard (1999) evaluaron la patogenicidad de bacterias, induciendo la infección experimental con una inyección intraperitoneal en peces adultos de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) con *Vibrio salmonicida* y en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) con *Flavobacterium psychrophilum*. En el primer caso, se observaron mortalidades hasta del 70%, con una dosis de 5×10^6 UFC/pez. A pesar de ser el método más confiable para inducir vibriosis, los peces mostraron muy pocos signos externos de la enfermedad. En el segundo caso, las mortalidades fluctuaron entre 60-70%, con una dosis de 10^4 UFC/pez. Estos resultados se compararon con otros dos métodos para inducir la infección experimental: la exposición en baños y la cohabitación. Ambos métodos presentaron mortalidades acumuladas del 70% en 21 días de exposición, con dosis entre 2×10^6 - 8×10^6 UFC/ml, observándose que el *Salmo salar* mostró signos típicos de vibriosis. En ambos trabajos, se evidenció la patogenicidad de las

cepas, ya que fueron aisladas en el 98% de los peces muertos, mientras que en los controles, las bacterias de prueba no fueron aisladas en ningún caso.

Un trabajo interesante por ser pionero en esta área, es el desarrollado por Bergh *et al.* (1992), los cuales indujeron una infección experimental en huevos y eleuteroembriones de *Hippoglossus hippoglossus*. El objetivo fue examinar el efecto de tres bacterias patógenas potenciales del género de *Vibrio* sobre su supervivencia. La infección experimental se realizó adicionando una concentración de 3×10^6 UFC/ml en un recipiente con los huevos de *H. hippoglossus*. Los resultados mostraron mortalidades acumuladas hasta del 95% en ambas fases de desarrollo, observándose un decremento en la supervivencia conforme continúa el desarrollo del organismo. Con lo que concluyeron que la colonización de éstas bacterias podrían jugar un papel importante en la generación de la enfermedad y como consecuencia un incremento en las mortalidades en las fases larvarias de *H. hippoglossus*.

2.2 TAXONOMIA, ASPECTOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE LOS GÉNEROS DE *Vibrio* Y *Aeromonas*.

El conocimiento de agentes que causan enfermedades bacterianas no es muy avanzado, sin embargo, se ha reportado que su diversidad y su abundancia son considerables. La tabla 1 muestra la clasificación de algunas de las principales bacterias patógenas de peces más conocidas y estudiadas (Munro, 1982; Evelyn, 1996). La familia *Vibrionaceae* son organismos gramnegativos y anaerobios facultativos; sus dimensiones celulares van de 0.3-1.3 por 1-5 μm ; su morfología se caracteriza por ser bastones ligeramente curvos y rígidos, presentan una gran actividad móvil, ya que poseen un solo flagelo polar y no son capsulados; su fisiología presenta una reacción positiva a la oxidasa y todas usan D-glucosa como principal fuente de carbono (Prescott *et al.*, 1993).

Tabla 1. Sistemática de especies de bacterias patógenas para peces y sus principales características patológicas.

Familia	Género	Especie	Principales características patológicas
<i>Cytophagaceae</i> (red de bacterias)	<i>Flexibacter</i>	<i>F. columnaris</i> ^b <i>F. psychrophila</i> ^{a b} <i>F. marinus</i> ^{a b}	Lesiones en piel y branquias.
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Ps. Fluorescens</i> <i>Ps. anguilliseptica</i> ^a	Septicemias y hemorragias. Septicemias y hemorragias en anguilas.
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Edwardsiella</i> <i>Yersinia</i>	<i>E. tarda</i> <i>Y.ruckerii</i> ^a	Septicemias, hemorragias y lesiones en la piel.
<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio</i> <i>Aeromonas</i>	<i>V. anguillarum</i> <i>V. spp.</i> <i>A. hydrophila</i> <i>A. salmonicida</i>	Septicemias, hemorragias y lesiones en la piel.
Inciertas pero Gram-negativas	<i>Flavobacterium</i> <i>Pasteurella</i> <i>Haemophilus</i>	<i>F. sp.</i> <i>P. piscicida</i> ^{a b} <i>H. piscium</i>	Lesiones en la piel, hemorragias y septicemias. Granulomas. Lesiones en la piel, septicemias y hemorragias.
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Str. faecalis</i> <i>Str. sp.</i>	Granulomas y hemorragias.
<i>Nocardiaceae</i>	<i>Nocardia</i>	<i>N. asteroides</i> <i>N. kampfachi</i> ^{a b}	Granulomas específicas de tubérculos.
Inciertas pero Gram-positivas	Inciertas	Bacterias de la enfermedad del riñón ó <i>Renibacterium salmoninarum</i> ^{a b}	Granulomas en salmonidos y hemorragias.
<i>Bacillaceae</i> <i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Clostridium</i> <i>Mycobacterium</i>	<i>Cl. botulinum</i> <i>M. fortuitum</i> <i>M. marinum</i>	Intoxicación y granulomas especiales de tubérculos.
<i>Chlamydiaceae</i>	Incierta	Incierta	Quistes epiteliales.

^a No listada en Bergey's, 1974. ^b No listada en "Lista aprobada de nombres de bacterias".

Las principales características bioquímicas de los géneros *Vibrio* y *Aeromonas* se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Principales características bioquímicas de los géneros *Vibrio* y *Aeromonas*.

Características Bioquímicas	<i>Vibrio</i>	<i>Aeromonas</i>
Oxidasa	+	+
Catalasa	+	+
Indol	+	+
Lisina-descarboxilasa	+	-
Voges-Proskauer	-	-
Glucosa (ácido)	+	+
Manosa (ácido)	+	+
Sucrosa (ácido)	+	+
Arabinosa	-	-
Movilidad	+	+
Gelatina	+	+
Flagelo polar	+	+ (1 ó más)
Crecimiento anaerobio	+	+
Crecimiento 0% de NaCl	V	+
Crecimiento 6% de NaCl	V	-
Rojo de metilo	+	+
Crecimiento óptimo (37°C)	+	+

V = reacciones variables.

2.3 PRINCIPALES MICROORGANISMOS PATÓGENOS DE PECES Y FACTORES POTENCIALES DE VIRULENCIA EN *Vibrio* y *Aeromonas*.

De los millones de bacterias que se encuentran en contacto con los peces durante su ciclo de vida, relativamente pocas bacterias son capaces de causar infecciones sistémicas que culminan en una enfermedad (Austin y Austin, 1993). De éstas, las

llamadas patógenos obligados, son las que dependen totalmente del tejido del pez vivo para sobrevivir (Evelyn, 1996). De acuerdo a Evelyn (1996), las bacterias patógenas de peces más importantes y mejor estudiadas, así como aquellas que causan infecciones sistémicas y que son responsables de grandes pérdidas económicas en granjas de peces, son las siguientes:

1.- *Vibrio anguillarum*, agente causal de vibriosis, afecta a un amplio intervalo de peces de origen marino, en casos graves se presenta una anemia hemolítica asociada con una severa destrucción de tejido linfoide y hematopoyético.

2.- *Aeromonas salmonicida*, agente causal de furunculosis, principalmente en salmones. La infección en forma aguda se ha observado en peces jóvenes y puede ser fatal en un período de tiempo corto. En la forma crónica, los peces pueden llegar a la anemia y todos los órganos viscerales son dañados severamente; el tejido del riñón se deshace y se presentan lesiones cavernosas ("furuncles").

3.- *Renibacterium salmoninarum*, agente causal de la enfermedad del riñón, afecta principalmente a salmonidos, normalmente la infección es ligeramente progresiva y posteriormente fatal; se caracteriza por la presencia de lesiones granulares en riñón, bazo e hígado, seguido de anemia y ocasionalmente lesiones cavernosas en el músculo.

4.- *Yersinia ruckeri*, agente causal de la enfermedad entérica de la boca roja, afecta a salmonidos en agua dulce, es caracterizada por una septicemia hemorrágica en la que hay destrucción masiva, principalmente de los tejidos linfoide y hematopoyético en el riñón y el bazo.

5.- *Edwardsiella ictaluri*, agente causal de septicemia entérica de *Ictalurus punctatus*, se caracteriza por una inflamación extrema y un foco hemorrágico en la piel; en casos crónicos se presenta una lesión interna en el cráneo, así como una

necrosis extensiva de tejidos en el riñón, bazo e hígado acompañado por hemorragias y anemia.

6.- *Pasteurella piscicida*, agente causal de la pasteurelosis, afecta a muchas especies de peces marinos, principalmente en granjas de la *Seriola quinqueradiata* en Japón. La enfermedad es caracterizada por la presencia de nódulos granulomícos de color blanco, localizados principalmente en riñón y bazo, y la infección es acompañada por una necrosis interna muy extensa.

Por muchos años se han documentado las pérdidas por mortalidades de diversas especies de peces marinos y dulce acuícolas, tanto en vida libre como en sistemas de cultivo, las cuales han sido asociadas a diversas especies de bacterias. Muchas de éstas tienen cierta predisposición a asociarse con la superficie de diversas células del hospedero, logrando colonizar la superficie de células y tejidos de las membranas mucosas. Esto podría estar relacionado con el éxito de ciertos patógenos, ya que poseen algunos factores de virulencia que les permiten unirse, entrar, sobrevivir y multiplicarse en el hospedero vivo (Evelyn, 1996).

El principal factor de virulencia para bacterias patógenas de peces de los géneros de *Vibrio* y *Aeromonas* es la adhesión a superficies mucosas, que ha sido señalada como el primer paso en la patogénesis microbiana (Dawson *et al.*, 1981; Adams *et al.*, 1983; Hacker, 1992; Bordas *et al.*, 1996). Este proceso es específico, en el que intervienen estructuras superficiales bacterianas llamadas "adhesinas", que reaccionan con receptores de la superficie de las células del hospedero (Freeman, 1989). El "Pili" de bacterias es considerada como la principal adhesina y factor de colonización en la superficie del tejido de un hospedero (López-Cortés *et al.*, 1999). Así mismo, Busscher *et al.* (1984) encontraron que una interacción específica entre la superficie de los microorganismos (polímeros ó lectinas) y sus características fisicoquímicas (carga eléctrica ó superficies libres de energía) podrían estar involucradas en la adhesión de bacterias a una superficie.

Las “fimbrias”, son otro constituyente en la bacteria, del que se sabe están relacionadas con la morfología colonial, la tendencia a formar películas superficiales en medios líquidos, la capacidad de aglutinar ciertos eritrocitos y la adherencia a otras células eucarióticas. Las “fibrillas”, también están involucradas en la adhesión, en *Streptococcus pyogenes* forman complejos de proteína-ácido lipoteicoico. Se cree que en las fimbrias esta la adhesina que se une a la proteína ó glicoproteína de la membrana de la célula epitelial del hospedero (Freeman, 1989).

La hidrofobicidad es otro factor de virulencia importante en infecciones bacterianas (Lee y Yii, 1996) y guarda una estrecha relación con la adhesión bacteriana a superficies mucosas. Así mismo, la hidrofobicidad ha sido identificada como un factor importante en la unión bacteriana a células epiteliales humanas y en interfaces aire-agua (Dahlback *et al.*, 1981; Hermansson *et al.*, 1982). Sus fuerzas de interacción hidrofóbica son fuertemente atractivas y están determinadas por la interacción de componentes hidrofílicos y superficies hidrofóbicas. Una aproximación termodinámica describe las interacciones hidrofóbicas, como relaciones libres de energía en la interface bacteria-fagocito en un medio acuoso (Matz y Jürgens, 2001). Una superficie libre de energía decrece con el incremento de la hidrofobicidad (Magnusson *et al.*, 1980; Van Loosdrecht *et al.*, 1987; Stenström, 1989).

La existencia de dos sustancias sintetizadas por bacterias patógenas se sabe contribuyen en procesos patológicos, ya sea directa o indirectamente, facilitando la aparición de un foco de infección. Las hemolisinas y exoenzimas representan un factor potencial de virulencia en bacterias del género de *Vibrio* y *Aeromonas* (Balebona *et al.*, 1998) sobre larvas de peces e incluso en camarones peneidos (Tsai *et al.*, 1986; Van Wormhoudt *et al.*, 1992). Las hemolisinas, provoca la disolución o lisis de los hematíes en suspensión y las exoenzimas, catalizan la degradación de elementos estructurales en los tejidos de algún organismo. Se ha reportado que ambos géneros pueden producir cantidades suficientes tanto de

hemolisinas como de exoenzimas, lo que les confiere la capacidad de invadir, adherirse, sobrevivir y proliferar eficientemente en células epiteliales del hospedero (Balebona *et al.*, 1998).

3 JUSTIFICACIÓN

En la piscicultura marina como en cualquier otra industria de producción animal, los organismos están en riesgo de adquirir enfermedades que causen elevadas tasas de mortalidad. En los últimos años se ha reportado que uno de los principales problemas para el desarrollo del cultivo intensivo, son las altas mortalidades que se registran durante el período de crianza larvaria (Muroga *et al.*, 1987; Gatesoupe, 1990; Munro *et al.*, 1994). Estas mortalidades son atribuidas en gran parte a la proliferación de bacterias patógenas oportunistas (Skjermo y Vadstein, 1999), más que a la especificidad de patógenos obligados (Nicolas *et al.*, 1989). Sin embargo, el papel que juegan las bacterias de los géneros *Vibrio* y *Aeromonas* durante las diferentes etapas de desarrollo del cultivo de cabrilla arenera no ha sido completamente dilucidado. Así mismo, en los últimos años diversas investigaciones se han enfocado a desarrollar métodos de control microbiano en dichas etapas, con el fin de mejorar la calidad del agua y aumentar la resistencia de las larvas a infecciones bacterianas (Vadstein, 1997). Estos métodos han sido usados para evaluar el potencial de bacterias patógenas en huevos, larvas, juveniles y adultos de peces marinos (Bergh *et al.*, 1992), crustáceos (Robertson *et al.*, 1998) y moluscos (Anguiano-Beltrán *et al.*, 1998), desarrollando infecciones experimentales. Bajo este contexto, el interés de evaluar una infección experimental implementada para larvas de cabrilla arenera utilizando al rotífero como vía de infección, retoma importancia permitiendo confirmar el papel que juegan las bacterias de los géneros *Vibrio* y *Aeromonas* dentro de los sistemas de crianza larvaria.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar la patogenicidad de cepas de los géneros *Vibrio* y *Aeromonas* en eleuteroembriones y larvas de cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*), a través de una infección experimental.

4.2 Objetivos Particulares

4.2.1 Determinar si el rotífero *Brachionus plicatilis* actúa como vector de especies de *Vibrio* y *Aeromonas* patógenas para larvas de cabrilla arenera (*P. maculatofasciatus*).

4.2.2 Evaluar la patogenicidad de *Vibrio* y *Aeromonas* a través de la mortalidad de eleuteroembriones de cabrilla arenera durante infecciones experimentales.

4.2.3 Inducir una infección experimental en larvas de cabrilla arenera (*P. maculatofasciatus*), usando bacterias de los géneros *Vibrio* y *Aeromonas* aisladas de los sistemas de crianza larvaria y del cultivo de rotíferos (*Brachionus plicatilis*), para determinar la patogenicidad de las mismas.

4.2.4 Evaluar factores potenciales de virulencia de las cepas de *Vibrio* y *Aeromonas*, a través de la adhesión a la superficie mucosal de eleuteroembriones, hidrofobicidad y producción de exoenzimas y hemolisinas.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Bacterias utilizadas en el presente trabajo; método de cultivo e identificación.

Para corroborar la pureza de las cepas bacterianas (Tabla 3) se utilizaron placas petri con medio selectivo para *Vibrio*, Tiosulfato Citrato de Sales Biliares (TCBS, Difco) adicionado con 2.5% de Cloruro de Sodio (NaCl), sembradas por estría cruzada (Prescott *et al.*, 1993) e incubadas a 35°C por 24 h. Se resembró una colonia de cada cepa en tubos con medio de cultivo agar marino (AM) 2216 inclinado (anexo 1) a 33 ± 2 partes por mil (ppm) de salinidad, se incubaron a 35°C por 24 h y se conservaron en refrigeración.

Tabla 3. Bacterias utilizadas en el presente trabajo*.

Clave de las cepas	Fuente de aislamiento
226	Rotíferos
227	Rotíferos
228	Rotíferos
279	Larvas
280	Larvas
281	Larvas
282	Larvas
301	Larvas
302	Larvas
303	Larvas
** <i>Vibrio harveyi</i>	Vibriosis en camarón
** <i>Vibrio alginolyticus</i>	Septicemia hemorrágica en peces marinos

*Bacterias aisladas por Manuel Moreno Legorreta (Tesis en desarrollo) durante una corrida de producción de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*.

**Bacterias patógenas de referencia.

Para la identificación preliminar de las cepas se llevo a cabo tinción de Gram (anexo 2) y las pruebas bioquímicas API 20E, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los substratos utilizados fueron: ONPG, ADH, LDC, ODC, Citrato (CIT), Acido sulfúrico (H₂S), Urea (URE), TDA, Indol (IND), Vogues Proskahuer (VP), Gelatina (GEL), Glutamato (GLU), Manosa (MAN), Inositol (INO), Sorbitol (SOR), Ramnosa (RHA), Sacarosa (SAC), MEL, AMY, Arabinosa (ARA), Nitritos (NO₂) y Nitrógeno molecular (N₂). Además, se determinó la producción de catalasa y oxidasa (Mitruka y Bonner, 1976), así como la presencia de flagelo.

Posteriormente las cepas fueron sometidas a las pruebas de identificación del sistema BIOLOG[®] (anexos 3) de acuerdo a las especificaciones del fabricante, obteniendo como resultado la identificación a nivel de especie, género y/o familia de cada cepa (anexo 4).

5.2 Ajuste de la densidad óptica para relacionarla con las unidades formadoras de colonias (UFC).

Esta relación se usó para establecer la densidad de bacterias que sería utilizada durante los bioensayos; la cual se llevo a cabo como se muestra en la figura 1, sembrando las doce cepas (Tabla 3) masivamente por estría en placas petri con AM (2216) y se incubaron por 24 h a 35°C. La biomasa bacteriana se cosechó mediante una asa bacteriológica en tubos de ensayo con 10 ml de solución salina estéril (SSE) adicionada con 2.5% de NaCl. La suspensión celular obtenida fue lavada en dos ocasiones mediante centrifugación (centrifuga Beckman modelo GPR) a 3000 rpm, por 10 minutos a 4°C, recambiando la SSE en cada lavada. De manera aséptica, la suspensión celular de cada cepa bacteriana se diluyó hasta una densidad óptica de 1 a 550nm (DO₅₅₀ = 1) en un espectrofotómetro Merck modelo SQ118.

Con las suspensiones celulares previamente ajustadas de cada cepa, se realizaron diluciones decimales (hasta 10^{-7}) utilizando SSE al 2.5% de NaCl, las diluciones 10^{-5} a 10^{-7} fueron consideradas para realizar las cuentas viables en placa para cada cepa, las cuales se sembraron por triplicado. Las cepas 226, 227, 280, 281, 301, 303 y *Vibrio harveyi* se sembraron en placas petri con AM (2216) y las cepas 228, 279, 282, 302 y *Vibrio alginolyticus* en medio selectivo de TCBS (Difco) al 2.5% de NaCl. Se incubaron a 35°C por 24 h, tiempo en que se cuantificaron las UFC/ml.

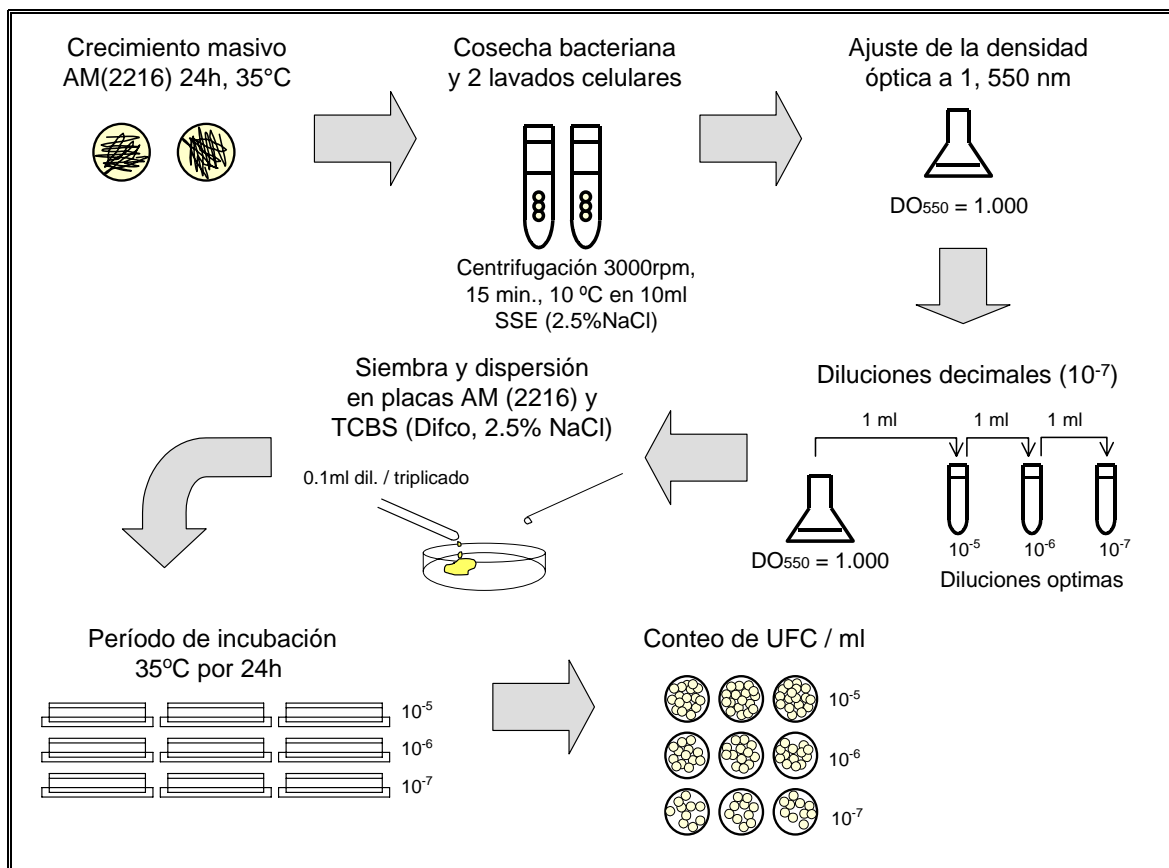


Figura 1. Esquema del ajuste de la densidad óptica con respecto a las unidades formadoras de colonia (UFC) para las cepas 226, 227, 228, 279, 280, 281, 282, 301, 302, 303, *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus*.

5.3 Evaluación del rotífero *Brachionus plicatilis* como vector de las cepas de los géneros *Vibrio* y *Aeromonas*.

5.3.1 Efecto de las bacterias sobre la supervivencia de *Brachionus plicatilis*.

Para evaluar la supervivencia de los rotíferos se realizó el siguiente procedimiento (Figura 2): se tomó una muestra de 1000 ml de un cultivo de rotíferos de la Unidad Piloto de Maricultura (UPIMA) y se concentró en 100 ml de agua de mar estéril (AME). Con la finalidad de retrasar la eclosión de los huevos, la temperatura del agua durante la desinfección se mantuvo en $14 \pm 2^\circ\text{C}$. Con un homogeneizador se estimuló la liberación de los huevos por 30 segundos. El homogeneizado se pasó por un doble tamiz (80 y 35 μm), recuperándose los huevos en este último, se enjuagaron con AME y fueron desinfectados con una solución de Trimetoprima-Sulfametoxazol, al 2% por 15 minutos y al 0.2% por 24 h. Transcurrido este tiempo se obtuvieron huevos gnotobioticos, se enjuagaron con AME y se inocularon en recipientes de 2000 ml de capacidad. Los rotíferos neonatos se alimentaron con levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) axénica viva, se mantuvieron con un sistema de aireación y con un fotoperíodo de 12 h luz:12 h oscuridad previo al bioensayo.

Las cepas utilizadas para este bioensayo fueron 226, 227, 279 y 282, las cuales se sembraron en AM (2216), se ajustó su $\text{DO}_{550} = 1$ y se inoculó una densidad de bacterias alrededor de 10^8 UFC/ml por unidad experimental (UE). El bioensayo se inició 24 h después de la desinfección de los huevos, sembrando 50 rotíferos/ml en cada UE, las cuales contenían 500 ml de AME, con aireación, a una temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ y un fotoperíodo de 12 h luz:12 h oscuridad. Se tuvieron en total 30 UE con 6 replicas para cada tratamiento. Los controles (sin la adición de bacterias) fueron inoculados con levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). La evaluación se realizó 48 h después de iniciado el bioensayo, la cual consistió en tomar una muestra de 1 ml para cuantificar el número de rotíferos muertos y posteriormente, el total de rotíferos de la misma, que se llevó a cabo fijando la muestra con formol al 4%. Cada UE se cuantificó por triplicado.

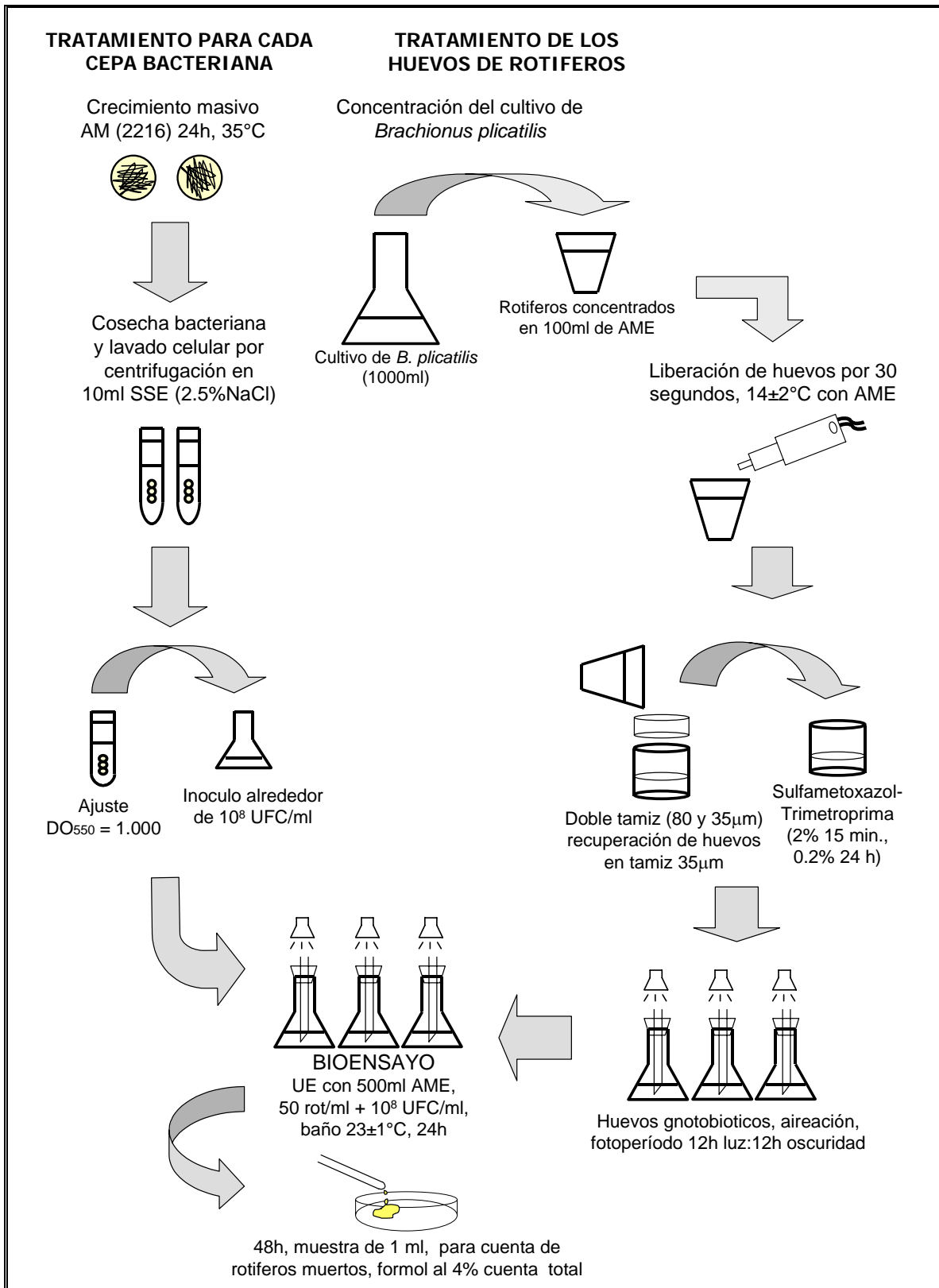


Figura 2. Diagrama del procedimiento de infección para evaluar el efecto de las bacterias 226, 227, 279 y 282 sobre la supervivencia del rotífero *Brachionus plicatilis*.

5.3.2 Bioencapsulación de las bacterias en el rotífero *Brachionus plicatilis*.

El desarrollo de este bioensayo se muestra en la figura 3, en el que se utilizaron las cepas 226, 228, 282, 302, 303 y *Vibrio harveyi*. El tratamiento de los rotíferos y bacterias se realizó como se señala en el apartado 5.3.1 (Figura 2). La variante para este bioensayo fue la desinfección de los huevos, para los cuales se utilizó una mezcla de antibióticos (Kanamicina, Eritromicina, Penicilina, Estreptomicina y Bactrim) al 1% cada uno en 500 ml de AME por 24 h. Después de la desinfección de los huevos (24 h), fueron sembrados los rotíferos gnotobioticos a una densidad aproximada de 5 rotíferos/ml en UE con 200 ml de AME, a temperatura constante ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$) y un fotoperíodo de 12 h luz:12 h oscuridad. Se inoculó una densidad de bacterias alrededor de 10^8 UFC/ml por UE. Se tuvieron en total 21 UE con triplicados por tratamiento. Los controles negativos fueron inoculados con un cultivo puro de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) viva y la cepa de *Vibrio harveyi* fue considerada como control positivo.

El seguimiento experimental consistió en obtener una muestra de cada tratamiento a las 3, 6, 12 y 24 h (considerando el tiempo cero como inóculo inicial de bacterias) extrayendo 100 rotíferos vivos de una alícuota de 50 ml con ayuda de un microscopio estereoscópico. Los rotíferos vivos se colocaron en un tamiz de 35 μm para enjuagarlos con AME y finalmente se vaciaron en un tubo de ensayo donde fueron homogeneizados en un volumen de 3 ml de AME, a partir del cual se realizaron las diluciones decimales hasta 10^{-4} . Las diluciones 10^{-2} a 10^{-4} fueron consideradas para realizar las cuentas viables por triplicado, tanto en AM (2216) como en TCBS (Difco, 2.5% NaCl). El período de incubación fue a 35°C por 24 h, tiempo en el que se contabilizó las bacterias por UE para calcular las UFC/rotífero.

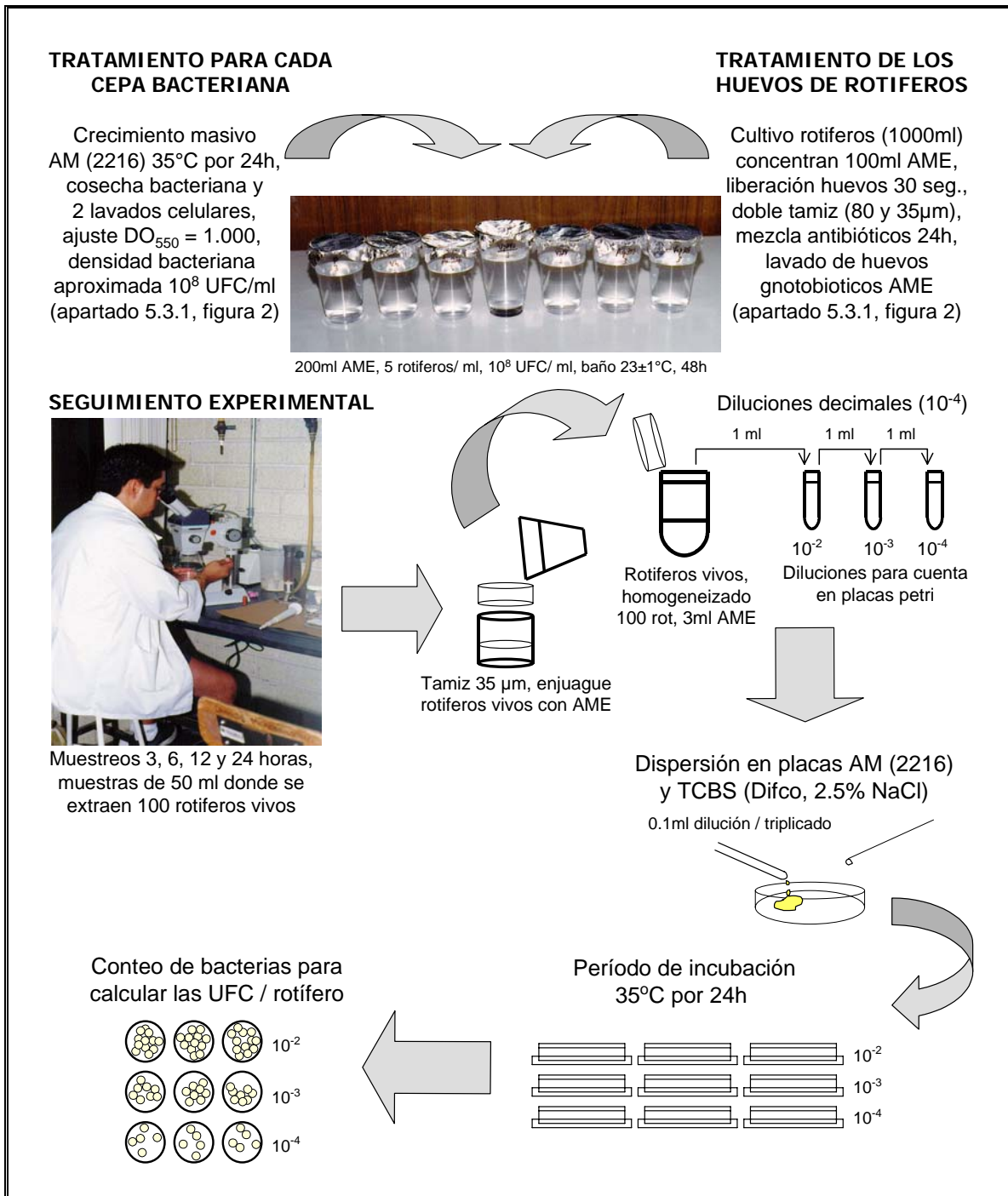


Figura 3. Esquematación para evaluar la bioencapsulación de las bacterias 226, 228, 282, 302, 303 y *Vibrio harveyi* en el rotífero *Brachionus plicatilis*.

5.4 Patogenicidad de *Vibrio* y *Aeromonas* en eleuteroembriones de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*).

En la figura 4 se esquematiza el proceso para la evaluación de la patogenicidad de las cepas 226, 227, 228, 279, 280, 281, 282, 301, 302, 303, *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus* sobre los eleuteroembriones de cabrilla arenera cuantificando su mortalidad. El tratamiento de las bacterias se realizó como se señala en el apartado 5.3.1 (Figura 2). Para esta evaluación se llevaron a cabo 2 bioensayos. Para el tratamiento de los huevos de cabrilla, se obtuvo un desove natural del cultivo de reproductores de cabrilla arenera, mantenidos en el Laboratorio de Biología Experimental. Los huevos viables fueron separados en una solución de salmuera a 35 ppm, por 15 minutos, aquellos que flotaron fueron recuperados en un tamiz de 100 μm para ser lavados con AME y se pasan a un recipiente donde fueron sumergidos en una solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 2% por 3 minutos. Transcurrido este tiempo, los huevos se pasan por dos recipientes que contenían AME (por 3 minutos en cada uno) donde fueron enjuagados y finalmente, los huevos se concentraron en otro recipiente con 1000 ml de AME para después ser inoculadas las UE. La temperatura del agua durante la desinfección de los huevos se mantuvo constante ($19 \pm 1^\circ\text{C}$).

Cada bioensayo se inició sembrando 80 huevos por UE con 100 ml de AME. Una vez eclosionados los huevos (24 h), cada UE se inoculo con una densidad bacteriana aproximada de 10^8 UFC/ml, las cuales se mantuvieron en un sistema de baño a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ con un fotoperíodo de 12 h luz:12 h oscuridad. Se tuvieron en total 39 UE en cada bioensayo con triplicados por tratamiento. Los controles negativos se inocularon con SSE (2.5% NaCl) y los controles positivos con las cepas de referencia (*V. harveyi* y *V. alginolyticus*). Después de 48 h de iniciados los bioensayos se contabilizaron el número de eleuteroembriones muertos para cada UE.

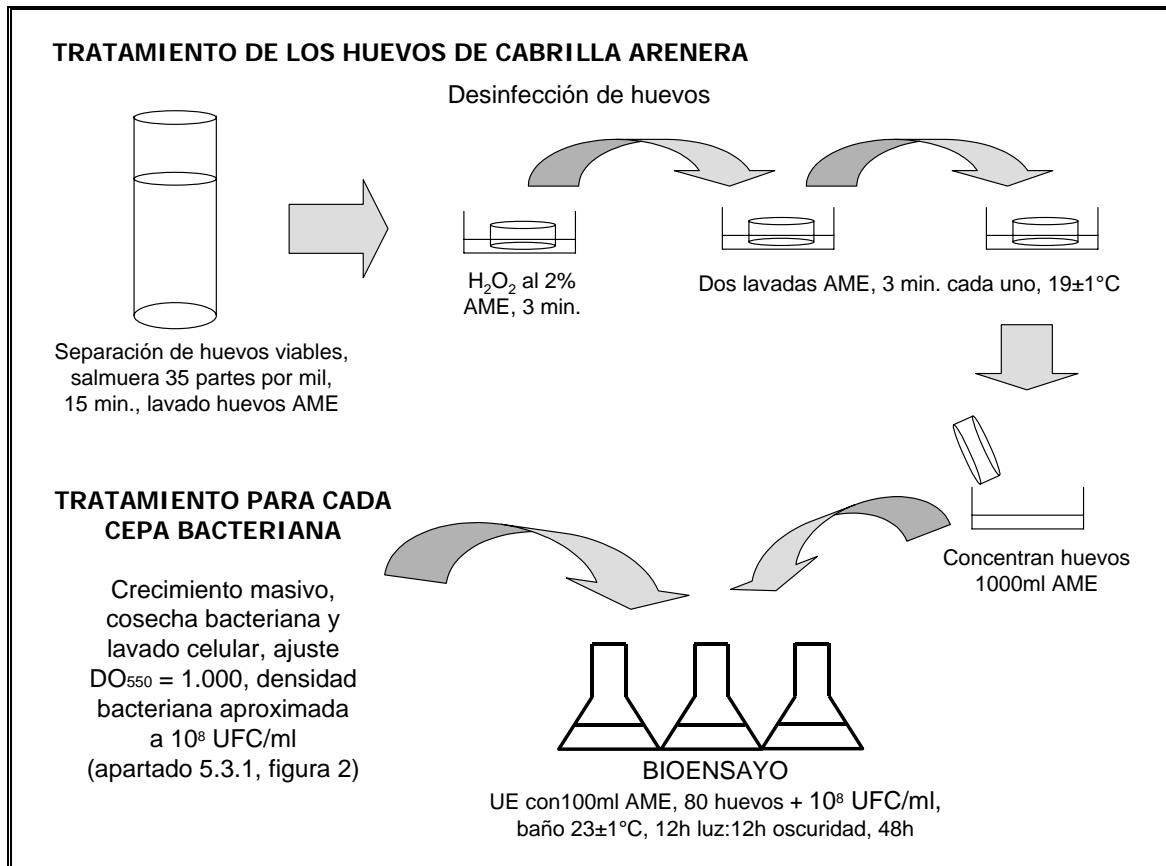


Figura 4. Esquema para evaluar la mortalidad de eleuteroembriones de cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) con las cepas 226, 227, 228, 279, 280, 281, 282, 301, 302, 303, *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus*, después de 48 h de exposición.

5.5 Infección experimental en larvas de cabrilla arenera (*P. maculatofasciatus*) usando al rotífero *Brachionus plicatilis* como vector.

Se realizaron 4 bioensayos de infección experimental bajo las mismas condiciones (Figura 5). Las bacterias probadas por bioensayo fueron: bioensayo 1, *V. harveyi*, 226, 281, 282, 302, 303 y 228; bioensayo 2, *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, 226, 282, 280, 301, 303 y 227; bioensayo 3, *V. harveyi*, 226, 281, 282, 302, 303 y 228; y bioensayo 4, se probaron las doce cepas de la tabla 3.

La obtención y desinfección de los huevos gnotobioticos de *Brachionus plicatilis* se realizó de la misma manera como se señala en los apartados 5.3.1 (Figura 2) y

5.3.2, respectivamente. La desinfección de los huevos de cabrilla arenera se llevó a cabo como se señala en el apartado 5.4 (Figura 4). Se usaron UE de 250 ml de capacidad con 100 ml de AME y se sembraron 80 huevos de cabrilla arenera por UE. 48 h después de su eclosión y antes de que las larvas comenzaran la ingesta, como alimento se adicionó una densidad de 5 rotíferos/ml y alrededor de 10^8 UFC/ml por UE, las que se mantuvieron en un sistema de baño a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ con fotoperíodo de 12h luz:12h oscuridad. El total de UE por bioensayo fueron las siguientes: bioensayo 1, 24; bioensayo 2, 27; bioensayo 3, 24 y bioensayo 4, 39, con sus respectivos triplicados por tratamiento. Los controles negativos se inocularon con SSE (2.5% NaCl) y los controles positivos con las bacterias de referencia (*V. harveyi* y *V. alginolyticus*). 48 h después de la adición de rotíferos y bacterias se realizó la evaluación cuantificando el número de larvas muertas por UE en cada bioensayo.

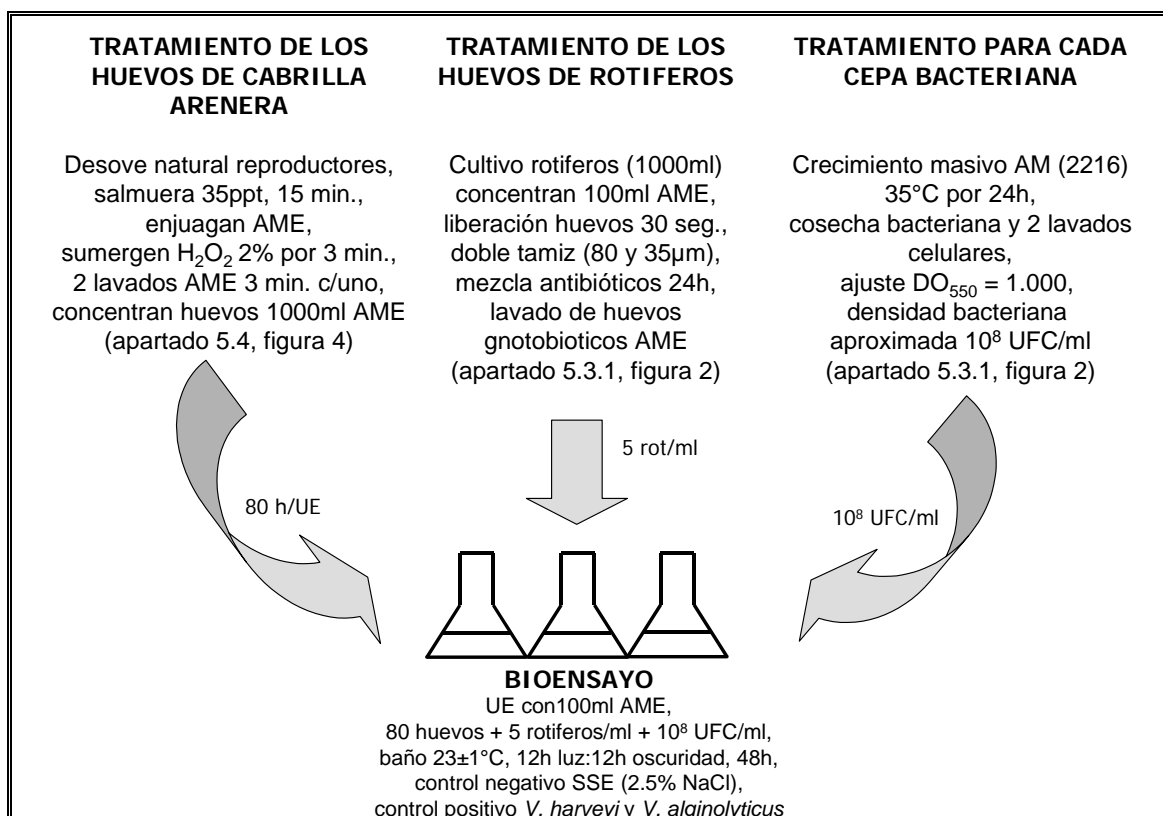


Figura 5. Esquematación para evaluar la mortalidad de larvas de cabrilla arenera a través de una infección experimental con *Vibrio* y *Aeromonas* después de 48 h de su exposición, usando al rotífero *Brachionus plicatilis* como vector de la infección.

5.6 Análisis de factores potenciales de virulencia en cepas de *Vibrio* y *Aeromonas*.

5.6.1 Adhesión de bacterias a la superficie mucosal de la piel de eleuteroembriones de cabrilla arenera (*P. maculatofasciatus*).

Se realizaron 2 bioensayos para esta evaluación en la que se utilizaron las doce cepas bacterianas (Tabla 3). La obtención y desinfección de los huevos de cabrilla arenera se llevó a cabo bajo las mismas condiciones experimentales que se describen en el apartado 5.4 (Figura 4) y el tratamiento de las bacterias se realizó como se describe en el apartado 5.3.1 (Figura 2).

El inicio de cada bioensayo y las condiciones experimentales que tuvieron las UE se describen en el apartado 5.4 (Figura 4). El muestreo para cuantificar el número de bacterias adheridas al moco de los eleuteroembriones (UFC/eleuteroembrión) se realizó de la siguiente manera: al final de los bioensayos (48 h) fueron extraídas 20 larvas vivas de cada UE para ser enjuagadas con AME en tres ocasiones. Posteriormente, las larvas se homogeneizaron en tubos de ensayo en un volumen de 3 ml de AME, a partir del homogeneizado se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-3} . Cada dilución fue inoculada por triplicado en placas petri con AM (2216) y TCBS (Difco, 2.5% NaCl). Se incubaron a 35°C por 24 h, tiempo en el que se cuantificó el número de UFC/ml adheridas por eleuteroembrión. Así mismo, se observó la capacidad de las cepas bacterianas para formar una película superficial en medio BHI (Infusión de Cerebro-Corazón).

5.6.2 Hidrofobicidad (aglutinamiento) de células bacterianas de *Vibrio* y *Aeromonas*.

En esta prueba se utilizaron las doce cepas de bacterias (Tabla 3) y se realizó por triplicado. El tratamiento de las bacterias se desarrollo como se indica en el apartado 5.2 (Figura 1). Una vez obtenidas las suspensiones celulares con una $DO_{550} = 1$ (alrededor de 10^8 células/ml), se realizó la prueba de aglutinación de sal

(SAT) propuesta por Lindahl *et al.* (1981), que consiste en suspender células bacterianas en 0.002 moles de una solución amortiguadora con Buffer de fosfatos (PBS) a pH de 6.8. Para establecer el grado de hidrofobicidad, se preparó una solución de sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) con un gradiente de diez concentraciones molares: 4, 3.6, 3.2, 2.8, 2.4, 2, 1.6, 1.2, 0.8 y 0.4. El procedimiento de la prueba consistió en colocar en un portaobjetos igual cantidad de volumen (25 µl) de la suspensión bacteriana y de ((NH₄)₂SO₄), fue mezclado y agitado por 2 minutos a temperatura ambiente. La concentración de ((NH₄)₂SO₄) requerida para provocar aglutinamiento en las células bacterianas se determinó en cultivos que crecieron a 35°C por 24 h.

Un aglutinamiento positivo fue reconocido con la formación de una masa visible de las células en suspensión. Un aglutinamiento negativo fue reconocido por la ausencia de la masa celular. El criterio descrito por Santos *et al.* (1990) fue usado para establecer el grado de hidrofobicidad de las cepas (Tabla 4).

Tabla 4. Criterio para determinar el grado de hidrofobicidad según Santos *et al.* (1990).

Intervalos ((NH ₄) ₂ SO ₄) (mol/l)	Categoría	Resultado
0.0-1.0	Fuerte	+++
1.0-2.0	Moderado	++
2.0-4.0	Ligero	+

5.6.3 Producción de exoenzimas y hemolisinas por bacterias de los géneros de *Vibrio* y *Aeromonas*.

Se probaron las doce cepas de bacterias de la tabla 3. Fueron preparadas placas petri con agar de Soya y Triptocaseína (TSA, 2.5% NaCl), adicionadas con diferentes substratos de enriquecimiento previo a la esterilización. Para las pruebas enzimáticas se uso como medio base TSA y como substrato de enriquecimiento: caseína, yema de huevo, almidón, gelatina y Tween 80, al 1%

cada uno. En las pruebas hemolíticas los substratos fueron: sangre de cabrilla arenera (*P. maculatofasciatus*) al 5% y sangre de carnero (placas comerciales). La siembra de las bacterias en ambas pruebas, se llevo a cabo por el método de siembra por punción, con excepción de la prueba de lipasa (yema de huevo y Tween 80), la cual fue sembrada trazando una línea en la superficie del agar. La siembra por cepa y substrato de enriquecimiento se realizó por duplicado, incubándose a 35°C por 24-96 h. Una reacción positiva fue evidenciada por la formación de un halo alrededor de la punción en el agar y la ausencia de halos fue considerada como reacción negativa. En el caso de la prueba de lipasa, se considero una reacción positiva cuando se presento crecimiento bacteriano por encima y alrededor de la línea trazada en el agar.

5.7 Tratamiento estadístico.

Para probar el efecto de las bacterias sobre la supervivencia de los rotíferos, los datos se sometieron a las pruebas de normalidad y homocedasticidad de varianzas. Ya que ambos supuestos fueron cumplidos, se procedió a realizar un análisis de varianza (ANOVA) para establecer diferencias significativas entre los tratamientos. Las diferencias de los tratamientos (con bacterias) con respecto al control fueron evidenciaron con un análisis de Newman-Keuls (NK). El valor de significancia (α) que se considero fue de 0.05 (Zar, 1999).

Para evaluar la mortalidad por efecto de las bacterias en los bioensayos con eleuteroembriones y larvas (en la infección experimental), los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) previa transformación arcoseno de los datos expresados en porcentaje. Las diferencias de los tratamientos (con bacterias) con respecto al control en el caso de los eleuteroembriones se evidenciaron con una prueba de NK y en el caso de las larvas con una de Tukey-HSD. El valor de significancia (α) en ambos casos fue de 0.05 (Zar, 1999).

6 RESULTADOS

6.1 Identificación preliminar de las cepas bacterianas usadas en este estudio.

La tinción de Gram permitió observar que todas las bacterias son Gram negativas, con formas típicas de bacilos y cocobacilos. De las diez cepas utilizadas en el presente estudio solamente las cepas 228, 279 y 282 se identificaron de manera preliminar de acuerdo a las pruebas bioquímicas API 20E, como pertenecientes al género *Vibrio* y muy próximas a la especie *alginoliticus*. Las pruebas de catalasa y oxidasa resultaron positivas para todas las cepas, así mismo, como la presencia de flagelo. En la tabla 5, se observa la identificación taxonómica de las diez cepas de bacterias, mediante el sistema BIOLOG[®], así como su procedencia. Destacando que la identificación fue posible a nivel específico en seis de ellas, mientras que las cuatro restantes, solo se logró a nivel género (2) y familia (2). El porcentaje de identificación reportado por el sistema a nivel de especie osciló entre 91-100%.

Tabla 5. Identificación de las cepas de estudio con el Programa BIOLOG[®].

Cepas	Especie identificada	% identificación	Fuente aislamiento
226	<i>Aeromonas media</i>	91	Rotíferos
281	<i>Aeromonas media</i>	97	Larvas
282	<i>Vibrio proteolyticus</i>	100	Larvas
279	<i>Vibrio proteolyticus</i>	99	Larvas
280	<i>Vibrio charchariae</i>	100	Larvas
301	<i>Aeromonas ichthiosmia</i>	95	Larvas
302	<i>Aeromonas</i> sp.*	SP	Larvas
303	<i>Vibrio</i> sp.*	SP	Larvas
227	Vibrionaceae**	SP	Rotíferos
228	Vibrionaceae**	SP	Rotíferos

*=Identificación a nivel género. **=Identificación a nivel familia. SP=sin porcentaje.

6.2 Evaluación del rotífero *Brachionus plicatilis* como vector de las cepas de los géneros *Vibrio* y *Aeromonas*.

6.2.1 Efecto de la acción de cepas de *Vibrio* y *Aeromonas* sobre la supervivencia del rotífero *Brachionus plicatilis*.

En la figura 6 se muestra que la supervivencia de los rotíferos en los tratamientos con las cepas *Vp279* y *Am226* presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al grupo control. El resto de los tratamientos (*V227* y *Vp282*) no presentaron dichas diferencias, pero sí con respecto a los otros dos tratamientos. La tabla 6 muestra los resultados del ANOVA de los tratamientos con bacterias con respecto al grupo control.

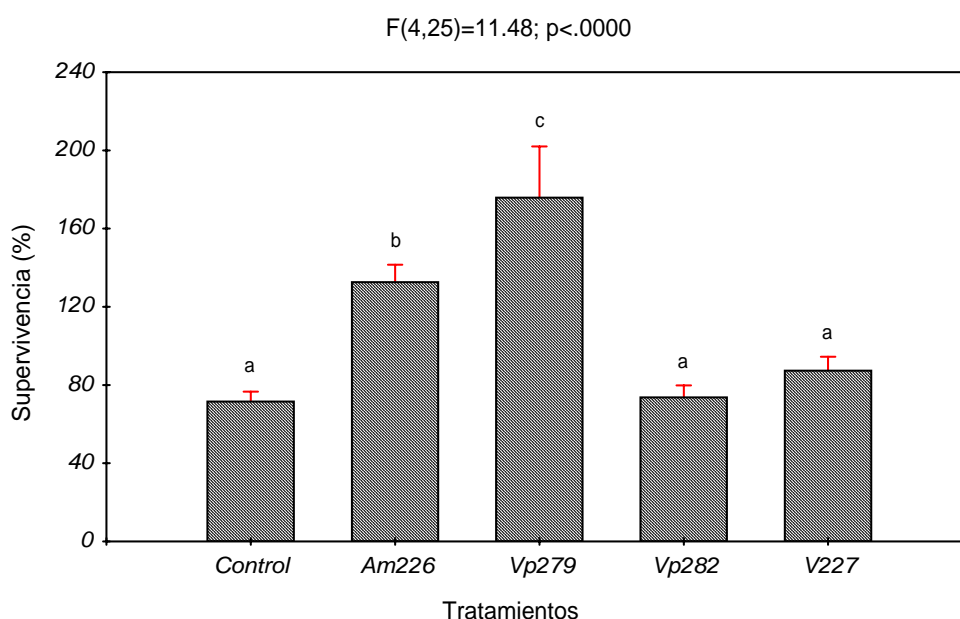


Figura 6. Supervivencia del rotífero *Brachionus plicatilis* después de 48 h de exposición a las cepas bacterianas *Am226*, *Vp279*, *Vp282* y *V227*. El control fue adicionado con levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Los valores representan la media \pm EE de seis réplicas por tratamiento, con un nivel de confianza de 0.05.

Tabla 6. Análisis de varianza de una vía de los tratamientos con bacterias con respecto al control.

Fuente de Variación	g.l.	S.C.	C.M.	F	p<0.05
Tratamientos	4	48475.1563	12118.7891	11.4751	0.00002

g.l. = grados de libertad. S.C. = suma de cuadrados. C.M. = cuadrado medio. F = valor de tablas. p<0.05 = nivel de significancia.

6.2.2 Bioencapsulación de las cepas de *Vibrio* y *Aeromonas* en el rotífero *Brachionus plicatilis*.

En la figura 7 se muestra la tasa de filtración de bacterias por rotífero después de 24 h de su exposición. En esta evaluación se observó que las cepas *Vh*, *Am226*, *Vp282*, *A sp. 302*, *V sp. 303* y *V228* fueron filtradas eficientemente por los rotíferos durante las primeras tres horas, con una tasa promedio superior a las 5000 UFC/rotífero; así mismo, se observó un descenso en la tasa de filtración a partir de la hora seis y hasta la hora doce, donde se cuantificó una tasa promedio entre 1700-1800 UFC/rotífero. Finalmente para las 24 h la tasa de filtración se incrementó por arriba de las 2000 UFC/rotífero en promedio.

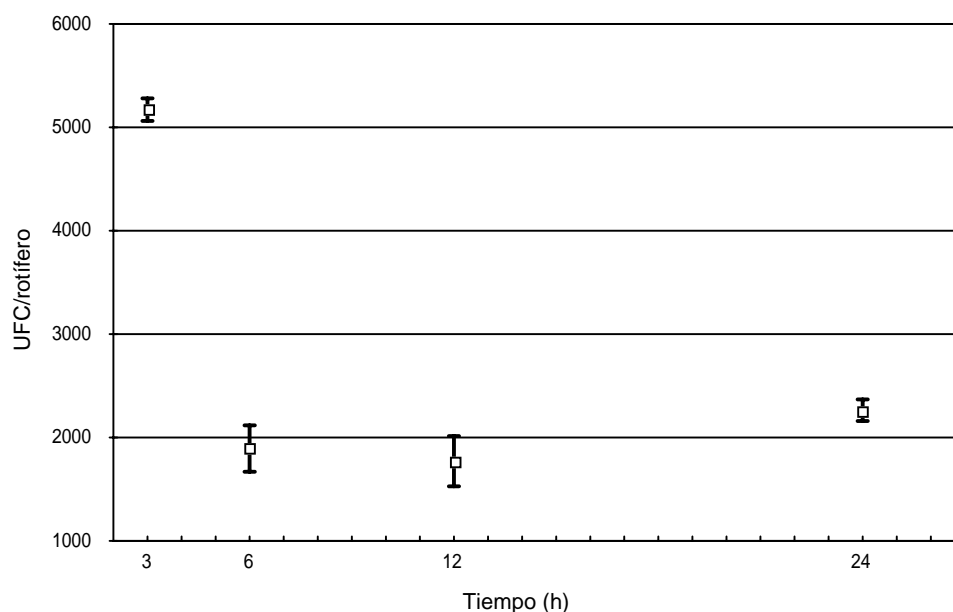


Figura 7. Tasa de filtración promedio de las cepas *Vh*, *Am226*, *Vp282*, *A sp. 302*, *V sp. 303* y *V228* por el rotífero *Brachionus plicatilis* durante 24 h de exposición. Los valores para cada tiempo de muestreo representan la media \pm EE de cuatro réplicas por tratamiento.

En la figura 8 se muestra la cantidad de bacterias bioencapsuladas por rotífero (UFC/rotífero) después de 24 h de exposición. Observándose que los tratamientos con las cepas *Vh*, *Vp282* y *V sp. 303* fueron bioencapsuladas con mayor eficiencia, registrando valores por arriba de las 6000 UFC/rotífero, mientras que con la cepa *V228* y el control negativo, presentaron valores de bioencapsulación entre 4000-6000 UFC/rotífero y finalmente las cepas *Am226* y *A sp. 302* tuvieron la tasa bioencapsulación más baja, entre 900-1700 UFC/rotífero. El control negativo (levadura axénica viva) mantuvo una bioencapsulación promedio de 5300 UFC/rotífero, mientras que el control positivo (*Vh*) de 8000 UFC/rotífero en promedio.

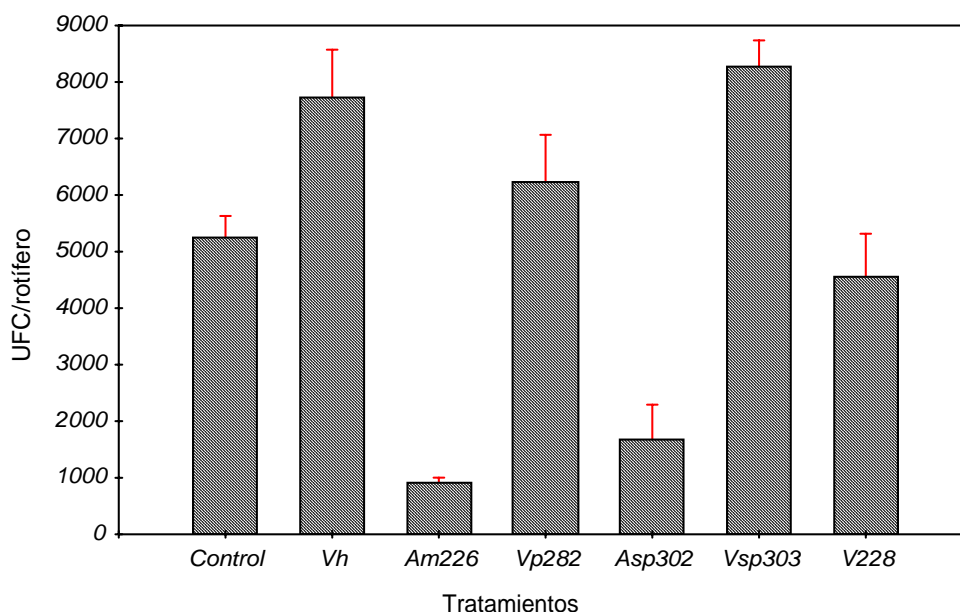


Figura 8. Bioencapsulación de las bacterias (UFC's) *Vh*, *Am226*, *Vp282*, *A sp. 302*, *V sp. 303* y *V228* por el rotífero *Brachionus plicatilis* después de 24 h de exposición. Los valores de cada tratamiento representan la media \pm EE de cuatro réplicas. El control negativo fue adicionado con levadura viva y la cepa *Vh* representó el control positivo.

6.3 Patogenicidad de cepas de los géneros *Vibrio* y *Aeromonas* en eleuteroembriones de *Paralabrax maculatofasciatus*.

6.3.1 Bioensayo 1.

La figura 9 muestra el efecto de las doce cepas (Tabla 3) sobre la mortalidad de los eleuteroembriones. Los resultados del ANOVA (Tabla 7) reportaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la mortalidad de los eleuteroembriones en todos los tratamientos con respecto al grupo control (sin la adición de bacterias). La mortalidad promedio en el control fue del 31%, mientras que en el resto de los tratamientos fue del 70%.

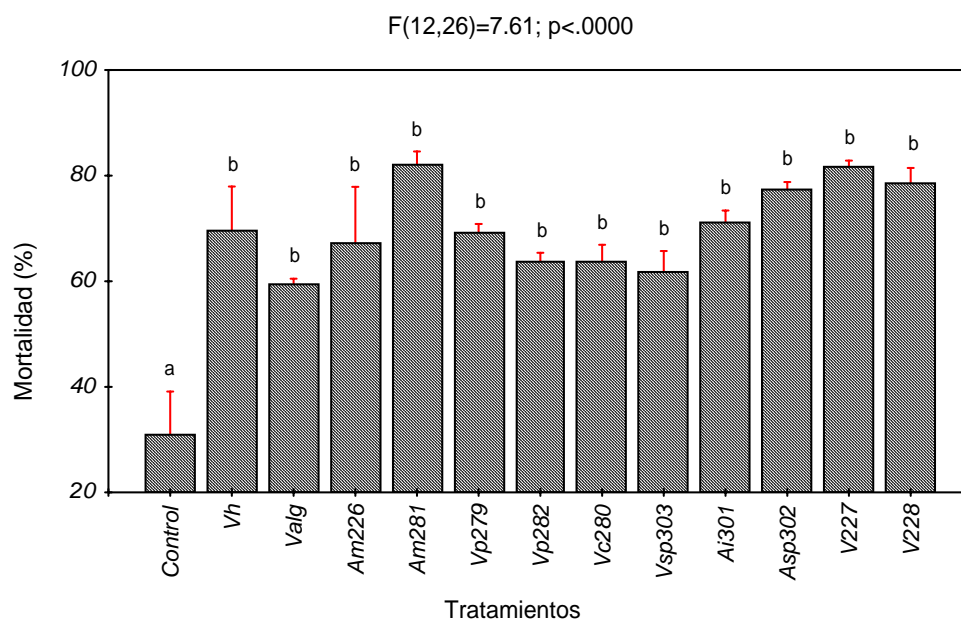


Figura 9. Mortalidad de los eleuteroembriones de *Paralabrax maculatofasciatus* después de 48 h de exposición a las cepas Vh, Valg., Am226, Am281, Vp279, Vp282, Vc280, V sp. 303, Ai301, A sp. 302, V227 y V228. Los valores representan la media \pm EE, con triplicados por tratamiento y un valor de confianza de 0.05.

Tabla 7. Análisis de varianza de una vía de seis bioensayos, donde se observan las diferencias significativas de los tratamientos con bacterias con respecto a sus controles.

Figuras	Fuente de Variación	g. l.	S. C.	C. M.	F	p(<0.05)
9	Patogenicidad en eleuteroembriones bioensayo 1	12	2.42 E + 03	2.02 E + 02	6.878846	2.09 E -05
10	Patogenicidad en eleuteroembriones bioensayo 2	12	8.33 E + 03	6.94 E + 02	22.613166	9.79 E -11
11	Infección experimental bioensayo 1	7	3.83 E + 02	5.47 E + 01	67.333274	1.29 E -11
12	Infección experimental bioensayo 2	8	1.08 E + 03	1.36 E + 02	13.203640	4.25 E -06
13	Infección experimental bioensayo 3	7	3.69 E + 02	5.27 E + 01	15.270380	4.08 E -07
14	Infección experimental bioensayo 4	12	7.19 E + 03	5.99 E + 02	17.315700	3.02 E -08

g.l. = grados de libertad. S.C. = suma de cuadrados. C.M. = cuadrado medio. F = valor de tablas. p<0.05 = nivel de significancia.

6.3.2 Bioensayo 2.

La mortalidad de los eleuteroembriones en todos los tratamientos presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) (Tabla 7) con respecto al grupo control, así como entre los tratamientos mismos (Figura 10). La mortalidad con la cepa *Vp279* (87.5%) presentó esas diferencias con respecto a los tratamientos con las cepas *Am226* (99.5%) y *Am281* (98.7%), quienes además presentaron las mortalidades significativamente más altas. La mortalidad promedio del control fue de 22.5%, mientras que el 95.6% fue representado por el resto de los tratamientos.

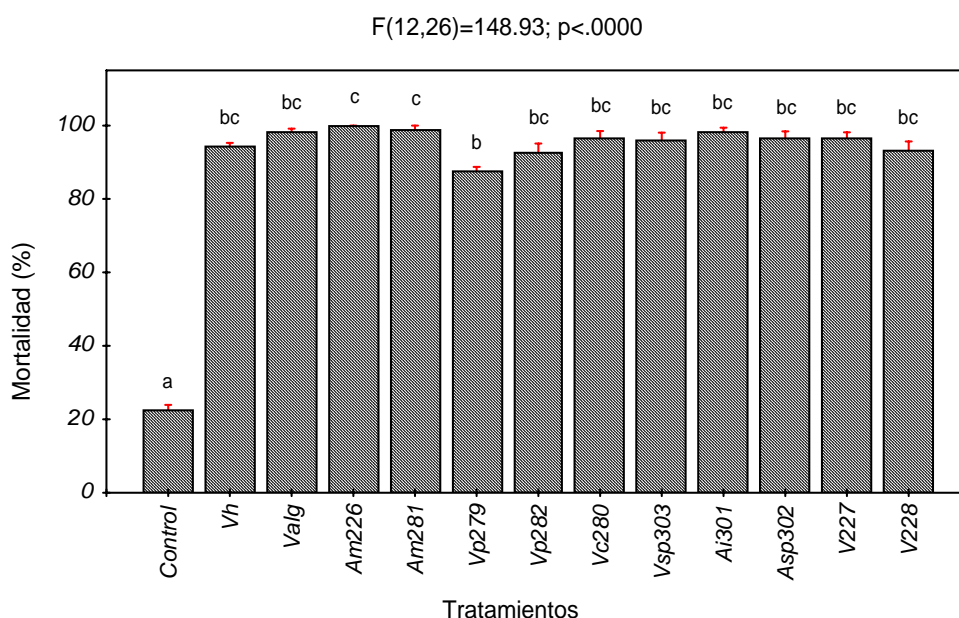


Figura 10. Mortalidad de los eleuteroembriones de *Paralabrax maculatofasciatus* después de 48 h de exposición a las cepas *Vh*, *Valg.*, *Am226*, *Am281*, *Vp279*, *Vp282*, *Vc280*, *V sp. 303*, *Ai301*, *A sp. 302*, *V227* y *V228*. Los valores representan la media \pm EE, con triplicados por tratamiento y un valor de confianza de 0.05.

6.4 Infección experimental en larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, usando al rotífero *Brachionus plicatilis* como vector de infección de *Vibrio* y *Aeromonas*.

6.4.1 Bioensayo 1.

En la figura 11 se observa que cuando se usaron para la infección las cepas *Vh*, *Am226*, *Am281*, *Vp282*, *A sp. 302*, *V sp. 303* y *V228* encapsuladas en los rotíferos, la mortalidad de las larvas en todos los tratamientos presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) (Tabla 7) con respecto al control. Quien registró una mortalidad promedio del 26%, en comparación con el resto de los tratamientos que fue entre 38-48%. Así mismo, las mortalidades significativamente más altas en promedio fueron con las cepas *Vp282* (48%) y *A sp. 302* (47%), quienes además causaron diferencias con las otras cinco cepas.

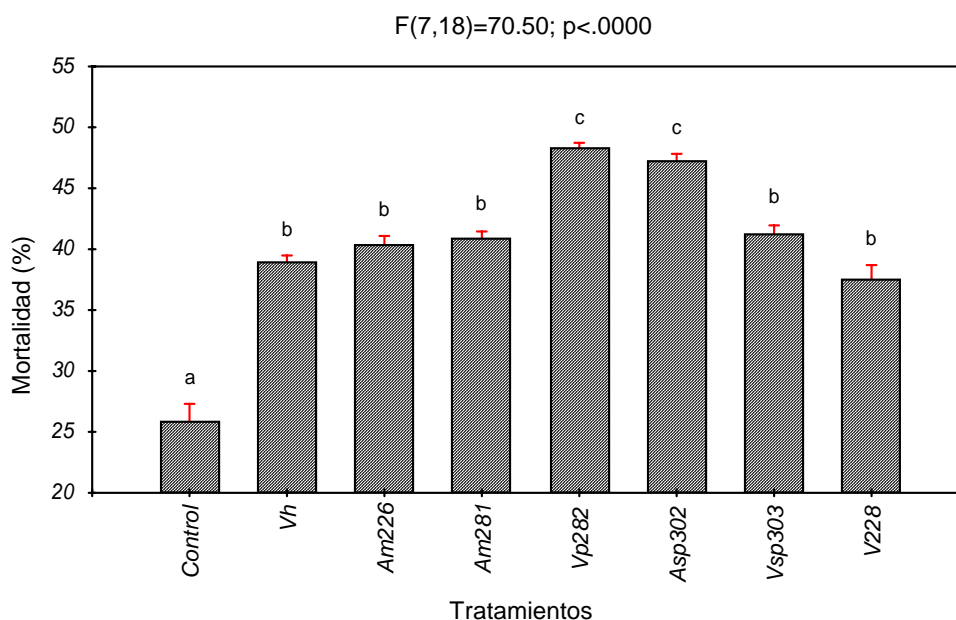


Figura 11. Mortalidad de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* después de 48 h de exposición a las cepas de *Vh*, *Am226*, *Am281*, *Vp282*, *A sp. 302*, *V sp. 303* y *V228* bioencapsuladas en el rotífero *Brachionus plicatilis*. Los valores representan la media \pm EE, con triplicados por tratamiento y un valor de confianza de 0.05.

6.4.2 Bioensayo 2.

En la figura 12 se observa que cuando se bioencapsularon en el rotífero las cepas *Vh*, *Valg.*, *Am226*, *Vp282*, *Vc280*, *Ai301*, *V sp. 303* y *V227*, la mortalidad de las larvas presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) (Tabla 7) con respecto al control e incluso entre los tratamientos. Observándose que la mortalidad promedio del grupo control fue del 17%, mientras que en el resto de los tratamientos fluctuó entre 29-54%. La mortalidad significativamente más alta en promedio se registró con la cepa *V. alginolyticus* (54%) con respecto al resto de los tratamientos.

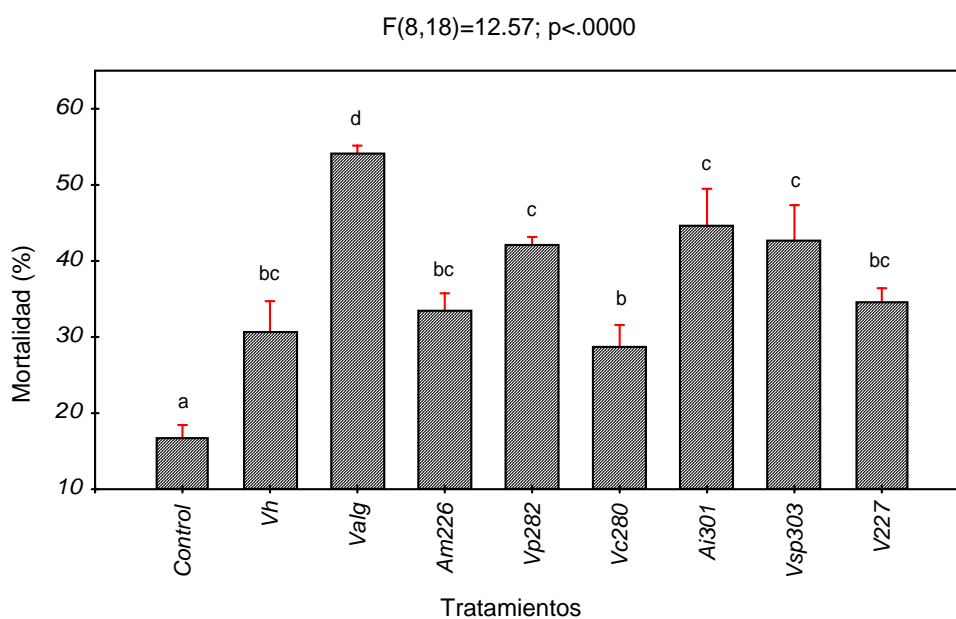


Figura 12. Mortalidad de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* después de 48 h de exposición a las cepas *Vh*, *Valg.*, *Am226*, *Vp282*, *Vc280*, *Ai301*, *V sp. 303* y *V227* bioencapsuladas en el rotífero *Brachionus plicatilis*. Los valores representan la media \pm EE, con triplicados por tratamiento y un valor de confianza de 0.05.

6.4.3 Bioensayo 3.

En la figura 13 se observa que de las cepas *Vh*, *Am226*, *Am281*, *Vp282*, *A sp. 302*, *V sp. 303* y *V228* usadas durante la infección experimental en larvas de cabrilla arenera, solamente *A sp. 302* y *V sp. 303* mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) (Tabla 7) en la mortalidad de las larvas con respecto al grupo control e incluso con las cepas *Vh*, *Am226*, *Vp282* y *V228*. Las mortalidades significativamente más altas en promedio fueron en los tratamientos con las cepas *A sp. 302* (21%) y *V sp. 303* (25%), en comparación con el 14% del grupo control.

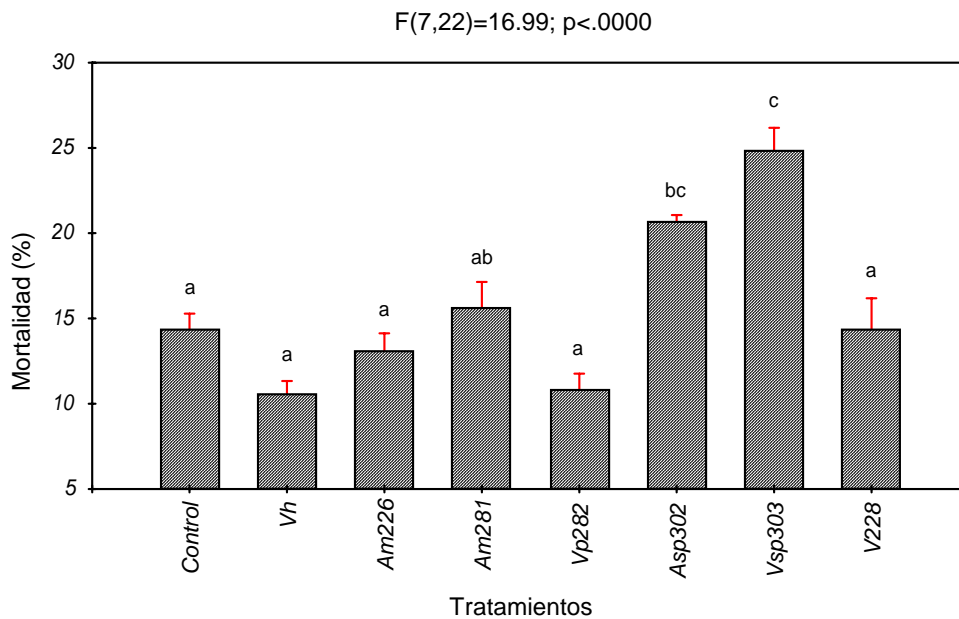


Figura 13. Mortalidad de larvas de *Parabrax maculatofasciatus* después de 48 h de exposición a las cepas *Vh*, *Am226*, *Am281*, *Vp282*, *A sp. 302*, *V sp. 303* y *V228* bioencapsuladas en el rotífero *Brachionus plicatilis*. Los valores representan la media \pm EE, con triplicados por tratamiento y un valor de confianza de 0.05.

6.4.4 Bioensayo 4.

En la figura 14 se observan las mortalidades de las larvas registradas en los tratamientos con las cepas *Vh*, *Valg.*, *Am281*, *Vp279*, *Vc280*, *V sp. 303*, *Ai301*, *A sp. 302*, *V227* y *V228*. Donde las mortalidades con diferencias significativamente ($p < 0.05$) (Tabla 7) más altas en promedio fueron ocasionadas por las cepas *Am281* (87%), *A sp. 302* (69%), *V sp. 303* (57%) y *Vp282* (55%) en comparación con el grupo control (19%). Estas diferencias también se registraron con otras cinco cepas del resto de los tratamientos.

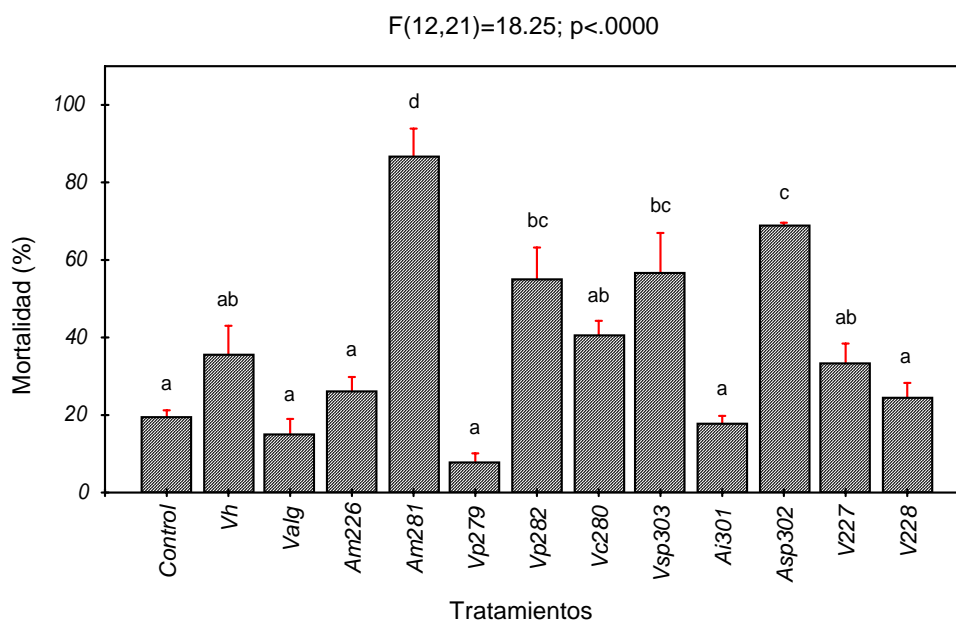


Figura 14. Mortalidad de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* después de 48 h de exposición a las cepas *Vh*, *Valg.*, *Am226*, *Am281*, *Vp279*, *Vp282*, *Vc280*, *V sp. 303*, *Ai301*, *A sp. 302*, *V227* y *V228* bioencapsuladas en el rotífero *Brachionus plicatilis*. Los valores representan la media \pm EE, con triplicados por tratamiento y un valor de confianza de 0.05.

6.5 Factores potenciales de virulencia de *Vibrio* y *Aeromonas*.

6.5.1 Adhesión a la superficie mucosal de la piel de eleuteroembriones de *Paralabrax maculatofasciatus*.

Bioensayo 1.

La figura 15 muestra el número de bacterias adheridas al moco de los eleuteroembriones en contraste con su mortalidad, donde se observa que el número de UFC/eleuteroembrión en los tratamientos se presentó en tres niveles: inferiores a 4×10^5 (*Vp279*, *V sp. 303*, *Ai301*, *A sp. 302* y *V228*), superiores a 1×10^6 (*Am281* y *V227*) y entre 4×10^5 - 1×10^6 (*Vh*, *Valg.*, *Am226*, *Vp282* y *Vc280*). Así mismo, los tratamientos *Vh*, *Am281*, *Vp282* y *V227* mostraron los mayores niveles de adhesión bacteriana al mismo tiempo que mortalidades significativas (con respecto a sus controles); el resto de los tratamientos mostraron bajos niveles de adhesión pero también con mortalidades significativas (Figura 9). Solo los tratamientos *Am281* y *V227* presentaron las mayores mortalidades junto con el mayor número de bacterias adheridas por eleuteroembrión.

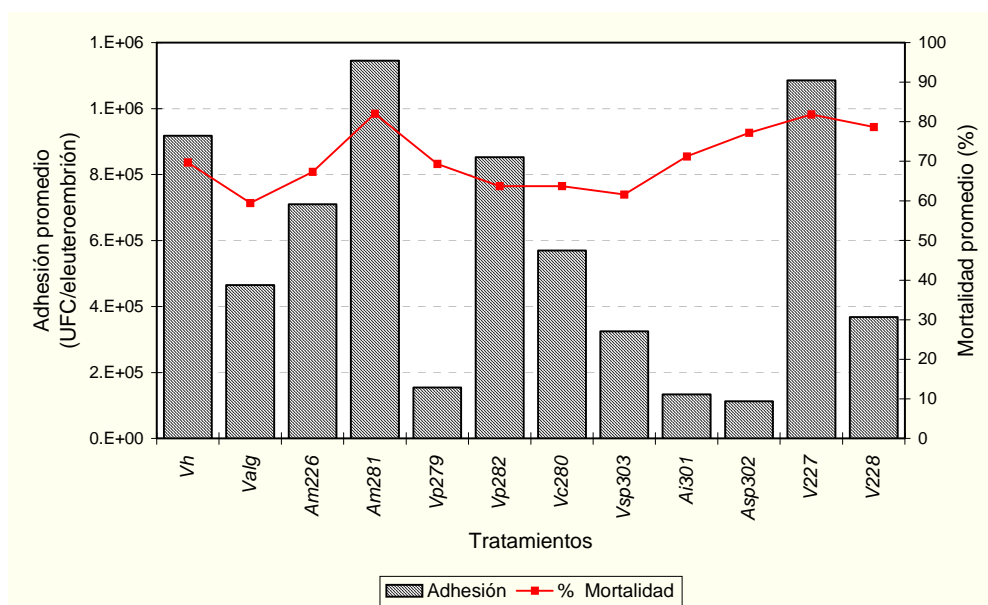


Figura 15. Adhesión de bacterias (UFC/eleuteroembrión) al moco de los eleuteroembriones y sus mortalidades después de 48 h de exposición. Los valores están representados por triplicado para cada tratamiento.

Bioensayo 2.

La figura 16 muestra los tres niveles de adhesión bacteriana (UFC/eleuteroembrión) promedio de los tratamientos: inferior a 7000 (*Vh*, *Am226*, *Vp279*, *A sp. 302* y *V228*), superior a 25000 (*Vc280*) y entre 7000-25000 (*Valg.*, *Am281*, *Vp282*, *V sp. 303*, *Ai301* y *V227*). Así mismo, el tratamiento con la cepa *Vc280* registró el mayor número (29100 UFC) de bacterias adheridas al moco de los eleuteroembriones, en contraste con *V228* (1200 UFC) quien presentó el menor nivel de adhesión, sin embargo, en todos los tratamientos las mortalidades fueron significativas con respecto a sus controles (Figura 10). Con excepción de las cepas *Am226*, *Vc280* y *V227* todas presentaron formación de una película en medio BHI.

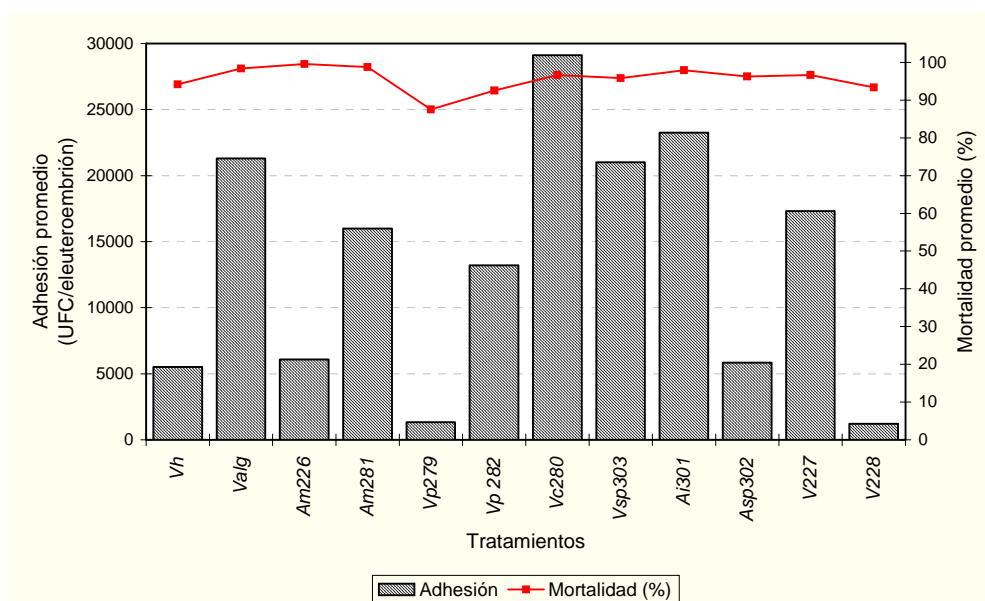


Figura 16. Adhesión de bacterias (UFC/eleuteroembrión) al moco de los eleuteroembriones y sus mortalidades después de 48 h de exposición. Los valores están representados por triplicado para cada tratamiento.

6.5.2 Hidrofobicidad de células de *Vibrio* y *Aeromonas* por el método de SAT.

En la tabla 8 se observa que de las doce cepas de estudio (Tabla 3), solo tres reportaron hidrofobicidad negativa y nueve fueron positivas. De acuerdo al grado

de hidrofobicidad, de las cepas positivas cinco fueron fuertemente hidrofóbicas, tres moderadamente y una ligeramente.

Tabla 8. Hidrofobicidad de las bacterias de estudio por el método del SAT (Salt Aggregation Test) propuesto por Lindahl *et al.* (1981).

Gradiente	(NH ₄) ₂ SO ₄	pH	<i>*Vibrio harveyi</i>	<i>*Vibrio alginolyticus</i>	<i>Aeromonas media 226</i>	<i>Aeromonas media 281</i>	<i>Vibrio proteolyticus 279</i>	<i>Vibrio proteolyticus 282</i>	<i>Vibrio charchariae 280</i>	<i>Vibrio sp. 303</i>	<i>Aeromonas ichthiosmia 301</i>	<i>Aeromonas sp. 302</i>	<i>Vibrionaceae 227</i>	<i>Vibrionaceae 228</i>
1	4	6.83	-	++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	-	++
2	3.6	6.83	-	++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	-	++
3	3.2	6.83	-	++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	-	++
4	2.8	6.83	-	++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	-	++
5	2.4	6.83	-	++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	-	++
6	2	6.83	-	++	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	++	-	++
7	1.6	6.83	-	++	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	++	-	++
8	1.2	6.83	-	++	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	++
9	0.8	6.83	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
10	0.4	6.83	-	-	-	-	+++	-	+++	+++	-	-	-	-
			NH	M	NH	F	F	F	F	F	L	M	NH	M

* = cepas de referencia. Grado de hidrofobicidad: F = fuerte; M = moderado; L = ligero y NH = no hidrofobico.

6.5.3 Producción de exoenzimas y hemolisinas por bacterias de los géneros de *Vibrio* y *Aeromonas*.

La tabla 9 muestra la actividad exoenzimática y hemolítica de las doce cepas bacterianas de estudio (Tabla 3). Todas las cepas presentaron producción de lipasas con la prueba Tween80; en la producción de amilasas diez fueron

positivas; cinco cepas fueron positivas en la producción de caseinasas, en gelatinasas siete fueron positivas y en lipasas (con yema de huevo) solo tres fueron positivas. En la producción de hemolisinas, solamente tres cepas de bacterias fueron positivas a la actividad hemolítica sobre los eritrocitos de sangre de cabrilla arenera, en contraste nueve fueron positivas sobre los eritrocitos de sangre de carnero.

Tabla 9. Producción de exoenzimas y hemolisinas que caracterizan la virulencia de cepas de los géneros *Vibrio* y *Aeromonas* (Balebona *et al.*, 1998).

BACTERIAS	^a Almidón	^b Yema de huevo	^c Caseína	^d Gelatina	^e Tween 80	^f Sangre Cabrilla	^g Sangre Carnero
<i>*Vibrio harveyi</i>	+	-	-	+	+	+	+
<i>*Vibrio alginolyticus</i>	-	-	-	+	+	-	+
<i>Aeromonas media</i> 226	-	+	-	-	+	SC	-
<i>Aeromonas media</i> 281	+	+	+	-	+	-	+
<i>Vibrio proteolyticus</i> 279	+	-	-	+	+	-	+
<i>Vibrio proteolyticus</i> 282	+	-	+	+	+	+	+
<i>Vibrio charchariae</i> 280	+	-	+	-	+	-	+
<i>Vibrio</i> sp. 303	+	-	+	-	+	SC	-
<i>Aeromonas ichthiosmia</i> 301	+	-	+	+	+	+	+
<i>Aeromonas</i> sp. 302	+	-	-	+	+	-	+
<i>Vibrionaceae</i> 227	+	+	-	-	+	-	-
<i>Vibrionaceae</i> 228	+	-	-	+	+	-	+

a = producción de amilasas. b = producción de lipasas. c = producción de caseinasas. d = producción de gelatinasas. e = producción de lipasas con reactivo Tween 80. f = sangre fresca al 5%. g = placas comerciales con eritrocitos de carnero. * = cepas de referencia. + = formación de halo. - = ausencia de halo. sc = sin crecimiento.

7 DISCUSIÓN

7.1 Identificación de las bacterias de los géneros *Vibrio* y *Aeromonas*.

La identificación de las bacterias con las pruebas API 20E no resultó confiable, debido probablemente a que no son pruebas específicas para bacterias de origen marino. Sin embargo, la aproximación al género *Vibrio* en tres de las diez cepas fue corroborada posteriormente por el sistema BIOLOG[®]. Este sistema solo identificó el 60% de las bacterias, lo cual podría ser debido a la densidad bacteriana utilizada ó su composición al momento de inocular los pozos, determinando la producción de color en el medio de cultivo (Gamo y Shoji, 1999). A pesar de que el 40% restante no se identificó a nivel especie, se logró identificarlas como miembros de la familia *Vibrionaceae*. Estos resultados nos indican que las pruebas bioquímicas no son suficientes para confirmar la especie de los microorganismos, por lo que se necesitarán herramientas moleculares para confirmar y completar la identificación bioquímica.

7.2 Evaluación del rotífero *Brachionus plicatilis* como vector de las cepas de los géneros *Vibrio* y *Aeromonas*.

Brachionus plicatilis no solo ha sido utilizado en la acuicultura como primer alimento para una gran variedad de cultivos de peces marinos (Carié *et al.*, 1993; Makridis *et al.*, 2000) y crustáceos (Fernández-Reiriz *et al.*, 1993; Lubzens *et al.*, 1997), sino que en los últimos años ha sido usado como vector para la diseminación de diferentes sustancias, como nutrientes (Watanabe *et al.*, 1983; Dhert *et al.*, 1990), terapéuticos (Dixon *et al.*, 1995), vacunas (Campbell *et al.*, 1993) y probióticos (Gatesoupe, 1994). Con los resultados del presente trabajo se confirmó que los rotíferos actuaron también como vectores de la cepa de *Aeromonas* (Am226) y de *Vibrio* (Vp279). Además, se observó un incremento

(>100%) de la población de manera significativa del rotífero cuando se adicionaron ambas cepas, en comparación con rotíferos alimentados con levadura.

Se ha reportado que éstas bacterias pueden ser una fuente rica de vitaminas para los rotíferos, quienes la aprovecharon para incrementar su densidad poblacional, su reproducción (ya que hubo producción de hasta 2 huevos por hembra) e incluso podría decirse que su tasa de crecimiento. Similares resultados de éste comportamiento de los rotíferos en presencia de ambas especies han sido ampliamente reportados por Yu *et al.*, 1988; Hirayama y Murayama, 1991; Hino, 1993; Fengqi 1996 y Douillet, 2000, quienes además encontraron que otras bacterias son fuente de vitamina B₁₂, la cual es fundamental para el crecimiento de rotíferos.

Por otro lado, aunque las supervivencias de los rotíferos con los tratamientos Vp282 (74%) y V227 (88%) no fueron significativas, lograron mantener su densidad poblacional por arriba del 50%. Efectos positivos sobre la supervivencia de rotíferos e incluso incrementos de las tasas de reproducción han sido ampliamente reportadas (Hagiwara *et al.*, 1994; Gorospe y Nakamura, 1996; Gorospe *et al.*, 1996; Rombaut *et al.*, 1999). Además, la estabilidad que los rotíferos experimentaron en presencia de éstas bacterias, se observó en el mayor (V sp. 303, 8.3×10^3 UFC/rotífero) y menor (Am226, 9×10^2 UFC/rotífero) nivel de bioencapsulación.

Por lo que existe la posibilidad de que las bacterias hayan contribuido como complemento alimenticio para mejorar la supervivencia de *B. plicatilis*, reflejándose en la capacidad de filtración que demostraron, la cual fue superior a 5.1×10^3 bacterias/rotífero en promedio durante las primeras tres horas, reflejándose en una disminución de bacterias/ml en el agua (de 10^8 a 2×10^4 en promedio). Coutteau (1991) y Vadstein *et al.* (1993) reportaron tasas de filtración de $21-63 \times 10^3$ bacterias/rotífero entre 20-60 minutos con *Vibrio* sp. Así mismo, Hirayama y Murayama (1991), sugirieron que *Vibrio* y *Aeromonas* presentan cierta preferencia

por los rotíferos y Yu *et al.*, (1988) y Fengqi (1996) proponen que estas bacterias proveen vitaminas esenciales (como B₁₂) que requieren para su crecimiento.

Por otro lado, la tasa de filtración en el resto del bioensayo (6-24 h) disminuyó entre 2.2×10^3 - 1.7×10^3 . Al respecto, se ha reportado que cepas de *Vibrio* sp. tardan en pasar a través del tubo digestivo entre 20-30 minutos con la misma especie de rotífero (Coutteau, 1991; Vadstein *et al.*, 1993), por lo que se sugiere que el tubo digestivo de *B. plicatilis* se encontraba altamente colonizado con dichas bacterias. Por lo tanto, el rotífero puede actuar como vector de las bacterias probadas.

En el cultivo de rotíferos la vitamina B₁₂ resulta ser un nutriente limitante (Hino, 1993), por lo que este complemento alimenticio pudo haber tenido algún efecto sobre las supervivencias reportadas, ya que 24 h previo al bioensayo los rotíferos fueron alimentados con levadura que es fuente de dicha vitamina. Scott y Baynes (1978), Snell *et al.* (1983), Yu *et al.* (1988) y Rombaut *et al.* (1999) reportaron un incremento de las supervivencias y las tasas de reproducción en el cultivo de *B. plicatilis*.

Finalmente, la actividad de nadar de los rotíferos (que siempre fue activa), la producción y eclosión de huevos (hasta dos por hembra), así como la presencia de mudas en el fondo de las UE son indicios del buen estado fisiológico de los rotíferos, como lo han señalado Snell *et al.* (1987). Esto fue confirmado a través de observaciones visuales durante los bioensayos, donde logramos corroborar la condición fisiológica de los organismos.

7.3 Patogenicidad de cepas de los géneros *Vibrio* y *Aeromonas* sobre eleuteroembriones de *Paralabrax maculatofasciatus*.

La colonización por bacterias patógenas oportunistas (*Vibrio* y *Aeromonas*) parecen jugar un papel importante con respecto a la enfermedad e incremento en la mortalidad de los eleuteroembriones de *P. maculatofasciatus*, para la que se registraron niveles significativos de mortalidad (70% bioensayo 1 y 96% bioensayo 2, en promedio) en todos los tratamientos con respecto a sus controles, sugiriendo que tanto *Vibrio* como *Aeromonas* tuvieron la capacidad de causar daños en la superficie mucosal de los eleuteroembriones.

Si consideramos que los huevos de cabrilla arenera fueron sometidos a un proceso de desinfección y una vez eclosionados, los eleuteroembriones no reciben alimentación exógena (porque no han abierto la boca), ni existe alguna vía de entrada para algún patógeno al organismo (porque aún no tienen abierto el ano), entonces se sugiere que la única vía de infección por la exposición a bacterias es a través de la superficie mucosal de los eleuteroembriones. Por lo tanto, se propone que la secuencia de eventos durante ésta infección por ambos géneros, inicia por la adhesión de células bacterianas al moco, seguido por la proliferación en la superficie mucosal y finalmente, la colonización e invasión de células y tejido del hospedero. Al respecto, Balebona *et al.* (1998) y Chiang *et al.* (1999) señalaron que algunas bacterias patógenas excretan metabolitos que provocan ulceraciones y daños en los tejidos del hospedero y donde la secuencia de la infección también ha sido observada.

En la patología de la vibriosis de la cabrilla arenera en la etapa de eleuteroembrión, se ha documentado que tanto *Vibrio* como *Aeromonas* producen ciertos factores potenciales de virulencia, tales como: hemolisinas (Santos *et al.*, 1999), proteasas (Rao *et al.*, 1998), citotoxinas (Krovacek *et al.*, 1987) y exoenzimas (Hansen y Olafsen, 1989). Otras características como la formación de una película superficial en medio líquido (Balebona *et al.*, 1995), la movilidad

(Freter *et al.*, 1981), la hidrofobicidad (Lee y Yii, 1996), la capacidad de adherirse e invadir células epiteliales de peces (Wang y Leung, 2000) y la captación de hierro (Otto *et al.*, 1992) han sido involucradas en la patogenicidad de estas especies. Algunos de éstos factores están asociados a altas mortalidades en diferentes especies de peces: *Seriola quinqueradiata* (McCarthy, 1976), *Gadus morhua* e *Hippoglossus hippoglossus* (Hansen y Olafsen, 1989), *Scophthalmus maximus* (Olsson *et al.*, 1992), *Sparus aurata* (Balebona *et al.*, 1995) y en *Plecoglossus altivelis* (Kondo *et al.*, 2002), entre otros.

Bajo este contexto, se sugiere que las bacterias probadas en este estudio de los géneros *Vibrio* y *Aeromonas* podrían ser patógenas y poseer algunos de los factores de virulencia y características anteriormente mencionadas hacia eleuteroembriones de *P. maculatofasciatus*. Durante los bioensayos, las descripciones registradas para la mayoría de las UE inoculadas con bacterias, presentaron deformaciones en todo el cuerpo, la superficie de la piel se observó colapsada, así como un cambio de color a rosa intenso y una gran cantidad de bacterias en todo el organismo muerto e incluso moribundo, contrario a los controles donde a pesar de las mortalidades registradas no se observaron estos efectos. Además, hay que considerar que los bioensayos se llevaron a cabo previo a la primera alimentación exógena, la cual ha sido señalada como principal vía de infección hacia el tracto gastrointestinal de larvas de peces marinos (Kusada *et al.*, 1986; Munro *et al.*, 1994), por lo que las posibilidades de que las mortalidades de los eleuteroembriones sean debidas a los efectos de las bacterias más que factores externos retoman mayor importancia.

7.4 Infección experimental de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, usando al rotífero *Brachionus plicatilis* como vector de cepas de los géneros de *Vibrio* y *Aeromonas*.

La mortalidad de las larvas durante los bioensayos 1 y 3, presentaron un comportamiento diferente en los tratamientos a pesar de tratarse de las mismas cepas (7). De las cuales, solo A sp. 302 (47.2 y 20.7%, bioensayo 1) y V sp. 303 (41.2 y 24.8%, bioensayo 3) presentaron diferencias significativas en la mortalidad de las larvas con respecto a sus controles. En el bioensayo 2, se corroboró las mortalidades significativas que se presentaron en el bioensayo 1 con las cepas Vh (30.7%), Am226 (33.3%), Vp282 (42%) y V sp. 303 (42.7%), infiriendo la posible patogenicidad de estas cepas hacia las larvas. Así mismo, las cepas Valg., Vc280, Ai301 y V227 no presentaron mortalidades significativas en el bioensayo 4, mientras que con las cepas Vp282 (54.9%) y V sp. 303 (56.9%) si presentaron mortalidades significativas similares a las registradas en los bioensayos 1 y 2.

Por otro lado, de las doce cepas probadas en el presente trabajo, solo cuatro (Vh, Am226, Vp282 y V sp. 303) fueron evaluadas en los cuatro bioensayos, de éstas, solamente V sp. 303 presentó efectos letales reproducibles sobre las larvas. La cepa Vp282 en los bioensayos 1, 2 y 4, A sp. 302 demostró sus efectos sobre las larvas en tres bioensayos (1, 3 y 4). Así mismo, la cepa Am281 solo en los bioensayos 1 y 4 demostró ser letal. La cepa V228 solo fue letal sobre las larvas en el bioensayo 1.

Es importante considerar que las larvas para los bioensayos 1 y 2 fueron obtenidas de un mismo lote de reproductores, quizás por eso los resultados fueron iguales cuando menos en cuatro cepas. Mientras que para los bioensayos 3 y 4 fueron de un lote distinto, por lo que se pudo haber presentado variación en la resistencia a las bacterias.

No se encontraron reportes previos sobre procesos de infección experimental en larvas de cabrilla arenera, a través de la bioencapsulación de bacterias en el rotífero *B. plicatilis*. A pesar de las inconsistencias de algunos resultados obtenidos en los bioensayos, se observó la importancia de las cepas de los géneros *Vibrio* y *Aeromonas* en la supervivencia de los eleuteroembriones en el sistema de crianza larvaria utilizado. Madsen y Dalsgaard (1999) reportaron que cuando las larvas proceden de diferentes lotes de reproductores, su estado inmune puede variar considerablemente y por lo tanto, el resultado podría no ser siempre el esperado entre los bioensayos.

Colorni *et al.* (1981) y Munro *et al.* (1994) señalaron que el estrés fisiológico y nutricional del hospedero podrían ocasionar que las larvas presenten cierta susceptibilidad o predisposición a ser infectadas por patógenos oportunistas (*Vibrio* y *Aeromonas*); sin embargo, los resultados mostraron diferencias en la mortalidad, lo que sugiere que las larvas no presentaron estrés. La dificultad de reproducir infecciones experimentales ha sido señalada también por Gatesoupe (1991b). Colorni *et al.* (1981) reportaron una disminución del grado de virulencia de algunas bacterias de manera significativa cuando se mantienen en condiciones artificiales de laboratorio.

Pocos son los trabajos para comparar los resultados obtenidos; sin embargo, podrían ayudarnos a contrastar la patogenicidad de *Vibrio* y *Aeromonas* sobre peces marinos e incluso en otras especies marinas. Bergh *et al.* (1992) reportaron mortalidades acumuladas entre el 67-95% cuando larvas de *Hippoglossus hippoglossus* se expusieron en baños con cepas de *Vibrio*, 37 días después de la crianza. Estas mortalidades fueron similares a las obtenidas en larvas de cabrilla arenera en el bioensayo 4, con las cepas *A* sp. 302 (69%) y *Am281* (87%) después de 48 h.

Nordmon *et al.* (1997), reportaron mortalidades acumuladas del 70% en adultos de *Salmo salar* después de tres semanas de exposición en baños con *Vibrio*

salmonicida. El bioensayo 4 presentó mortalidades similares con las cepas Vp282 (55%), V sp. 303 (57%), A sp. 302 (69%) y Am2281 (87%) después de 48 h de exposición.

Bruno *et al.* (1998) reportaron mortalidades del 46% en adultos de *Salmo salar*, 16 días después de haber sido inyectados intraperitonealmente con *Vibrio viscosus*. En el presente trabajo, 48 h después de la infección se reportaron mortalidades promedio del 38-48% (bioensayo 1), del 29-54% (bioensayo 2) y del 8-87% (bioensayo 4) con todas las cepas.

La virulencia del género *Vibrio* ha sido ampliamente reportada para un gran número de especies marinas, como *Scophthalmus maximus* (Grisez *et al.*, 1996), *Sparus aurata* (Pujalte *et al.*, 2003), *Pinctada maxima* (Pass *et al.*, 1987), *Haliotis rufescens* (Anguiano-Beltrán, 1998), *Argopecten ventricosus* (= *circularis*) (Sainz *et al.*, 1998), *Penaeus monodon* (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990; Prayitno y Latchford, 1995), *Penaeus japonicus* (Liu *et al.*, 1996), *Penaeus vannamei* (Robertson *et al.*, 1998) y *Artemia* sp. (Verschuere *et al.*, 2000), entre otras.

7.5 Factores potenciales de virulencia de *Vibrio* y *Aeromonas*.

7.5.1 Adhesión a la superficie mucosal de los eleuteroembriones de *Paralabrax maculatofasciatus*.

La superficie mucosal en los peces protege a las células epiteliales de la colonización bacteriana (Beachey, 1981). En los últimos años se ha demostrado que la adhesión bacteriana a la superficie mucosal de los peces es el paso inicial para muchas infecciones bacterianas (Thune *et al.*, 1993; Balebona *et al.*, 1995; Nikoskelainen *et al.*, 2001). Sin embargo, la importancia de la adhesión bacteriana en la superficie de eleuteroembriones de la cabrilla arenera no ha sido ampliamente estudiada. Los resultados del presente trabajo, demostraron que todas las cepas de estudio (*Vibrio* y *Aeromonas*) tuvieron la capacidad de

adherirse al moco superficial de los eleuteroembriones, lo cual pudo estar relacionado con las altas mortalidades (70-96%). Esta capacidad quizás se deba a que poseen estructuras específicas (flagelo), las cuales encontraron sitios de reconocimiento en la superficie mucosal. Al respecto, Krovacek *et al.* (1987) reportaron que las interacciones entre superficies celulares de *Vibrio* y *Aeromonas* con mucosas o células epiteliales se dan procesos específicos, donde intervienen estructuras llamadas adhesinas (pili y flagelo) en las células bacterianas y receptores en la superficie mucosal de *Oncorhynchus mykiss*. Montgomery y Kirchman (1994) y Bordas *et al.* (1996) señalaron que la capacidad adhesiva en cepas de *Vibrio* a superficies mucosas es un factor de virulencia esencial que da inicio a la colonización del hospedero y como consecuencia origina una infección bacteriana, donde podrían estar involucradas diferentes adhesinas (Hacker, 1992; Hoepelman y Tuomanen, 1992).

El mayor componente de superficies mucosas en peces son glicoproteínas, las cuales son responsables de las características fisicoquímicas propias de las superficies mucosas (Balebona *et al.*, 1995). Diversos factores como la temperatura, la salinidad y el pH podrían favorecer o afectar los procesos de adhesión de bacterias patógenas en dichas superficies (Bordas *et al.*, 1996). En el presente trabajo, los valores de temperatura y salinidad fueron de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 35 ppm con un valor de pH de 6.8. Estos valores concuerdan con lo reportado por Bordas *et al.* (1996) y Nikoskelainen *et al.* (2001), quienes reportaron adhesión entre $15\text{-}22^{\circ}\text{C}$ y 17-35 ppm, con bacterias del género *Vibrio* y *Aeromonas* en *Sparus aurata* y *Oncorhynchus mykiss*. Amaro *et al.* (1995) con *Vibrio vulnificus* biotipo 2 registraron valores de adhesión a una temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y una salinidad de 15 ppm en *Anguilla japonica*. Así mismo, Balebona *et al.* (1995) reportaron adhesión con un rango de pH de 8.2-8.5 para varias especies de *Vibrio* en *Sparus aurata*.

7.5.2 Hidrofobicidad de las células de *Vibrio* y *Aeromonas* por el método de SAT.

La hidrofobicidad no solo ha sido considerada como un factor importante de virulencia, sino como un parámetro para medir el potencial de adhesión no específica de bacterias patógenas oportunistas (Fletcher y Loeb, 1979; Absolom *et al.*, 1983; Busscher *et al.*, 1984; Fletcher y Pringle, 1985; Daly y Stevenson, 1987; Van Loosdrecht *et al.*, 1987; Lee y Yii, 1996). No solamente las características superficiales y la actividad de las células microbianas pueden influir en los procesos de adhesión, la carga y textura superficial, las corrientes, el continuo reemplazo de moco, la variabilidad en la composición iónica de la formación de una película microbiana (debido a la composición fisicoquímica del agua) y la descomposición de diversos microorganismos, pueden también influir fuertemente en los procesos de adhesión bacteriana (Stenström, 1989).

Los resultados de hidrofobicidad y la formación de una película superficial de las cepas *Am226* y *V227* fueron negativos. Sin embargo, mostraron consistencia en la capacidad de adhesión, registrando mortalidades significativas tanto en los eleuteroembriones como en las larvas, lo que sugiere que otros mecanismos de adhesión están presentes en estas cepas. Al respecto, Santos *et al.* (1991) reportaron no haber encontrado esta relación, e incluso ni con la virulencia en bacterias patógenas de peces.

Nueve de las cepas que mostraron hidrofobicidad, coincidieron con lo reportado por Lee y Yii (1996); excepto *Vibrio harveyi* que no mostró hidrofobicidad, sugiriendo que las condiciones de la cepa no fueron las óptimas (temperatura o medio de cultivo) para manifestar su condición hidrofóbica. Al respecto, se sabe que bajo condiciones óptimas de crecimiento, las bacterias producen adhesinas e incrementan su hidrofobicidad (Faris *et al.*, 1982; Fattom y Shilo, 1984; Balebona *et al.*, 1995).

Los cambios en la superficie mucosal de los eleuteroembriones pueden ser tan complejos como la de las células bacterianas, por lo que su unión está en función

de la interacción de estos cambios superficiales (Dickson y Koohmaraie, 1989). Ocho cepas que mostraron ser hidrofóbicas y formar una película superficial, podrían considerarse patógenas oportunistas, ya que además presentaron altas tasas de adhesión y ocasionaron mortalidades significativas tanto en los eleuteroembriones como en las larvas.

7.5.3 Producción de exoenzimas y hemolisinas por bacterias de los géneros de *Vibrio* y *Aeromonas*.

Numerosos factores de virulencia han sido descritos para explicar la patogenicidad de bacterias oportunistas, la virulencia esta en función de la capacidad que tengan las bacterias para adherirse, sobrevivir, proliferar e invadir células epiteliales del hospedero. Sin embargo, otros factores como la actividad exoenzimática y hemolítica, también han sido consideradas factores potenciales de virulencia de algunas bacterias para varias especies de peces (Fouz *et al.*, 1993; Gatesoupe *et al.*, 1997; Balebona *et al.*, 1998).

En el presente trabajo, los resultados mostraron que las cepas *Vp282* y *Ai301* producen exoenzimas y toxinas hemolíticas en seis de las pruebas realizadas, confirmando que dichas cepas podrían poseer cierto grado de virulencia, reflejado también por las altas mortalidades tanto en eleuteroembriones como en larvas, además de demostrar efectos positivos en la hidrofobicidad, la adhesión y la formación de la película en medio BHI, los cuales han sido considerados factores de virulencia (Balebona *et al.*, 1995; Lee y Yii, 1996).

Diez de las doce cepas demostraron capacidad de producir amilasas y las doce cepas fueron positivas en la producción de lipasas con el reactivo Tween80, mientras que yema de huevo como sustrato, solo tres cepas (*Am226*, *Am281* y *V227*). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Alcaide *et al.* (1999), quienes observaron la producción de éstas enzimas en eritrocitos de *Aphanius iberus*, *Anguilla anguilla* y *Seriola dumerili* con *Vibrio parahaemolyticus* y

Gatesoupe *et al.* (1997) con eritrocitos de *Dicentrarchus labrax* utilizando *Vibrio splendidus*.

La excreción de caseinasas por cepas de *Vibrio* y *Aeromonas*, juegan un papel importante en la invasión y establecimiento de una infección (Rao *et al.*, 1998). En el presente trabajo, tres cepas de *Vibrio* (*Vc280*, *Vp282*, *V sp. 303*) y dos de *Aeromonas* (*Am281*, *Ai301*) demostraron la capacidad de producir caseinasas extracelulares y las cepas *Vp279*, *Vp282*, *Ai301*, *A sp. 302* y *V228* fueron productoras de galatinasas, lo que les confiere capacidades potenciales de virulencia, como lo reportaron Tsai *et al.* (1986), Santos *et al.* (1987), Fouz *et al.* (1993) y Biosca y Amaro (1996), quienes además encontraron altos niveles de actividad proteolítica con caseinasas y gelatinasas en géneros de *Vibrio* y *Aeromonas*.

Las hemolisinas son sustancias que provocan la disolución o lisis de los hematíes, las cuales puede manifestarse cuando las bacterias se cultivan en placas de agar sangre. La hemólisis puede ser observada sobre las hemolisinas solubles o filtrables, así como, otras sustancias hemolíticas (Freeman, 1989). En este sentido, los resultados demostraron que las cepas *Vh*, *Valg.*, *Am281*, *Vp279*, *Vp282*, *Vc280*, *Ai301*, *A sp. 302* y *V228* presentaron actividad hemolítica con sangre de carnero, mientras que con sangre de cabrilla solamente *Vh*, *Vp282* y *Ai301* presentaron dicha actividad. Estos nos permite inferir que estas cepas podrían ser patógenas y poseer factores que las caractericen como altamente virulentas hacia los eleuteroembriones y larvas, los cuales presentaron altas mortalidades. Estos resultados se ven reforzados por Wong *et al.* (1998), quienes señalaron que cepas del género *Aeromonas* y *Vibrio* son capaces de producir toxinas hemolíticas con alto grado de virulencia, e incluso se ha sugerido una estrecha relación entre la producción de hemolisinas y la enterotoxigenicidad de *Aeromonas hydrophila* en peces (Rahim *et al.*, 1984; Stelma *et al.*, 1986). Por su parte, Fouz *et al.* (1993), observaron marcada actividad hemolítica con *Vibrio damsela* utilizando sangre de *Scopthalmus maximus*.

Una razón por la cual nueve cepas no presentaron actividad hemolítica con sangre de cabrilla, quizás sea porque fueron expuestas al calor (120°C por 15 minutos) y sean termolabiles, es decir, que se alteran algunas propiedades de sus productos extracelulares; a pesar de ello, solo tres cepas lograron demostrar su virulencia produciendo toxinas hemolíticas. Estos efectos fueron señalados por Fouz *et al.* (1993), quienes demostraron con *Vibrio damsela* sobre eritrocitos de *Scophthalmus maximus* y de carnero, que al ser tratados con calor la cepa no manifestó efectos de virulencia, mientras que cuando no fueron sometidos a calor se clasificó como altamente virulenta. A pesar de que se demostraron los efectos letales de nuestras bacterias, no podríamos saber si la producción de compuestos extracelulares está asociado con su contenido lipopolisacárido, el cual, podría conferir una estabilidad al calor en las toxinas e incrementar su toxicidad en cultivos de peces marinos, como lo menciona Fouz *et al.* (1993).

8 CONCLUSIONES

Los rotíferos fueron una vía de infección hacia las larvas de cabrilla arenera, ya que lograron sobrevivir e incrementar su supervivencia durante la infección con *Vibrio* y *Aeromonas*; así mismo, obtuvieron la máxima tasa de filtración (superior a 5000 UFC/rotífero) durante las primeras tres horas y las cepas de *Vibrio harveyi*, *Vibrio proteolyticus* 282 y *Vibrio* sp. 303 presentaron la mayor bioencapsulación durante las 24 h de exposición.

Se demostró que todas las cepas de estudio fueron patógenas hacia los eleuteroembriones de cabrilla arenera, ya que durante las infecciones experimentales causaron mortalidades significativas (70-96%). Observándose que tanto *Vibrio* como *Aeromonas* fueron igualmente letales con dosis de 1×10^8 UFC/ml en 48 h de exposición.

En la infección experimental con larvas de cabrilla arenera se logró demostrar la patogenicidad de las cepas *Vibrio proteolyticus* 282 (48, 42 y 55%), *Vibrio* sp. 303 (43, 25 y 57%) y *Aeromonas* sp. 302 (47, 21 y 69%) en tres de los cuatro bioensayos. Las cepas *Vibrio harveyi*, *Aeromonas media* 226, *Aeromonas media* 281 y *Aeromonas ichthiosmia* 301 demostraron sus efectos patógenos por lo menos en dos de los bioensayos, debido a la difícil reproducibilidad de los mismos.

Las doce cepas presentaron factores potenciales de virulencia, mostrando de esta manera la capacidad de adherirse a la superficie mucosal de los eleuteroembriones. Éstas también demostraron la capacidad de producir exoenzimas (amilasas 83%, gelatinasas 58% y lipasas con Tween 80 100%) y hemolisinas (sangre de carnero 75%). Finalmente, nueve de las doce cepas demostraron capacidad hidrofóbica y formación de una película en medio BHI.

9 RECOMENDACIONES

Las cepas bacterianas utilizadas en la infección experimental, fueron causantes de mortalidades en larvas de cabrilla arenera; sin embargo, la orientación del presente trabajo no tuvo como propósito determinar los factores que influyen directa o indirectamente en los experimentos. Por tal motivo, se sugiere que por la naturaleza misma de los bioensayos, la elección de métodos y/o pruebas utilizadas es necesario tomar en cuenta factores como: procedencia del material vivo (estado de los progenitores), calidad del agua y del alimento, temperatura y salinidad, entre otros, los cuales pueden influir sobre los resultados.

Dada la importancia que representa el cultivo de especies comerciales, es indispensable desarrollar y estandarizar métodos y técnicas de prevención y diagnóstico para uso en acuicultura, así como, estrategias alternativas para controlar las densidades o poblaciones microbianas en los cultivos de peces marinos, especialmente en las primeras etapas de vida de los organismos, con la finalidad de optimizar el recurso.

Un requisito para el desarrollo de estrategias de control microbiano, es el conocimiento de los aspectos cuantitativos como cualitativos de la microflora en el agua, la asociada a las larvas y la interacción entre ambas. Además es fundamental contar con equipo y material suficiente para desarrollar bajo las mejores condiciones los bioensayos.

10 LITERATURA CITADA

Absolom, D. R.; Lamberti, F. V.; Policova, Z.; Zingg, W.; van Oss, C. J. & Neumann, A. W. 1983. Surface thermodynamics of bacterial adhesion. ***Applied and Environmental Microbiology***, 46:90-97.

Adams, D.; Atkinson, H. M. & Woods, W. H. 1983. The differing effects of proteases on the adhesins of *Aeromonas hydrophila*. ***FEMS Microbiology Letters***, 20:197-200.

Alcaide, E.; Amaro, C.; Todolí, R. & Oltra, R. 1999. Isolation and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* causing infection in Iberian toothcarp *Aphanius iberus*. ***Diseases of Aquatic organisms***, 35:77-80.

Alvarez-González, C. A. 1999. Optimización del proceso de producción de semilla de la cabrilla arnera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae) en sistemas de circulación cerrada. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S., México.

Alvarez-González, C. A.; Civera-Cerecedo, R.; Ortiz-Galindo, J. L.; Dumas, S.; Moreno-Legorreta, M. & Grayeb-Del Alamo, T. 2001. Effect of dietary protein level on growth and body composition of juvenile spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*, fed practical diets. ***Aquaculture***, 194:151-159.

Amaro, C.; Biosca, E. G.; Fouz, B.; Alcaide, E. & Esteve, C. 1995. Evidence that water transmits *Vibrio vulnificus* biotype 2 infections to eels. ***Applied and Environmental Microbiology***, 61:1133-1137.

Anguas-Vélez, B. H.; Civera-Cerecedo, R.; Contreras-Olguín, M.; Rueda-Jasso, R. A. & Guillaume, J. 2000. Preliminary study on the timing of weaning of spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*, larvae with a prepared diet: effects on growth and survival. ***Journal of Applied Aquaculture***, 10:1-15.

Anguiano-Beltrán, C.; Searcy-Bernal, R. & Lizárraga-Partida, M. L. 1998. Pathogenic effects of *Vibrio alginolyticus* on larvae and postlarvae of the red abalone *Haliotis rufescens*. ***Diseases of Aquatic Organisms***, 33:119-122.

Atlas, R. M. 1990. **Microbiología: fundamentos y aplicaciones**. Continental, S.A. de C.V. México. 887 pp.

Atlas, R. M. & Bartha, R. 1993. **Microbial ecology; fundamentals and applications**. Third edition, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., United States of America. 563 pp.

Austin, B. & Austin, D. A. 1993. **Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish**. 2nd ed. Ellis Horwood, New York. 879 pp.

Avilés-Quevedo, A. & Mazón-Suástegui, J. M. 1996. Cultivo de peces marinos. *En: Casas, M. V. and Ponce, G. D. (Eds.). Estudio del Potencial Pesquero y Acuicola de Baja California Sur*. Vol. II. SEMARNAP, Gobierno del Estado de B.C.S. FAO. INP. UABCS. CIB. CICIMAR. CET del MAR. La Paz, B.C.S., México. 651-684 pp.

Balebona, M. C.; Andreu, M. J.; Bordas, M. A.; Zorrilla, I.; Moriñigo, M. A. & Borrego, J. J. 1998. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 64:4269-4275.

Balebona, M. C.; Moriñigo, M. A.; Faris, A.; Krovacek, K.; Mansson, I.; Bordas, M. A. & Borrego, J. J. 1995. Influence of salinity and pH on the adhesion of pathogenic *Vibrio* strains to *Sparus aurata* skin mucus. *Aquaculture*, 132:113-120.

Balon, E. K. 1984. Reflections on some decisive events in the early life of fishes. *Transaction of the American Fisheries Society*, 113:178-185.

Beachey, E. H. 1981. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *The Journal of Infectious Diseases*, 143:325-345.

Ben-Naim, A. 1976. Hydrophobic interaction. *Colloquies International Center National Recherche Scientific*, 246:215-221.

Bergh, O.; Hansen, G. H. & Taxt, R. E. 1992. Experimental infection of eggs and yolk sac larvae of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. *Journal of Fish Diseases*, 15:379-391.

Biosca, E. G. & Amaro, C. 1996. Toxic and enzymatic activities of *Vibrio vulnificus* biotype 2 with respect to host specificity. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:2331-2337.

Blanch, A. R.; Alsina, M.; Simón, M. & Jofre, J. 1997. Determination of bacteria associated with reared turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. *Journal of Applied Microbiology*, 82:729-734.

Bordas, M. A.; Balebona, M. C.; Zorrilla, I.; Borrego, J. J. & Moriñigo, M. A. 1996. Kinetics of adhesion of selected fish-pathogenic *Vibrio* strains to skin mucus of gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 62:3650-3654.

Brock, T. D. & Brock, K. M. 1978. **Basic microbiology with applications**. Second edition. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 608 pp.

Bruno, D. W.; Hastings, T. S. & Ellis, A. E. 1986. Histopathology, bacteriology and experimental transmission of cold-water vibriosis in Atlantic salmon, *Salmo salar*. ***Diseases of Aquatic Organisms***, 1:163-168.

Bruno, D. W.; Griffiths, J.; Petrie, J. & Hastings, T. S. 1998. *Vibrio viscosus* in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in Scotland: field and experimental observations. ***Diseases of Aquatic Organisms***, 34:161-166.

Busscher, H. J.; Weerkamp, A. H.; van der Mei, H. C.; van Pelt, A. W. J.; de Jong, H. P. & Arends J. 1984. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. ***Applied and Environmental Microbiology***, 48:980-983.

Campbell, R.; Adams, A.; Tatner, M. F.; Chair, M. & Sorgeloos, P. 1993. Uptake of *Vibrio anguillarum* vaccine by *Artemia salina* as a potential oral delivery system to fish fry. ***Fish Shellfish Immunology***, 3:451-459.

Carié, M.; Sanko-Njire & Skaramuca, B. 1993. Dietary effects of different feeds on the biochemical composition of the rotifer (*Brachionus plicatilis* Müller). ***Aquaculture***, 110:141-150.

Colorni, A.; Paperna, I. & Gorgin, H. 1981. Bacterial infections in gilthead sea bream *Sparus aurata* cultured at Elat. ***Aquaculture***, 23:257-260.

Coutteau, P. 1991. Baker's yeast as substitute for micro-algae in the culture of filter-feeding organisms. PhD Thesis Univ. Ghent. 178-181 pp.

Chiang, S. L.; Mekalanos, J. J. & Holden, D. W. 1999. *In vivo* genetic analysis of bacterial virulence. ***Annual Review Microbiology***, 53:129-154.

Dahlback, B.; Hetmansson, M.; Kjelleberg, S. & Norkrans, B. 1981. The hydrophobicity of bacteria –an important factor in their initial adhesion at the air-water interface. ***Archivie of Microbiology***, 128:267-270.

Daly, J. G. & Stevenson, R. M. W. 1987. Hydrophobic and haemagglutinating properties of *Renibacterium salmoninarum*. ***Journal of General Microbiology***, 133:3575-3580.

Dawson, P. M.; Humphrey, B. A. & Marshall, K. C. 1981. Adhesion: a tactic in the survival strategy of marine *Vibrio* during starvation. ***Current Microbiology***, 6:195-199.

Dhert, P.; Lavens, P.; Duray, M. & Sorgeloos, P. 1990. Improved larval survival at matamorphosis of Asian seabass (*Lates calcarifer*) using omega 3-HUFA-enriched live food. ***Aquaculture***, 90:63-74.

Dickson, J. S. & Koochmaraie, M. 1989. Cell surfaces charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. ***Applied and Environmental Microbiology***, 55:832-836.

Dixon, B. A.; Van Poucke, S. O.; Chair, M.; Demasque, M.; Nelis, H. J.; Sorgeloos, P. & De Leenheer, A. P. 1995. Bioencapsulation of the antibacterial drug sarafloxacin in nauplii of the brine shrimp *Artemia franciscana*. ***Journal of Aquatic Animal Health***, 7:42-45.

Doulliet, P. A. 2000. Bacterial additives that consistently enhance rotifer growth under synxenic culture conditions. 1. Evaluation of commercial products and pure isolates. ***Aquaculture***, 182:249-260.

Elston, R. A. 1984. Prevention and management of infectious diseases in intensive mollusc husbandry. ***Journal of the World Mariculture Society***, 15:284-300.

Evelyn, T. P. T. 1996. Infection and disease. *In*: Iwama, G. and Nakanishi, T. (Ed.). **The fish immune system. Organism, pathogen and environment**. Vol. 15, Academic Press, San Diego California. 380 pp.

Falkow, S. 1990. The "Zen" of bacterial pathogenicity. *In* Iglewski, B. H. and Clark, V. L. (Ed.). **Molecular basis of bacterial pathogenesis**. Academic Press, San Diego, California. 3-8 pp.

Faris, A.; Lindahl, M. & Wadström, T. 1982. High surface hydrophobicity of hemagglutinating *Vibrio cholerae* and other Vibrios. ***Current Microbiology***, 7:357-362.

Fattom, A. & Shilo, M. 1984. Hydrophobicity as an adhesion mechanism of benthic cyanobacteria. ***Applied and Environmental Microbiology***, 47:135-143.

Fengqi, L. 1996. Production and application of rotifers in aquaculture. ***Aquaculture Magazine***, 22(3):16-22.

Fernández-Reiriz, M. J.; Labarta, U. & Ferreiro, M. J. 1993. Effects of commercial enrichment diets on the nutritional value of the rotifer (*Brachionus plicatilis*). ***Aquaculture***, 112:195-206.

Ferry, L. A.; Clark, S. L. & Cailliet, G. M. 1997. Food habits of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*, Serranidae) from bahia de Los Angeles, Baja California. ***Bulletin Souther California Academic Scientific***, 96:1-21.

Fletcher, M. & Loeb, G. I. 1979. Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. ***Applied and Environmental Microbiology***, 37:67-72.

Fletcher, M. & Pringle, J. H. 1985. The effect of surface free energy and medium surface tension on bacterial attachment to solid substrates. ***Journal Colloid Interface Science***, 104:5-13.

Freeman, B. A. 1989. **Microbiología de Burrows**. 22^a ed. Interamericana S.A. de C.V. México, D.F. 1181 pp.

Freter, R.; Allweiss, B.; O'Brien, P. C. M.; Halstead, S. A. & Macsai, M. S. 1981. Role of chemotaxis in the association of motile bacteria with intestinal mucosa: *In Vitro* studies. ***Infection and Immunity***, 34:241-249.

Fouz, B.; Barja, J. L.; Amaro, C.; Rivas, C. & Toranzo, A. E. 1993. Toxicity of the extracellular products of *Vibrio damsela* isolated from diseased fish. ***Current Microbiology***, 27:341-347.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. ***Journal of Applied Bacteriology***, 66:365-378.

Gamo, M. & Shoji, T. 1999. A method of profiling microbial communities based on a most-probable-number assay that uses BIOLOG plates and multiple sole carbon sources. ***Applied and Environmental Microbiology***, 65:4419-4424.

Gatesoupe, F. J. 1990. The continuous feeding of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, and control of the bacterial environment of rotifers. ***Aquaculture***, 89:139-148.

Gatesoupe, F. J. 1991a. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. ***Aquaculture***, 96:335-342.

Gatesoupe, F. J. 1991b. Experimental infection of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), larvae with a strain of *Aeromonas hydrophila*. ***Journal of Fish Diseases***, 14:495-498.

Gatesoupe, F. J. 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic vibrio. ***Aquatic Living Resource***, 7:277-282.

Gatesoupe, F. J.; Zambonino, J. L. I.; Cahu, C. & Quazuguel, P. 1997. Early weaning of seabass larvae, *Dicentrarchus labrax*: the effect on microbiota, with particular attention to iron supply and exoenzymes. ***Aquaculture***, 158:117-127.

Gjedrem, T. & Gjoen, H. M. 1995. Genetic variation in susceptibility of Atlantic salmon, *Salmon salar* L., to furunculosis, BKD and cold water vibriosis. ***Aquaculture Research***, 26:129-134.

Gorospe, J. & Nakamura, K. 1996. Associated bacterial microflora in *Artemia* –rice bran culture. **Journal Aquatic** –Bamidgeh, 48:99-107.

Gorospe, J. N.; Nakamura, K.; Abe, M. & Higashi, S. 1996. Nutritional contribution of *Pseudomonas* sp. in *Artemia* culture. **Fisheries Science**, 62:914-918.

Grisez, L.; Chair, M.; Sorgeloos, P. & Ollevier, F. 1996. Mode of infection and spread of *Vibrio anguillarum* in turbot *Scophthalmus maximus* larvae after oral challenge through live feed. **Diseases of Aquatic Organisms**, 26:181-187.

Hacker, J. 1992. Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections. **Canadian Journal of Microbiology**, 38:720-727.

Hagiwara, A.; Hamada, K.; Hori, S. & Hirayama, K. 1994. Increased sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifera) with the addition of bacteria and rotifers extracts. **Journal of Experimental Marine Biology Ecology**, 181:1-8.

Hansen, G. H. & Olafsen, J. A. 1989. Bacterial colonization of cod (*Gadus morhua* L.) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs in marine aquaculture. **Applied and Environmental Microbiology**, 55 (6):1435-1446.

Hermansson, M.; Kjellerberg, S.; Korhonen, T. K. & Strenstrom, T. A. 1982. Hydrophobic and electrostatic characterization of surface structures of bacteria and its relationship to adhesion to an air-water interface. **Archivie of Microbiology**, 131:308-312.

Hino, A. 1993. Present culture systems of the rotifer (*Brachionus plicatilis*) and the function of micro-organisms. **TML Conference Proceedings**, 3:51-59.

Hirayama, K. & Murayama, I. 1991. Vitamin B₁₂ content as a limiting factor for mass production of the rotifers *Brachionus plicatilis*. In: Lavens, P.; Sorgeloos, P.; Jasper, E. and Ollevier, F. (Eds.). **Larvi'91. Fish & Crustacean Larviculture Symposium**. Gent, Belgium. European Aquaculture Society, Special Publication No. 15:101.

Hjeltnes, B.; Andersen, K.; Ellingsen, H. M. & Egidius, E. 1987. Experimental studies on the pathogenicity of a *Vibrio* sp. isolated from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., suffering from Hitra disease. **Journal of Fish Diseases**, 10:21-27.

Hoepelman, A. I. M. & Tuomanen, E. I. 1992. Consequences of microbial attachment: directing host cell functions with adhesins. **Infection and Immunity**, 60:1729-1733.

Hooper, L. V.; Bry, L.; Falk, P. G. & Gordon, J. I. 1998. Host-microbial symbiosis in the mammalian intestine: exploring an internal ecosystem. **BioEssays**, 20:336-343.

Iwata, K.; Yanara, Y. & Ishibashi, O. 1978. Studies on factors relating to mortality of young red sea bream (*Pagrus major*) in the artificial seed production. ***Fish Pathology***, 13:97-107.

Kondo, M.; Kawai, K.; Kurohara, K. & Oshima, S. 2002. Adherence of *Flavobacterium psychrophilum* on the body surface of the ayu *Plecoglossus altivelis*. ***Microbes and Infection***, 4:279-283.

Krovacek, K.; Faris, A.; Ahne, W. & Månsson, I. 1987. Adhesion of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio anguillarum* to fish cells and to mucus-coated glass slides. ***FEMS Microbiology Letters***, 42:85-89.

Kusada, R.; Yokoyama, J. & Kawai, K. 1986. Bacteriological study on cause of mass mortalities in cultured black sea bream fry. ***Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries***, 52:1745-1751.

Lavilla-Pitogo, C. R.; Baticados, M. C. L.; Cruz-Lacierda, E. R. & de la Peña, L. D. 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. ***Aquaculture***, 91:1-13.

Lee, K. K. & Yui, K. C. 1996. A comparison of three methods for assaying hydrophobicity of pathogenic vibrios. ***Letters in Applied Microbiology***, 23:343-346.

Lillehaug, A.; Sorum, H. & Ramstad, A. 1990. Cross-protection after immunization of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., against different strains of *Vibrio salmonicida*. ***Journal of Fish Diseases***, 13:519-523.

Lindahl, M.; Faris, A.; Wadström, T. & Hjertén, S. 1981. A new test based on 'Salting out' to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells. ***Biochimica et Biophysica Acta***, 677:471-476.

Liu, P. C.; Lee, K. K. & Chen, S. N. 1996. Pathogenicity of different isolated of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. ***Letters in Applied Microbiology***, 22:413-416.

López-Cortés, L.; Luque, A.; Martínez-Manzanares, E.; Castro, D. & Borrego, J. J. 1999. Adhesion of *Vibrio tapetis* to clam cells. ***Journal of Shellfish Research***, 18(1):91-97.

Lubzens, E.; Minkoff, G.; Barr, Y. & Zmora, O. 1997. Mariculture in Israel –past achievements and future directions in raising rotifers as food for marine fish larvae. ***Hydrobiologia***, 358:13-20.

Madsen, L. & Dalsgaard, I. 1999. Reproducible methods for experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. ***Diseases of Aquatic Organisms***, 36:169-176.

Magnusson, K. E.; Davies, J.; Grudstrom, T.; Kihltrom, E. & Normak, S. 1980. Surface charge and hydrophobicity of *Salmonella*, *E.coli* and *Gonococci* in relation to their tendency to associate with animal cells. **Scandinavian Journal of Infectious Disease**, 24(suppl.):130-140.

Makridis, P.; Fjellheim, A. J.; Skjermo, J. & Vadstein, O. 2000. Control of the bacterial flora of *Brachionus plicatilis* and *Artemia franciscana* by incubation in bacterial suspensions. **Aquaculture**, 185:207-218.

Masamura, K.; Yasunobu, H.; Okada, N. & Muroga, K. 1989. Isolation of a *Vibrio* species, the causative bacterium of intestinal necrosis of Japanese flounder larvae. **Fish Pathology**, 24:135-141.

Matz, C. & Jürgens, K. 2001. Effects of hydrophobic and electrostatic cell surface properties of bacteria on feeding rates of heterotrophic nanoflagellates. **Applied and Environmental Microbiology**, 67:814-820.

McCarthy, D. H. 1976. *Vibrio* diseases in eels. **Journal of Fish Biology**, 8:317-320.

Mitruka, B. M. & Bonner, M. J. 1976. **Methods of detection and identification of bacteria**. CRS Press, Inc. Cleveland, Ohio. 256 pp.

Montgomery, M. T. & Kirchman, D. L. 1994. Induction of chitin-binding proteins during the specific attachment of the marine bacterium *Vibrio harveyi* to chitin. **Applied and Environmental Microbiology**, 60:4284-4288.

Munro, A. L. S. 1982. The pathogenesis of bacterial diseases of fishes. In: Roberts, R. J. (Ed.). **Microbial diseases of fish**. Society for General Microbiology. Academic Press, London. 131-187 pp.

Munro, P.; Barbour, A. & Birkbeck, T. H. 1994. Comparison of the gut bacterial flora of start-feeding larval turbot under different conditions. **Journal of Applied Bacteriology**, 77:560-566.

Muroga, K.; Higashi, M. & Keitoku, H. 1987. The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*) at larval and juvenile stages. **Aquaculture**, 65:79-88.

Muroga, K.; Yasunobu, H.; Okada, N. & Masamura, K. 1990. Bacterial enteritis of cultured flounder *Paralichthys olivaceus* larvae. **Diseases of Aquatic Organisms**, 9:121-125.

Nicolas, J. L.; Robic, E. & Ansquer, D. 1989. Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: influence of bacteria on larval survival. **Aquaculture**, 83:237-248.

Nikoskelainen, S.; Salminen, S.; Bylund, G. & Ouwehand, A. C. 2001. Characterization of the properties of human- and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. ***Applied and Environmental Microbiology***, 67:2430-2435.

Nordmon, R.; Sevattal, S. & Ramstad, A. 1997. Experimental infection with *Vibrio salmonicida* in Atlantic salmon (*Salmon salar* L.): an evaluation of three different challenge methods. ***Aquaculture***, 158:23-32.

Olsson, J. C.; Westerdahl, A.; Conway, P. L. & Kjelleberg, S. 1992. Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*)- and dab (*Limanda lamanda*)- associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. ***Applied and Environmental Microbiology***, 58:551-556.

Otto, B. R.; Vught, A. M. J. J. V. & MacLaren, D. M. 1992. Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. ***Critical Reviews in Microbiology***, 18:217-233.

Pass, D. A.; Dybdahl, R. & Mannion, M. M. 1987. Investigations into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in Western Australia. ***Aquaculture***, 65:149-169.

Peña-Martínez, R. 2000. Histología e histoquímica del desarrollo ontogenético del tubo digestivo de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) (Percoidei: Serranidae). Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S., México, 113 pp.

Prayitno, S. B. & Latchford, J. W. 1995. Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. ***Aquaculture***, 132:105-112.

Prescott, L. M.; Harley, J. P. & Klein, D. A. 1993. ***Microbiology***. 2^a edition, Wm. C. Brown Publisher. Dubuque, I. A. 912 pp.

Pujalte, M. J.; Sitjà-Bobadilla, A.; Alvarez-Pellitero, P. & Garay, E. 2003. Carriage of potentially fish-pathogenic bacteria in *Sparus aurata* cultured in Mediterranean fish farms. ***Diseases of Aquatic Organisms***, 54:119-126.

Rahim, Z.; Sanyal, S. C.; Aziz, K. M.; Huq, M. I. & Chowdhury, A. A. 1984. Isolation of enterotoxigenic, hemolytic and antibiotic-resistant *Aeromonas hydrophila* strains from infected fish in Bangladesh. ***Applied and Environmental Microbiology***, 48:865-867.

Rao, M. B.; Tanksale, A. M.; Ghatge, M. S. & Deshpande, V. V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. ***Microbiology and Molecular Biology Reviews***, 62:597-635.

Robertson, P. A. W.; Calderon, J.; Carrera, L.; Stark, J. R.; Zherdmant, M. & Austin, B. 1998. Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. ***Diseases of Aquatic Organisms***, 32:151-155.

Rombaut, G.; Dhert, Ph.; Vandenberghe, J.; Verschuere, L.; Sorgeloos, P. & Verstraete, W. 1999. Selection of bacteria enhancing the growth rate of axenically hatched rotifers (*Brachionus plicatilis*). ***Aquaculture***, 176:195-207.

Rosales-Velázquez, M. O. 1997. Efecto de la alimentación sobre los desoves de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Teleostei: Serranidae) mantenida en cautiverio. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN, La Paz, B.C.S., México. 62 pp.

Rosales-Velázquez, M. O.; Martínez-Pecero, R.; Anguas-Vélez, B.; Contreras-Olguín, M. & Rodríguez-Morales, E. O. 1992. Inducción al desove de la cabrilla arenera, *Paralabrax maculatofasciatus* (Stein.) (Pisces: Serranidae) mantenida en laboratorio. **III Congreso Nacional de Ictiología**. 24-27 Noviembre 1992. Oaxtepec, Morelos. México.

Sainz, J. C.; Maeda-Martínez, A. N. & Ascencio, F. 1998. Experimental vibriosis induction with *Vibrio alginolyticus* of larvae of the Catarina scallop (*Argopecten ventricosus = circularis*) (Sowerby II, 1842). ***Microbial Ecology***, 35:188-192.

Santos, J. A.; González, C. J.; Otero, A. & García-López, M. A. 1999. Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. ***Applied and Environmental Microbiology***, 65:5612-5614.

Santos, Y.; Bandin, I.; Nieto, T. P.; Barja, J. L.; Toranzo, A. E. & Ellis, A. E. 1991. Cell-surface-associated properties of fish pathogenic bacteria. ***Journal of Aquatic Animal Health***, 3:297-301.

Santos, Y.; Bandin, I.; Nieto, T. P.; Bruno, D. W.; Ellis, A. E. & Toranzo, A. T. 1990. Comparison of the cell surface hydrophobicity of bacterial fish pathogens by different procedures. In: Perkins, F. O. & Cheng, T. C. (Ed.). ***Pathology in Marine Science***. Academic Press, San Diego. 101-115 pp.

Santos, Y.; Toranzo, A. E.; Dopazo, C. P.; Nieto, T. P. & Barja, J. L. 1987. Relationships among virulence for fish, enterotoxigenicity, and phenotypic characteristics of motile *Aeromonas*. ***Aquaculture***, 67:29-39.

Scott, A. P. & Baynes, S. M. 1978. Effect of algal diet and temperature on the biochemical composition of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. ***Aquaculture***, 14:247-260.

Skjermo, J. & Vadstein, O. 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. ***Aquaculture***, 177:333-343.

Snell, T. W.; Bieberich, C. J. & Fuerst, R. 1983. The effects of green and blue-green algal diet on the reproductive rate of the rotifer *Brachionus plicatilis*. ***Aquaculture***, 31:21-30.

Snell, T. W.; Childress, M. J.; Boyer, E. M. & Hoff, F. H. 1987. Assessing the status of rotifer mass culture. ***Journal of the World Aquaculture Society***, 18:270-277.

Stelma Jr., G. N.; Johnson, C. H. & Spaulding, P. 1986. Evidence for the direct involvement of β -hemolysin in *Aeromonas hydrophila* enteropathogenicity. ***Current Microbiology***, 14:71-77.

Stenström, T. A. 1989. Bacterial hidrophobicity, an overall parameter for the measurement of adhesion potential to soil particles. ***Applied and Environmental Microbiology***, 55:142-147.

Thune, R. L.; Stanley, L. A. & Cooper, R. K. 1993. Pathogenesis of Gram-negative bacterial infections in warmwater fish. ***Annual Review Fish Diseases***, 3:37-68.

Todar, K. (ed.). 1998. **Mechanisms of bacterial pathogenicity**. Bacteriology at UW-Madison, 1-18.

Tsai, I. H.; Chuang, K. L. & Chuang, J. L. 1986. Chymotrypsins in digestive tracts of crustacean decapods (shrimps). ***Comparative Biochemical and Physiology***, 85:235-240.

Vadstein, O. 1997. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. ***Aquaculture***, 155:401-417.

Vadstein, O.; Oie, G. & Olsen, Y. 1993. Particle size dependent feeding by the rotifer *Brachionus plicatilis*. ***Hydrobiologia***, 255-256, 261-267.

Van Loosdrecht, M. C. M.; Lyklema, J.; Norde, W.; Schraa, G. & Zehnder, A. J. B. 1987. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. ***Applied and Environmental Microbiology***, 53:1893-1897.

Van Wormhoudt, A.; Le Chevalier, P. & Sellos, D. 1992. Purification, biochemical characterization and *n*-terminal sequence of a serine-protease with chymotrypsic and collagenolytic activities in a tropical shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). ***Comparative Biochemical and Physiology***, 103B:675-680.

Verschuere, L.; Heang, H.; Criel, G.; Sorgeloos, P. & Verstraete, W. 2000. Selected bacterial strains protect *Artemia* spp. from the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. ***Applied and Environmental Microbiology***, 66(3):1139-1146.

Wang, X. H. & Leung, K. Y. 2000. Biochemical characterization of different types of adherence of *Vibrio* species to fish epithelial cells. ***Microbiology***, 146:989-998.

Watanabe, T.; Kitajima, C. & Fujita, S. 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. ***Aquaculture***, 34:115-143.

Wong, C. Y. F.; Heuzenroeder, M. W. & Flower, R. L. P. 1998. Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model. ***Microbiology***, 144:291-298.

Yu, J.; Hino, A.; Hirano, R. & Hirayama, K. 1988. Vitamin B12-producing bacteria as a nutritive complement for a culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. ***Nippon Suisan Gakkaishi***, 54:1873-1880.

Zar, J. H. 1999. **Biostatistical Analysis**. Fourth Edition. Prentice Hall, New Jersey. 663 pp.

11 ANEXOS

Anexo 1. Relación peso-volumen de cada reactivo para la preparación del medio de cultivo agar marino 2216.

Reactivos	Cantidad (w/v)
Peptona de carne de carnero	1 %
Extracto de levadura	0.1 %
Sulfato ferroso (Fe ₃ SO ₄)	0.0002 g
Agar bacteriológico	15 %
Agua de mar	1000 ml

Anexo 2. Reactivos para llevar a cabo la prueba de tinción de Gram.

1.- Cristal violeta (oxalato de amonio): 2 g de cristal violeta y 20 ml de etanol (95%) en 80 ml de agua destilada.

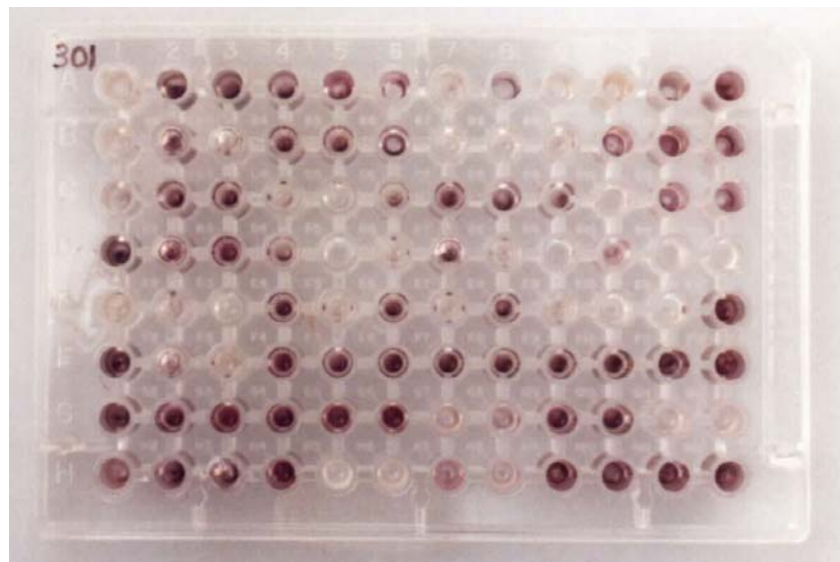
2.- Lugol: 1 g de yodo y 2 g de iodine potasico en 300 ml de agua destilada.

3.- Alcohol-Acetona: Alcohol al 30 % y acetona al 70 %.

4.- Safranina: 0.25 g de safranina y 10 ml de etanol (95%) en 90 ml de agua destilada.

Anexo 3. Sistema de multipuebas comerciales GN2 y GP2 MicroPlate-BIOLOG®.

El sistema de GN2 MicroPlate™, consiste de un panel de pruebas con un método estandarizado que utiliza 95 pruebas bioquímicas para identificar un amplio rango de bacterias entéricas, no entéricas, así como gram-negativas. El software Biolog's MicroLog™1, MicroLog 2 o MicroLog 3 son usados para identificar a las bacterias de acuerdo a su patrón metabólico en el sistema GN2 MicroPlate. La prueba BIOLOG® MicroPlate establece la capacidad de un microorganismo para utilizar u oxidar un panel preseleccionado con una fuente de carbono distinta. La prueba produce un patrón característico de pozos color púrpura, los cuales constituyen un “*Metabolic Fingerprint*”, la capacidad del organismo inoculado. Todos los nutrientes y bioquímicos necesarios están ordenados y secados dentro de 95 pozos de una placa. El violeta tetrazolium es usado como un ojo redox para indicar colorimétricamente la utilización de las diferentes fuentes de carbono.



Microplaca BIOLOG® con 95 diferentes fuentes de carbono, donde el cambio de color a morado (de claro a intenso), muestra la capacidad de la bacteria para utilizar dicha fuente.

Anexo 4. Identificación de las bacterias asociadas a larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*.

		Bioquímicas con el Sistema BIOLOG®	<i>Aeromonas media</i> 226	<i>Aeromonas media</i> 281	<i>Vibrio proteolyticus</i> 279	<i>Vibrio proteolyticus</i> 282	<i>Vibrio charchariae</i> 280	<i>Aeromonas ichthiosmia</i> 301	<i>Aeromonas sp</i> 302	<i>Vibrio sp</i> 303	<i>Vibrionaceae</i> 227	<i>Vibrionaceae</i> 228
A	1	WATER	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A	2	A- CYCLODEXTRIN	*	-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+	-	+/-
A	3	DEXTRIN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A	4	GLICOGEN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A	5	TWEEN 40	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A	6	TWEEN 80	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A	7	N- ACETYL GALACTOSAMINE	*	-	-	-	-	*	-	+	-/+	-
A	8	N- ACETYL-D-GLUCOSAMINE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A	9	ADONITOL	-	-	-	-	-	*	-	-	-	+/-
A	10	L- ARABINOSE	-/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A	11	D- ARABITOL	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-
A	12	D- CELLOBIOSE	+	+	*	*	+	+	+	+	+	+
B	1	I- ERYTHRITOL	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-
B	2	D- FRUCTOSE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	3	L- FUCOSE	+/-	-	*	-	-	-	-	+/-	+/-	-
B	4	D- GALACTOSE	+	+	*	-	+	+	+	+	+	+/-
B	5	GENTIOBIOSE	+	-	+/-	*	+/-	+	+	+/-	+	+/-
B	6	A-D- GLUCOSE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	7	M- INOSITOL	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
B	8	A-D- LACTOSE	+	-	-	-	-	-	-	+/-	+	-
B	9	LACTULOSE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	10	MALTOSE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	11	D- MANNITOL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	12	D- MANNOSE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C	1	D- MELIBIOSE	-	-	*	-	-	*	*	-	-	-
C	2	B- METHYL-D-GLUCOSIDE	+	+	+/-	+/-	-	+	+	*	+	-
C	3	D- PSICOSE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C	4	D- RAFFINOSE	-	-	-	-	-	*	*	-	*	-
C	5	L- RHAMNOSE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	6	D- SORBITOL	+	-	+	*	*	+	*	-	+	+

Anexo 4. Identificación de las bacterias asociadas a larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*.

Bioquímicas con el Sistema BIOLOG®			<i>Aeromonas media</i> 226	<i>Aeromonas media</i> 281	<i>Vibrio proteolyticus</i> 279	<i>Vibrio proteolyticus</i> 282	<i>Vibrio charchariae</i> 280	<i>Aeromonas ichthiosmia</i> 301	<i>Aeromonas sp</i> 302	<i>Vibrio sp</i> 303	<i>Vibrionaceae</i> 227	<i>Vibrionaceae</i> 228
C	7	SUCROSE	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+/-
C	8	D- TREHALOSE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C	9	TURANOSE	+	-/+	+	+	-	+	+	+	+	+
C	10	XYLITOL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	11	METHYL PYRUVATE	+	+	+	+	*	+	+	+	+	+
C	12	METHYL SUCCINATE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D	1	ACETIC ACID	+	+	+	+	+/-	+	+	*	+/-	+
D	2	CIS- ACONITIC ACID	*	*	+	+	-	+	+	+/-	*	+
D	3	CITRIC ACID	-	-	+	+/-	-	+	+	+/-	-	+
D	4	FORMIC ACID	-	*	+	*	-	+	+	-	-	+
D	5	D- GALACTONIC ACID LACTONE	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
D	6	D- GALACTURONIC ACID	*	-	-	-	-	-	*	-	*	-
D	7	D- GLUCONIC ACID	*	+	+	+	+	+	+	+	*	+
D	8	D- GLUCOSAMINIC ACID	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	9	D- GLUCURONIC ACID	+/-	-	-	-	+	-	-	+	+/-	-
D	10	A- HYDROXYBUTYRIC ACID	-	-	*	*	-	*	*	-	-	+
D	11	B- HYDROXYBUTYRIC ACID	-	+/-	-	-	-	*	-	-	-	-
D	12	G- HYDROXYBUTYRIC ACID	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	1	P- HYDROXYPHENYL ACETIC ACID	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	2	ITACONIC ACID	-	-	-	*	-	-	*	-	-	-
E	3	A- KETO-BUTYRIC ACID	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-
E	4	A- KETO-GLUTARIC ACID	-	-	+	+	+/-	+	+	+/-	-	+
E	5	A- KETO-VALERIC ACID	-	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-
E	6	D,L- LACTIC ACID	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	7	MALONIC ACID	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-
E	8	PROPIONIC ACID	+	+	+	+	+/-	+	+	-	+/-	+
E	9	QUINIC ACID	-	-	-	-	-	*	*	-	-	-
E	10	D- SACCHARIC ACID	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	11	SEBACIC ACID	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	12	SUCCINIC ACID	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Anexo 4. Identificación de las bacterias asociadas a larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*.

		Bioquímicas con el Sistema BIOLOG®	<i>Aeromonas media</i> 226	<i>Aeromonas media</i> 281	<i>Vibrio proteolyticus</i> 279	<i>Vibrio proteolyticus</i> 282	<i>Vibrio charchariae</i> 280	<i>Aeromonas ichthiosmia</i> 301	<i>Aeromonas sp</i> 302	<i>Vibrio sp</i> 303	<i>Vibrionaceae</i> 227	<i>Vibrionaceae</i> 228
F	1	BROMO SUCCINIC ACID	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
F	2	SUCCINAMIC ACID	*	*	+	+	-	+	+	*	-	+
F	3	GLUCURONAMIDE	+/-	-	-	-	-	-	-	+	+/-	-
F	4	ALANINAMIDE	+	+	*	+	-	+	+	-/+	-	+
F	5	D- ALANINE	+	+	+	+	+/-	+	+	-	*	+
F	6	L- ALANINE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	7	L- ALANYL-GLYCINE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	8	L- ASPARAGINE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	9	L- ASPARTIC ACID	+	+	+	+	+	+	+	-/+	+	+
F	10	L- GLUTAMIC ACID	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	11	GLYCYL-L-ASPARTIC ACID	+	+	+	*	+	+	+	+	+	+
F	12	GLYCYL-L-GLUTAMIC ACID	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	1	L- HISTIDINE	+	+	+	+	-	+	+	-	+/-	+
G	2	HYDROXY-L-PROLINE	-	+/-	+	+	-	+	+/-	-	-	+
G	3	L- LEUCINE	-	-	+	+	-	+	+	-	-	*
G	4	L- ORNITHINE	*	+	+	+	-	+/-	+/-	-	*	+
G	5	L- PHENYLALANINE	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-
G	6	L- PROLINE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	7	L- PYROGLUTAMIC ACID	+/-	-	-	-	-	*	+	-	-	-
G	8	D- SERINE	*	-/+	-	*	+	*	+	+	-	-
G	9	L- SERINE	+	+	+	+	+	+	+	-/+	+	+
G	10	L- THREONINE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	11	CARNITINE	-	-	-	-	-	*	+	-	-	-
G	12	G- AMINO BUTYRIC ACID	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-
H	1	UROCANIC ACID	*	-/+	*	*	-	+	+	-	-	-
H	2	INOSINE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	3	URIDINE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	4	THYMIDINE	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
H	5	PHENYLETHYLAMINE	-	-	-	-	-	*	-	-	+	-
H	6	PUTRESCINE	+/-	-	+	+	-	*	+/-	-	+	-/+

Anexo 4. Identificación de las bacterias asociadas a larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*.

		Bioquímicas con el Sistema BIOLOG®	<i>Aeromonas media</i> 226	<i>Aeromonas media</i> 281	<i>Vibrio proteolyticus</i> 279	<i>Vibrio proteolyticus</i> 282	<i>Vibrio charchariae</i> 280	<i>Aeromonas ichthiosmia</i> 301	<i>Aeromonas sp</i> 302	<i>Vibrio sp</i> 303	<i>Vibrionaceae</i> 227	<i>Vibrionaceae</i> 228
H	7	2- AMINO ETHANOL	-	-	*	-	-	*	-	-	-	*
H	8	2,3- BUTANEDIOL	*	-	-	-	-	*	+	-	-	-
H	9	GLYCEROL	+	+	+	+	+	+	+	-/+	+	+
H	10	D,L-A- GLYCEROL PHOSPATE	-/+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
H	11	GLUCOSE-1-PHOSPHATE	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+
H	12	GLUCOSE-6-PHOSPHATE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* = Lectura dudosa. +/- => reacción es positiva. -/+ => reacción es negativa.