

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

**EVALUACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA DE
HONGOS INFECCIOSOS EN CAMARÓN BLANCO**
(Litopenaeus vannamei)

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

PRESENTA

NORMA ANGÉLICA OCHOA ÁLVAREZ

LA PAZ, B. C. S. MÉXICO, 2004

Agradecimientos

Al CIBNOR por todas las facilidades de infraestructura y apoyo económico que siempre me brindaron en el desarrollo del presente trabajo de tesis

Al CICIMAR por el apoyo académico brindado

Al CONACYT por su apoyo económico a través de una beca de colegiatura y manutención

Indice

No.		Pagina
	Glosario	I
	Lista de tablas	IV
	Lista de figuras	V
	Abreviaturas	VI
	Resumen	VII
	Abstract	VIII
1	Introducción	1
2	Antecedentes	11
3	Justificación	12
4	Objetivo	14
5	Materiales y Métodos	15
5.1	Material Biológico	15
5.1.1	Hongos	15
5.1.2.	Camarones	15
5.2	Identificación y características de los hongos aislados	16
5.2.1	Identificación	16
5.2.2	Crecimiento	16
5.3	Obtención de cultivos primarios de células de camarón blanco.	17
5.3.1	Cultivo primario de branquia, intestino y tegumento.	17
5.3.2.	Cultivo primario de hemocitos	19
5.4	Ensayo de citotoxicidad de los <i>Geotrichum sp1</i> y <i>sp2</i>	19
5.5	Ensayo de adhesión de <i>Geotrichum sp1</i> y <i>sp2</i> a cultivo primario de células de camarón.	21
5.5.1.	Obtención del micelio	21
5.5.2.	Obtención de esporas	22
5.5.3	Marcaje de los hongos	22
5.5.4	Bioensayo de adhesión	23
5.6	Determinación de la producción de enzimas amilasa, lipasa proteasa y quitinasa.	24
5.6.1	Amilasa	24
5.6.2	Lipasa	25
5.6.3.	Proteasa	25
5.6.4	Quitinasa	25
5.7	Efecto de <i>Geotrichum sp1</i> y <i>sp2</i> en la supervivencia de postlarvas de camarón.	25
5.7.1	Obtención de la suspensión micelial.	26
5.7.2	Obtención del sobrenadante de cultivo	26
5.7.3	Bioensayo de supervivencia	26
6	Resultados	28
6.1	Identificación y caracterización del crecimiento de los hongos aislados	28
6.1.1	Identificación	28
6.1.2	Crecimiento	31
6.2	Citotoxicidad de <i>Geotrichum sp1</i> y <i>G. sp2</i>	32
6.3	Adhesión de <i>Geotrichum sp1</i> y <i>sp2</i> a células de camarón.	35
6.4	Determinación de la presencia de algunas enzimas producidas por los hongos del género <i>Geotrichum</i> .	38
6.5	Determinación de la supervivencia de larvas de camarón expuestas a los hongos del género <i>Geotrichum</i> .	38

7	Discusión	41
7.1	Toxinas	43
7.2	Adhesión	46
7.3	Enzimas	48
7.4	Supervivencia	49
8	Conclusiones	54
9	Recomendaciones	55
10	Bibliografía	56
	Apéndices	63
	Anexo 1	65
	Anexo 2	67
	Anexo 3	68
	Anexo 4	73

GLOSARIO

Capacidad de adhesión: Propiedad de los microorganismos que les permite adherirse (pegarse) a las superficies de su hospedero.

Cepa: Población celular descendiente de una única célula. Punto de inicio de una serie filogenética.

Citotoxicidad: Acción o efecto de una sustancia perjudicial para las células.

Crecimiento exponencial: Fase del crecimiento de un microorganismo en la que el número de células se duplica en un período de tiempo fijo.

Colonia: Población de células que puede observarse macroscópicamente, y que crecen en un medio sólido, procedentes de una sola célula.

Colonización: Multiplicación de un microorganismo después de su adherencia a los tejidos de un organismo hospedero o a otras superficies.

Cultivo primario: Células en cultivo aislado directamente de un tejido animal, el cual es preparado por técnicas de disgregación manuales o enzimáticas

Cultivo: Cepa particular o tipo de organismo en un medio de cultivo en el laboratorio.

Curva de crecimiento: Representación gráfica del crecimiento de un microorganismo en un medio de cultivo.

Enfermedad: Lesión o afección a un hospedero, que perjudica su funcionamiento. Estado de anormalidad funcional o estructural en un ser vivo.

Enzootias: Enfermedad que afecta a una o mas especies de animales en determinado territorio.

Espora: Término utilizado para designar estructuras resistentes de reposo que forman numerosos procariotas y hongos.

Facultativo: Indica que un organismo es capaz de crecer tanto en presencia como en ausencia de un factor ambiental.

Fase de latencia: Período posterior a la inoculación de un medio de cultivo y previo al crecimiento del microorganismo.

Fase estacionaria: Período en el que cesa el crecimiento de una población de microorganismos o cultivo.

Fase exponencial: Período en el que el crecimiento en el número de individuos de una población es constante y máximo..

Hidrólisis: Descomposición de una sustancia en unidades más pequeñas, generalmente monómeros, por adición de agua.

Género: Grupo taxonómico de especies relacionadas.

Inmunodeficiencia: Que tiene un sistema inmunitario disfuncional o que no funciona completamente.

Inhibición: Que impide el crecimiento o función.

Inóculo: Material usado para iniciar un cultivo microbiano.

Invasividad: Capacidad de un organismo de diseminarse a través del cuerpo desde un foco de infección.

Hospedero: Organismo capaz de sustentar el crecimiento de un virus u otro parásito.

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

Medio de cultivo: Solución de varios nutrientes adecuada para el crecimiento de microorganismos.

Metabolito secundario: Producto excretado por un microorganismo al final de la fase exponencial o durante la fase estacionaria.

Micelio: Cuerpo vegetativo de los hongos, formado por multitud de células.

Micosis: Proceso infeccioso causado por un hongo

Mohos: Hongos filamentosos.

Mortalidad: Incidencia de muerte en una población.

Necrosis: Muerte celular o de un tejido.

Parásito: Organismo que vive a costa de otro, perjudicándolo, pero sin causarle la muerte, al menos al corto plazo.

Patógeno: Organismo capaz de causar daño a un hospedero, al cual infecta.

Patogenicidad: Capacidad de un parásito de causar daño a su hospedero.

Saprophyto: Microorganismo que se desarrolla sobre materia orgánica inerte.

Toxina: Sustancia microbiana perjudicial para el hospedero.

Virulencia: Grado de patogenicidad de un parásito.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Descripción Morfológica de las cepas aisladas y de <i>Fusarium solani</i>	28
Tabla 2. Actividad enzimática de hongos del genero <i>Geotrichum</i> y cepas <i>Fusarium</i> .	38
Tabla 3. Datos de porcentaje de supervivencia de larvas PL8 de camarón blanco, expuestas a las cepas de: <i>Geotrichum sp1</i> , <i>Geotrichum sp2</i> , F-37, y F-45, por un periodo de 24 horas.	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Características morfológicas de <i>Geotrichum candidum</i>	9
Figura 2. Diagrama de flujo para la obtención de los componentes Sn y Son de <i>Geotrichum sp1</i> , <i>Geotrichum sp2</i> , <i>Fusarium solani</i> y <i>F. javanicum</i>	21
Figura 3. Características morfológicas de <i>Geotrichum sp1</i> . Fotografías en contraste de fases100 x.	30
Figura 4. Características morfológicas de <i>Geotrichum sp2</i> . Fotografías en contraste de fases 100x.	29
Figura 5. Cinética de crecimiento de <i>Geotrichum sp1</i> y <i>Geotrichum sp2</i> .	32
Figura 6. Citotoxicidad de las cepas: a) <i>Geotrichum sp1</i> , b) <i>Geotrichum sp2</i> , c) F-37, y d) F-45, en cultivo primario de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>)	35
Figura 7. Adhesión de las cepas <i>Geotrichum sp1</i> (♦) y <i>Geotrichum sp2</i> () en cultivo primario de intestino, branquia, tegumento y hemocitos de camarón de blanco (<i>L. vannamei</i>)	37
Figura 8. Curvas de supervivencia de larvas PL8 (<i>L. vannamei</i>) contra las cepas: a) <i>Geotrichum sp1</i> , b) <i>Geotrichum sp2</i> , c) F-37 y d) F-45.	73

LISTA DE ABREVIATURAS

Agar papa dextrosa	PDA
Biólogo	Biol.
Buffer de Fosfatos	PBS
Densidad Óptica	DO
Dimetil sulfóxido	DMSO
Dodecil Sulfato de Sodio	SDS
Etcétera	Etc.
Extracto	Ext.
Grados Celsius (centígrados)	° C
Gramos	g
Hora	h
Horas	hrs.
Microlitros	μ l
mili Molar	mM
Mililitros	ml
Milímetro	mm
Minutos	min.
Molar	M
Nanómetro	nm
Orto-Fenil-Diamino	POD
Pagina	Pág.
Post larva 8	PL8
Potencial de Hidrogeniones	pH
Probabilidad	P
Revoluciones por Minuto	rpm
Segundo	seg
Sobrenadante	Sn
Sonicado	Son
Volumen	Vol

RESUMEN

El presente trabajo de tesis se realizó con la finalidad de conocer la patogenicidad de dos cepas de hongos filamentosos, aislados de estanquería supralitoral de camarón del CIBNOR, La Paz, B.C.S. Las dos cepas aisladas pertenecen al género *Geotrichum* que se conforma de hongos saprofitos de ambientes marinos y terrestres, caracterizados por tener un crecimiento muy acelerado. El grado de patogenicidad de las cepas se evaluó mediante los factores de virulencia de adhesión y citotoxicidad a cultivos primarios de células de branquia, tegumento, intestino y hemocitos de camarón, observándose que los cultivos primarios de tegumento y hemocitos fueron los más susceptibles a estos factores. Igualmente, se apreció que las estructuras filamentosas de estas cepas tienen mayor afinidad por el cultivo primario de los hemocitos.

Además, se evaluó la presencia de algunas enzimas en las cepas, resultando positivas las enzimas de proteasa, lipasa y amilasa.

A la par, se realizaron experimentos de supervivencia de post larvas PL8 de camarón (*L.vannamei*) presentándose mortalidades apreciables al entrar en contacto con diferentes dosis de filamentos de cepas de *Geotrichum*, así como con su sobrenadante.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten considerar que los hongos filamentosos pueden ser patógenos oportunistas y representar un riesgo de salud para cultivos de camarón.

ABSTRACT

The present work was carried out in order to determine the pathogenicity of two filamentous fungi strains isolated from a supralitoral sea shrimp pond at the CIBNOR, in La Paz, B.C.S. The isolated strains were identified as belonging to *Geotrichum* genera, which is composed of marine or terrestrial saprophyte fungi whose principal characteristic is an accelerated growth. Fungi pathogenicity was evaluated by determining their virulence and adhesiveness against primary cultures of gills, tegument, guts and hemocytes of shrimps. Results show that cultures from the tegument and hemocytes were the most susceptible to such fungi activities, tested factors and that their filamentous structures have high affinity to hemocytes.

Protease, lipase and amylase activity as virulence factors were evaluated and survival of shrimp postlarva PL8, when exposed to different quantities of culture supernatant or filaments of *Geotrichum* strain, determined. A considerable mortality in this case was observed.

All the collected data indicate that the isolated filamentous fungi act as pathogens and thus they may represent a health risk to shrimp in cultures.

1.-INTRODUCCIÓN

La acuicultura representa en la actualidad una actividad de gran impacto e importancia comercial, tanto en nuestro país como en el resto del mundo, para la producción de alimento. Por lo tanto, es primordial vigilar diversos aspectos de las técnicas de cultivo como son: la especie cultivable, su manejo y, sobre todo, la calidad sanitaria dentro de los sistemas de cultivo y durante el procesamiento de sus productos (Anuario Estadístico de Pesca, 2001). Considerando que las enfermedades pueden tener efectos negativos en la producción y comercialización, además de que se pone en riesgo la salud de los consumidores, es importante desarrollar procedimientos que ayuden a prevenir y combatir su incidencia durante el cultivo (Secretaría de Pesca, 1988; Bachere, 2000).

Durante el cultivo existen múltiples factores que contribuyen a la aparición de enfermedades y problemas sanitarios. Para establecer los mecanismos causales de una enfermedad se consideran 3 aspectos fundamentales:

- I. Condiciones del cultivo: Características del tipo de suelo del estanque, calidad de agua, calidad ambiental, temperatura, salinidad, pH, instalaciones, así como el personal encargado de su manejo (Bachere, 2000)
- II. Características del hospedero: La edad (Sindermann, 1990; Noga, 1990) el estado nutricional y de salud del organismo, (Hunter *et al.*, 1979; Magarelli *et al.*, 1979) y los factores genéticos (Kautsky *et al.*, 2000), principalmente.

III. Las características del patógeno: Virulencia, la dosis infectiva, así como las vías y mecanismos de infección (Atlas, 1984; Aguirre *et al.*, 2003).

Las enfermedades que afectan los cultivos en acuicultura pueden ser consideradas como el resultado de una compleja interacción entre el hospedero, el patógeno y el ambiente de cultivo.

Las enfermedades infecciosas en camarones peneidos han sido ampliamente documentadas por varios autores, quienes consideran como principales agentes infecciosos a los virus, bacterias y hongos (Bachere *et al.*, 1995; Bachere *et al.*, 2000; Gómez-Gil *et al.*, 2000; Lavens y Sorgeloos, 2000; Saulnier *et al.*, 2000; Vargas–Albores y Yepiz-Placencia, 2000).

a. Enfermedades por virus

Las enfermedades provocadas por los virus en los camarones peneidos son generalmente responsables de graves enzootias. Los principales virus conocidos son: IHNV (Infectious Hipodermal and Haematopoietic Necrosis Viral), el virus del Síndrome Taura o Virus cabeza amarilla y el grupo de virus pertenecientes a la familia Baculoviridae. Estos virus han causado serios problemas y cuantiosas pérdidas económicas en distintos países productores de camarón (Bachere *et al.*, 2000; Rodríguez y Le Moullac, 2000)

b. Enfermedades por bacterias.

Las enfermedades bacterianas son consideradas como la mayor causa de mortalidad en larvicultura de camarones peneidos. Las bacterias pertenecientes

al género *Vibrio* han sido de las más reportadas como patógenas de camarón. Distintas especies de *Vibrio* afectan tanto a estadios larvales y a juveniles de distintas especies de camarón. Otros géneros de bacterias como *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Flavobacterium* también han sido implicadas en la presencia de enfermedades de camarón (Bachere *et al.*, 2000; Gómez-Gil *et al.*, 2000; Lavens y Sorgeloos, 2000; Saulnier *et al.*, 2000).

c. Enfermedades por hongos:

Los hongos son considerados patógenos oportunistas en acuicultura, principalmente porque afectan organismos sometidos a estrés o inmunodeficientes. La mayoría de los trabajos sobre enfermedades por hongos en animales marinos han sido enfocadas a especies de importancia en acuicultura o pesquerías (Hunter *et al.*, 1979; Magarelli, 1979; Jennings, 1983; Porter, 1985; Williamson, 1986; Noga, 1990; Sindermann, 1990; Bertke y Aronson, 1992; Bachere *et al.*, 2000). Sin embargo, comparada con los que se conocen de agua dulce o terrestre (Noga, 1990), la lista de hongos en ambientes marinos es muy reducida. A la fecha se tienen reportes solo de 4 géneros de hongos como agentes causales de enfermedades en camarón. En sistemas de cultivo, por ejemplo, Lightner (1981) reporta mortalidades de hasta el 100 % de huevos y larvas de varias especies de camarones peneidos causados por *Lagenidium callinectes*. Así mismo, Sindermann (1990) reporta que este hongo es capaz de infectar cultivos de camarón en estadios juveniles y adultos. Otros reportes de infección de *Lagenidium* sp, en larvas y huevos de camarones

pendidos, son los de Porter (1985) y Bertke y Aronson (1992), aunque en estos casos no se describen porcentajes de mortalidad. Igualmente otros 2 géneros como *Haliphthoros*, y *Sirolopidium* provocan enfermedades en los cultivos de larvas de camarón (Noga, 1990). Por su parte, el género *Fusarium*, afecta los diferentes estadios de desarrollo del camarón como nauplio, zoea, juvenil y adultos (Alderman y Polglase, 1986; Bachere, 2000; Alavandi, 2004) y sido reportado como causante de epizootias en el cultivo de camarón y como productor de toxinas capaces de provocar la muerte a camarones adultos (Alderman y Polglase, 1986; Bachere *et al.*, 2000), Los camarones *Peneaus chinensis* (Chen *et al.*, 1992), *P. californensis* (Lightner y Hose, 1984), *P. stylirostris* (Lightner, 1981), *P. japonicus* (Lightner, 1981; Lightner y Hose, 1984; Sinderman, 1990; Noga, 1990), son algunas de las especies de camarón afectadas por este género.

En lo que se refiere a hongos que habitan ambientes marinos o salobres se sabe que ello es posible gracias a su capacidad de soportar altas presiones osmóticas, (Tortora *et al.*, 1992) condiciones que se registran en ambientes marinos.

Micología:

El estudio de los hongos es llamado micología (Tortora *et al.*, 1992). Los hongos incluyen tanto organismos unicelulares (levaduras) como multicelulares (mohos y hongos carnosos). Aún cuando en la literatura se definen los tres diferentes grupos de organismos como pertenecientes al reino de los hongos, de manera habitual la palabra hongo se refiere a mohos filamentosos. Los hongos

como especies ubícuas y cosmopolitas, son quimio-heterótrofos, es decir, requieren compuestos orgánicos para obtener su energía y carbono. Son aerobios o anaerobios facultativos y no se conocen a la fecha anaerobios estrictos. La mayoría de los hongos que habitan en suelo y tierra son saprófitos y al igual que las bacterias contribuyen en la descomposición de la materia y al reciclamiento de los nutrientes. Crecen en ambientes ácidos, resisten altas presiones osmóticas y son capaces de vivir en ambientes con muy bajo contenido de humedad. Se conocen más de 100,000 especies de hongos, pero solo unas 100 especies son patógenas para el hombre y otros animales (Tortora *et al.*, 1992; Austin, 1993). Los hongos patógenos son invasores oportunistas de individuos con disminución en la resistencia a la infección (Pelczar, *et al.*, 1977; Brock, 1978; O'Leary, 1989).

Tradicionalmente la identificación de los hongos filamentosos se realiza con base a sus características morfológicas, incluyendo características de la colonia y esporas reproductivas (Austin, 1993). Sin embargo, actualmente la identificación de hongos se apoya en diversas técnicas moleculares (O'Donnell, 1996; Kurtzman y Robnett, 1998).

El cuerpo de los hongos filamentosos, denominado hifas, consiste de la unión de células alargadas. En la mayoría de los casos las hifas son septadas; es decir, están divididas, lo que permite distinguirlas en unidades como células uni-nucleadas. Sin embargo, existen casos en que las hifas carecen de división y solo se observan hifas largas, es decir, células continuas con muchos núcleos llamadas hifas coenocíticas (Tortora *et al.*, 1992; Austin, 1993).

Normalmente las hifas crecen por elongación de su punta. Cuando las condiciones son adecuadas, las hifas se entrelazan entre sí y forman una gran masa conocida como micelio, la cual es visible a simple vista. La parte del micelio que tiene la función de obtener los nutrientes es llamado micelio vegetativo. Normalmente el micelio está anclado al sustrato o medio de cultivo (Tortora *et al.*, 1992; Austin, 1993).

La parte del micelio donde se realiza la reproducción es llamado micelio reproductivo, o micelio aéreo, debido a que crece por arriba de la superficie del sustrato o medio de cultivo y es el que posee las estructuras reproductivas. (Austin, 1993). Las esporas presentan diversas formas, dependiendo de la especie y pueden ser de dos tipos, sexuales o asexuales (Pelczar, *et al.*, 1977; Tortora *et al.*, 1992).

Los hongos filamentosos pueden colonizar ambientes de agua dulce y marinos; sin embargo, la mayoría de los hongos conocidos habitan en ambientes terrestres, en el suelo o sobre materia vegetal muerta (Pelczar, *et al.*, 1977; Brock, 1978; Sieburth, 1979; Rheinheimer, 1994; Gareth, 2000).

Factores de virulencia en hongos:

Los microorganismos causantes de enfermedades poseen atributos conocidos como factores de virulencia, los cuales les permiten invadir al hospedero y provocarle daño (Atlas, 1984). La virulencia de un agente infeccioso depende en gran medida de dos propiedades: su capacidad de invasión y la producción de sustancias tóxicas. La invasión es referida a la capacidad del microorganismo para adherirse a los tejidos, atacar células y

multiplicarse, dentro de la célula o tejido, produciendo una infección. La toxicidad se refiere a la habilidad del microorganismo de producir toxinas, las cuales son capaces de alterar las funciones normales de células o tejidos, o destruirlas. Algunas toxinas, producidas por microorganismos, pueden producirse fuera del hospedero y llegar a causar un daño severo si llegara a penetrar a su cuerpo (Atlas, 1984).

En el género *Geotrichum*, autores como Mukherjee y Kiewitt (1996) reportaron la presencia de lipasas, las cuales hidrolizan parcialmente aceites de algunas semillas de plantas. Por su parte Aldarf *et al.*, (2002) demostraron que *Geotrichum candidum* excreta amoniaco al medio como metabolito secundario. Nakamura *et al.*, (2002), confirmaron la presencia poligalacturasa como mecanismo para facilitar la infección en cítricos y el desarrollo de la enfermedad conocida como pudrimiento agrio de los frutos.

Género *Geotrichum*

Entre los hongos filamentosos, los del género *Geotrichum* son comunes en toda clase de sustratos húmedos, principalmente en frutas y en aquellos ricos en nutrientes como la leche y el queso, en donde está reportado como saprófito. Ocasionalmente se han encontrado en pacientes con enfermedades pulmonares, como colonos saprófitos más que como patógenos (Kurtzman y Fell, 1999). Autores como Rose y Harrison (1987) reportan que el género *Geotrichum* es generalmente saprófito pero existen casos auténticos de infección en animales y humanos, principalmente en organismos con baja resistencia a infecciones (Alexopoulos, 1977). Su distribución es mundial y puede ser aislado de suelos y de aguas residuales, así como de productos lácteos-ácidos, vinos rancios o alimentos fermentados. También ha sido reportado en niveles bajos en cereales, maíz, sorgo, cacahuates y soya (Messiaen y Lafon, 1968; Rose y Harrison, 1987; Pitt y Hocking, 1997).

La especie *G. candidum* es morfológicamente reconocida como una especie de rápido crecimiento expansivo, con ramificaciones muy amplias (Pitt y Hocking, 1997; Kurtzman y Fell, 1999). Produce un micelio bien desarrollado. Las porciones terminales de sus hifas se rompen en artrosporas cortas de forma cilíndrica con extremos achatados (Alexopoulos, 1977). Las hifas se fragmentan cuando están maduras, presenta micelio aéreo blanco y en fase vegetativa es hialino y septado (Fig. 1). El tamaño de la conidia (artrospora) oscila entre 3-6 x 6-12 μm y su crecimiento está restringido a un habitat de alta disponibilidad de

agua. El crecimiento óptimo es entre 25 y 30° C. Puede crecer en condiciones de muy baja tensión de oxígeno pero no en condiciones anaeróbicas (Pitt y Hocking, 1997).

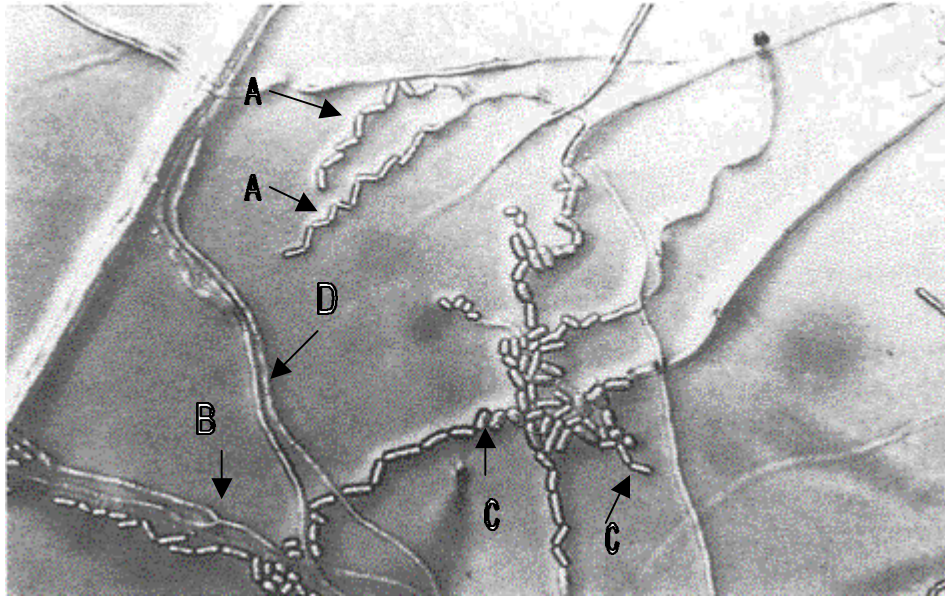


Figura 1. Características morfológicas de *Geotrichum candidum* tomada de Whiteside (1988). A: Indica el acomodo en zig-zag de las esporas
B: Muestra la punta de la hifa con 2 o 3 ramificaciones. C: Espora
D: Septo de la hifa

Camarón blanco (*L. vannamei*):

La producción de camarón en las granjas ha tenido siempre el propósito de lograr productos de excelente calidad para el consumidor con la menor inversión posible (Jaw-Kai y Leiman, 2000). Desafortunadamente, los organismos cultivados, principalmente las larvas, se ha encontrado que presentan baja calidad con respecto a las larvas capturadas de la naturaleza. Esto, al parecer, se debe a diversos factores: primero, no fueron seleccionadas de manera natural; segundo, para alimentarlas, se usó alimento artificial; y

tercero, presentan una baja adaptabilidad (Lavens y Sorgeloos, 2000). Todo esto las hace más susceptibles a alguna infección provocada principalmente por bacterias, virus u hongos. (Magarelli *et al.*, 1979; Hunter *et al.*, 1979; Baschere, 2000).

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Pérez-Farfante y Kensley, 1997) es un crustáceo decápodo que se encuentra en ambientes marinos y en estuarios (Coll-Morales, 1986). Se distribuye desde la parte alta del Golfo de California, hasta la parte norte de Perú (Dore y Claus, 1987). Presenta 3 distintos estadios larvale: nauplio, zoea y misis, seguido del estadio post-larval (McLaughlin, 1980).

L. vannamei es una de las especies de mayor importancia económica en México, tanto en la pesca como en acuacultura (Rodríguez, de la cruz, 1981; Del Valle, 1992). De acuerdo con Del Valle (1992) las condiciones de Baja California Sur son propicias para el cultivo de diversas especies marinas, en especial de camarón blanco, por lo que se prevé un desarrollo importante de esta actividad en la región. Sin embargo, resulta primordial conocer de manera integral la biología de esta especie y en particular, los métodos más apropiados para su cultivo y, sobre todo, las enfermedades y padecimientos que pudieran afectar su producción.

2.-ANTECEDENTES

En 1996, durante la preparación inicial de la estanquería supralitoral para el cultivo de camarón blanco, (*L. vannamei*), del CIBNOR, se detectó la presencia de algunas manchas blancas en las paredes y el fondo de los estanques. En una etapa inicial, estos microorganismos fueron identificados de manera preliminar como miembros de la familia de los hongos (Sánchez-Paz, 1996), posteriormente fueron identificados en este trabajo como hongos filamentosos pertenecientes al género *Geotrichum*. Autores como Alderman y Polglase (1986), O' Donnell (1996) y Aldarf, *et al.*, (2002) reportan que el género *Geotrichum* tiene la facultad de excretar amoníaco al medio ambiente donde se desarrolla, el cual puede ser tóxico para los camarones. Por su parte, Mukherjee y Kiewitt, (1996) y Nakamura *et al.*, (2002), reportan la capacidad de este género de liberar lipasa al medio, lo que le sirve para hidrolizar parcialmente aceites de algunas semillas de plantas, así como poligalacturasa, la cual es la causante del desarrollo de la enfermedad conocida como pudrimiento agrio de los frutos. Este trabajo es el primer reporte que se tiene del género *Geotrichum* en estanquería de camarón considerado como patógeno oportunista en estos cultivos.

3.-JUSTIFICACION

Dada la importancia económica del cultivo de camarones peneidos en el mundo, es trascendental tener un conocimiento completo de los factores involucrados en su cultivo: calidad ambiental, prevención y control de enfermedades, factores biológicos, factores físico-químicos, todo esto enfocado a garantizar un producto de excelente calidad para el consumidor y al mismo tiempo, garantizar las menores pérdidas económicas para el productor. (Bainy, 2000; Bachere, 2000)

En México, y especialmente en Baja California Sur, la acuacultura es una actividad con gran potencial económico. Sobre todo si consideramos que las costas de Baja California Sur presentan condiciones geográficas y ambientales propicias para el cultivo de una gran variedad de especies, especialmente de *L. vannamei* (Alba, 1980).

Habitualmente, la mayoría de los agentes biológicos, causantes de enfermedades en los organismos cultivados, se encuentran presentes en la naturaleza formando parte de la microflora del ambiente (Williamson, 1986; Bachere *et al.*, 1995; Sindermann, 1990; Hilne y Jayasree, 2001). Sin embargo, otros factores, como el exceso de alimento no consumido, la mala calidad del agua y las altas densidades de organismos en el cultivo, pueden favorecer el crecimiento y multiplicación de microorganismos potencialmente patógenos.

El estudio de la patogénesis en los cultivos acuícola requiere de considerar lo siguiente:

- La identificación del microorganismo causante de la enfermedad;
- La determinación del proceso de infección (invasión, multiplicación, diseminación);
- La identificación de los factores de virulencia del patógeno (adherencia, producción de toxinas, etc.) y,
- La determinación de la resistencia del huésped a la infección (inmunidad)

Alavandi (2004) reporta al igual que otros autores que los estadios mas susceptibles de los camarones de ser afectados por una micosis son los estadios iniciales, y se ha llegado a reportar que algunas micosis han afectado en un 100 % estos estadios, en tan solo 1 o 2 días de aparecer los signos. Por otra parte se sabe que los hongos actúan como patógenos oportunistas en acuicultura, principalmente, porque afectan organismos sometidos a estrés o inmunodeficientes, condiciones encontradas muy a menudo en esta actividad.

4.-OBJETIVO GENERAL

Evaluar algunos factores de virulencia de *Geotrichum sp1* y *sp2* hacia el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).

Objetivos particulares

- a) Evaluar la citotoxicidad de los hongos *Geotrichum sp1* y *sp2* en cultivo primario de células de camarón blanco.
- b) Evaluar la capacidad de adhesión de los hongos *Geotrichum sp1* y *sp2* a células de camarón blanco en cultivo primario.
- c) Determinar la actividad de algunas enzimas extracelulares producidas por los hongos *Geotrichum sp1* y *sp2*.
- d) Determinar la supervivencia de larvas de camarón blanco expuestas a los hongos *Geotrichum sp1* y *sp2*

5.-MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material biológico:

5.1.1 Hongos:

En el presente estudio se emplearon dos cepas de hongos filamentosos aislados el verano de 1996 de tanques supralitorales del CIBNOR, que se desarrollaron como manchas blancas en las paredes y fondo de los estanques, lo que sugirió la presencia de los hongos (Sánchez-Paz, 1996). El aislamiento se realizó siguiendo los procedimientos descritos en Rose y Harrison (1987). Los hongos aislados fueron preservados en medio PDA (Frankland *et al.*, 1990) con glicerol 100 % (250 µl de glicerol + 250µl de muestra) y fueron almacenados a -80° C y -20° C (Kirsop y Doyle, 1991) para su identificación y los estudios que se describen a continuación:

Las dos cepas de referencia utilizadas fueron *Fusarium solani* (ATCC NUM 46940) (F-45) aislado de *Penaeus japonicus*, clave NRRL 22645 y *Fusarium javanicum* (CBS 420.76) (F-37) aislado de *Penaeus californiensis*. Clave NRRL 22237.

5.1.2 Camarones

Los camarones juveniles (entre 12 y 14 g) utilizados para la obtención de cultivos primarios de células fueron obtenidos del área de camaronicultura del CIBNOR. Las postlarvas (PL8) utilizadas en el experimento de supervivencia se obtuvieron de la producción comercial de la granja Acuacultores de la Península, S.A. (APSA).

5.2. Identificación y caracterización del crecimiento de los hongos aislados.

5.2.1 Identificación

La identificación se realizó considerando las características morfológicas de cada una de las cepas (Pitt y Hocking, 1997). Para ello, cultivos de 10 días, a temperatura ambiente, en medio M-1 (ver apéndice 1) fueron examinados macroscópicamente y microscópicamente. La observación macroscópica comprendió la medición del diámetro de colonia (mm), las características de la colonia (tipo de micelio), la localización de estructuras reproductivas (esporas) y la determinación del color de la colonia (Pitt y Hocking, 1997). El análisis microscópico se realizó con ayuda de un microscopio de contraste de fase NIKON Optiphot-2 para observar hifas y esporas (Tortora *et al.*, 1992). Las características de las cepas fueron comparadas con las descritas en la literatura, así como con fotografías obtenidas de Internet.

5.2.2 Crecimiento

Para evaluar el crecimiento de las cepas se usó el medio M-1 de acuerdo a Hernández (1990). El cultivo se realizó en matraces Erlenmeyer de 125 ml, los cuales contenían 25 ml de medio de cultivo. Los matraces se incubaron a 25 °C con agitación constante (110 rpm). Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos hasta alcanzar la fase estacionaria de las cepas (Gray *et al.*, 1963; Grigoroba y Norris, 1990; Dahot, 1993). De cada muestra, el micelio fue recuperado del medio de cultivo por filtración en papel Whatman No. 1 (a peso constante) y

lavado con agua destilada. Posteriormente, se colocó por 24 h a 80° C y se pesó en una balanza analítica para obtener el peso seco de la muestra.

5.3.-Obtención de cultivos primarios de células de camarón blanco.

Para llevar a cabo la determinación de la toxicidad y capacidad de adhesión de los hongos se obtuvieron cultivos primarios de células de camarón de diferentes tejidos (tegumento, branquia, intestino y hemocitos) como se describe a continuación:

5.3.1 Cultivos primarios de intestino, branquias y tegumento. Ver figura 2

Para los experimentos, 200 µl de suspensión de células de branquia, intestino y tegumento de camarón (2.0×10^5 células / ml) fueron colocados separadamente por triplicado en placas de 96 pozos para obtener la capa semiconfluente de cultivo primario.

Los cultivos primarios (100 µl) fueron contabilizados con un hematocitómetro en un microscopio de contraste de fase Nikon, Optiphot-2, empleando azul de Tripan para corroborar su viabilidad (ver apéndice 1).

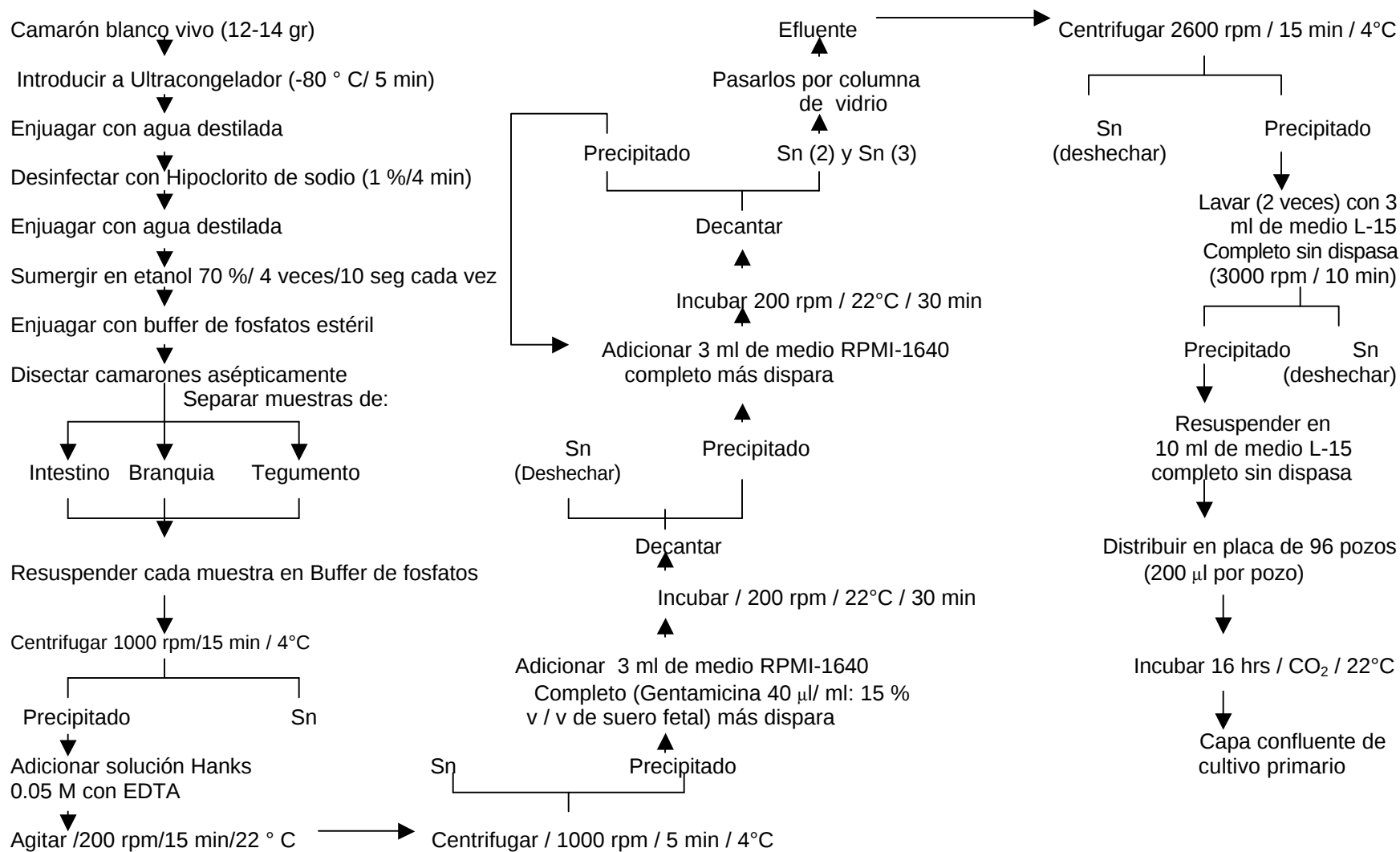


Fig. 2 Diagrama de flujo para la obtención de cultivo primario branquia, intestino y tegumento de camarón.(modificado de Jackson *et al.*, 1993; Fuerst *et al.*, 1991).

5.3.2 Cultivos primarios de hemocitos.

Se extrajo hemolinfa de camarones juveniles (peso entre 12 y 14 g) usando una jeringa de 1 ml por punción en la base de los pleópodos del primer segmento abdominal cerca del poro genital. Como anticoagulante, se usó solución salina isotónica a 4° C, en una proporción de 2:1 (2 volúmenes de anticoagulante por cada volumen de hemolinfa extraída de acuerdo a Hernández *et al.*, 1996). La hemolinfa fue colocada en tubos de ensaye de vidrio y mantenida en baño de hielo a 4 °C.

Los hemocitos (100 µl) fueron contabilizados con un hematocitómetro en un microscopio de contraste de fase Nikon, Optiphot-2, empleando azul de Tripan para confirmar viabilidad (ver apéndice 1). Posteriormente, 100 µl de suspensión de células de hemocitos de camarón (2.4×10^5 células/ml) fueron colocados en cada pozo de una placa de 96 pozos adicionándosele 9 ml de medio de cultivo L-15 completo. Posteriormente las placas se incubaron durante 16 h a 22°C en una incubadora de CO₂ (Marca Shel-Lab, VWR 1810) para obtener los cultivos primarios de hemocitos.

5.4. Ensayo de citotoxicidad de *Geotrichum sp1* y *Geotrichum sp2*.

El ensayo de citotoxicidad se realizó de acuerdo a Varughese *et al.*, (1999). Para ello se usaron placas de 96 pozos que contenían cultivos primarios de células de camarón, lavadas con 250 µL de PBS y tratadas con 100 µL de cada preparación citotóxica a probar.

En total se probaron 2 preparaciones obtenidas de cada cepa de hongo como se describe en la Fig. 3, denominadas Sobrenadante (Sn) y Sonicado (Son)

para cada una de las cepas y los sobrenadantes de las toxinas de *Vibrio cholerae*, *V. parahemolyticus* y *V. Alginolyticus*, los cuales fueron usados como posibles controles positivos, ya que se sabe que estas bacterias producen metabolitos tóxicos capaces de causar un efecto dañino en el camarón (Aguirre *et al.*, 2003). Los sobrenadantes fueron obtenidos en el laboratorio de patogénesis marina del CIBNOR.

Las placas de cultivos primarios con las toxinas y los extractos fúngicos se incubaron en atmósfera de CO₂ por 2 h a 37° C. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS y se agregaron 50 µL de metanol absoluto frío a cada pozo, dejando reposar por 2 min para luego secar al aire. Posteriormente, cada pozo se tiñó con 50 µL de cristal violeta en PBS por un periodo de 20 min y se lavó 3 veces con PBS para volver a secar al aire. Finalmente, se agregaron 200 µL de solución SDS (1 g de SDS en 50 ml de etanol) por 20 min. y se midió la absorbancia a 595 nm, en un lector de placa (BIORAD 3550-UV). Cada preparación se ensayó por triplicado en cada cultivo primario.(ver apéndice I para preparación de reactivos)

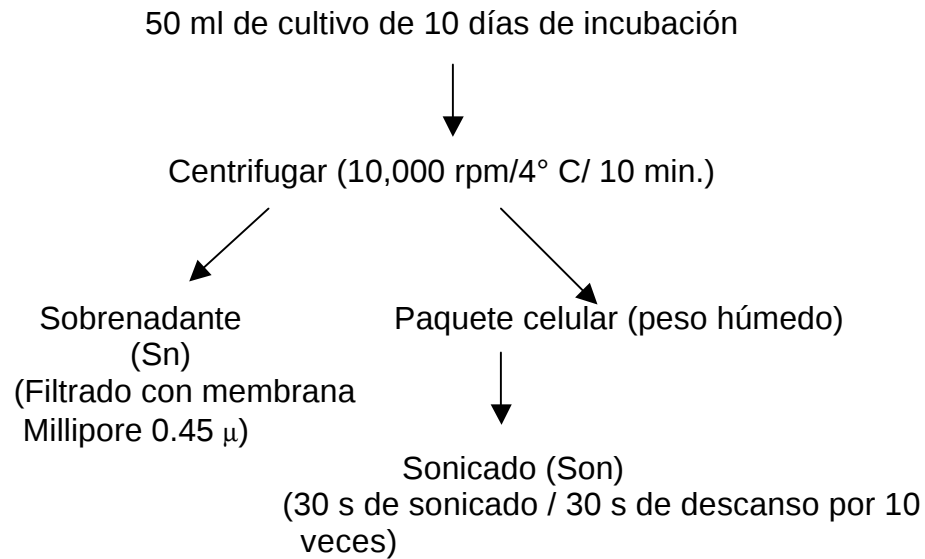


Figura 3. Diagrama de flujo para la obtención de los componentes Sn y Son de *Geotrichum sp1*, *Geotrichum sp2*, *Fusarium solani* y *F. javanicum*

5.5. Ensayo de adhesión de *Geotrichum sp1* y *sp2* a cultivo primario de células de camarón.

La capacidad de adhesión del micelio y esporas de *Geotrichum sp1* y *sp2* se evaluó conforme al procedimiento descrito por Guzmán-Murillo y Ascencio (2001). Para ello se usaron los cultivos primarios obtenidos previamente. El micelio y las esporas de los hongos fueron obtenidos de acuerdo al siguiente procedimiento:

5.5.1 Obtención del micelio.

Para la obtención de micelio se siguió el protocolo descrito por Franklin *et al.*, (1993). Ambas cepas de *Geotrichum* fueron cultivadas en medio M-1 líquido (pH 4.5) a temperatura ambiente en agitación constante (110 rpm). A los 5 días se tomó una muestra de cada cultivo y se ajustaron a una densidad óptica de 1.0 (Espectrofotómetro Beckman DU 640).

5.5.2 Obtención de esporas

Cada cepa se cultivó en medio M-1 agar inclinado (pH 4.5) en tubos de ensaye con 15 ml de medio de cultivo durante 10-12 días a 25 °C. Al final del periodo de incubación, las esporas se recuperaron introduciendo asépticamente 10 ml de una solución 0.15 M de Cloruro de sodio y 1% Tween 60. La solución se deslizó suavemente por toda la superficie del medio y se transfirió a un tubo estéril. Este proceso de recuperación se repitió 5 veces y las esporas recuperadas en la solución se contaron en un Hematocímetro. La presencia de esporas fue verificada con tinción de esporas con Verde de malaquita (Apéndice I). Para el ensayo de adhesión se utilizaron alícuotas de 100 μl con 1×10^4 de esporas / ml^{-1} (Hewitt y Vincent, 1989).

5.5.3 Marcaje de los hongos.

Las estructuras de los hongos (micelio y esporas) fueron marcados con biotina de acuerdo con Harlow y Lane (1988). Se prepararon 15 ml de la suspensión micelial a una densidad óptica de 1.0 y una suspensión de esporas a 1×10^7 esporas / ml^{-1} en amortiguador 0.1 M de NaHCO_3 , pH 8.0. Posteriormente estas preparaciones se centrifugaron a 6,000 rpm durante 5 min. a 22°C, descartándose el sobrenadante. El concentrado celular se resuspendió en 1 ml de amortiguador de bicarbonato, adicionándosele 100 μl de una solución de biotina (1.3 mg de Biotina N-hydroxisuccimida en 1.0 mL de DMSO) y se incubó durante 2-3 horas a 22° C en oscuridad, con agitación manual cada 30 minutos.

Posteriormente, se adicionaron 9 ml de PBS y se centrifugó a 6,000 rpm durante 20 min a 22° C. Finalmente, las esporas y el micelio se resuspendieron en 2.5 ml de PBS y se almacenaron en oscuridad a 4° C hasta su uso.

Los datos de absorbancia fueron normalizados a través de sus logaritmos, para realizar un análisis de varianza de 2 vías. Se tomaron el tipo de cultivo primario y las toxinas, como los factores del análisis, y la absorbancia como la variable dependiente. La normalidad fue evaluada mediante un análisis de Kolmogorov-Smirnov y la homocedasticidad mediante una prueba de Bartlett. Cuando se encontraron diferencias significativas, se aplicó un análisis de Tukey (Zar, 1996)

5.5.4 Bioensayo de adhesión

Se usaron placas de 96 pozos con cultivos primarios de los tejidos de camarón. Los cultivos primarios fueron fijados con glutaraldehído 2.5 % (a cada pozo se le pusieron 100 µl y se enjuagó con PBS). A cada pozo se le adicionaron 100 µl de la suspensión de esporas o micelio marcados con biotina, como se describió anteriormente, y se incubaron durante 0, 30, 60 y 180 min. Posteriormente, las placas fueron lavadas 3 veces con una solución de PBS más tween 20 (0.1 %) para remover células no adheridas. A cada pozo se le adicionaron 100 µL de estreptoavidina-POD (1 µL en 2 mL PBS) y se incubó por 90 min a 37° C. Posteriormente los pozos se lavaron 3 veces con PBS-tween 20 y se agregaron 100 µL de Orto-fenil-diamino (2 mg/12 ml citrato de sodio + 5 ml de H₂O₂). Las placas fueron incubadas en oscuridad a temperatura ambiente durante 20 min. La

reacción fue detenida agregando ácido sulfúrico 1 M y la absorbancia fue medida a 490 nm en un lector de placa (BIORAD 3550-UV).

Se realizó un análisis de varianza de 4 vías con los datos de absorbancia normalizados, a través de sus logaritmos, tomando el tipo de cultivo primario, el tipo de inóculo, la cepa y el tiempo de exposición, como los factores del análisis, y la absorbancia como la variable dependiente. La normalidad fue evaluada mediante un análisis de Kolmogorov-Smirnov y la homocedasticidad mediante una prueba de Bartlett, Cuando se encontraron diferencias significativas, se aplicó una prueba de Turkey (Zar, 1996)

5.6 Determinación de la producción de amilasa, lipasa, proteasa y quitinasa

La producción de enzimas extracelulares se evaluó en las cepas de *Geotrichum sp1* y *Geotrichum sp2* aisladas y en las cepas de colección *Fusarium solani* (ATCC NUM 46940) y *Fusarium javanicum* (CBS 420.76), de acuerdo a los siguientes procedimientos:

5.6.1 Amilasa

La evaluación se realizó en cajas Petri con medio de cultivo M-1 modificado (Glucosa 0.4 %, peptona 0.2 %, extracto de levadura 0.5 %, Agar 4 %) más 1% de almidón. Los hongos se inocularon por picadura y las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente por 48 h. Al final de este periodo, fueron reveladas con 3 ml de lugol fresco (Cristal de Yoduro 3.3 g, Yoduro de Potasio 6.6g, disueltos en 1 litro de agua destilada) y se midió el halo de hidrólisis presente en las cajas (Nolasco y Tovar, 1998; Pierce y Leboffe, 2003).

5.6.2 Lipasa

La evaluación se realizó en cajas de Petri con medio de cultivo M-1 modificado más Tween 80 (0.5 %) y 10 mM cloruro de calcio. Los hongos se inocularon por picadura y las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente por 48 hrs. Al final de este periodo se observó la formación de precipitados alrededor de la colonia, lo que se considera como prueba positiva (Nolasco y Tovar, 1998).

5.6.3 Proteasa.

La evaluación se realizó en cajas Petri con medio de cultivo M-1 modificado, más caseína 1 % parcialmente hidrolizada (La caseína se hidrolizó parcialmente, agregando 3 gotas de NaOH más agua destilada 30 min. en baño María en ebullición). Los hongos fueron inoculados por picadura y las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente por 72 hrs. Al final de este tiempo se midió el halo de hidrólisis. (Nolasco y Tovar, 1998; Pierce y Leboffe, 2003)

5.6.4. Quitinasa.

La evaluación se realizó en cajas Petri con medio de cultivo M-1 modificado más 3% de quitina coloidal. Los hongos se inocularon por picadura y las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente por 72 hrs. Al final de este tiempo se midió el halo de hidrólisis (Nolasco y Tovar, 1998).

5.7 Efecto de *Geotrichum sp1* y *sp2* en la supervivencia de post-larvas de camarón.

La supervivencia de postlarvas de camarón fué evaluada usando dos tratamientos: a) expuestas a suspensión micelial y b) expuestas al sobrenadante del cultivo.

5.7.1 Obtención de la suspensión micelial:

Las cepas fueron cultivadas en medio líquido M-1, en matraces de 125 ml, conteniendo 25 ml de medio, durante 3 días (fase logarítmica de crecimiento) a temperatura ambiente en agitación de 110 rpm. Posteriormente, se ajustó la suspensión celular a diferentes densidades ópticas: 0.001, 0.1, 0.25, 0.5 a 540 nm con solución salina.

5.7.2 Obtención de sobrenadante del cultivo.

Las cepas fueron cultivadas en medio líquido M-1, en matraces de 125 ml, conteniendo 25 ml de medio, durante 10 días, (fase estacionaria) a temperatura ambiente y en agitación a 110 rpm. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 10,000 rpm a 4°C durante 10 min, obteniéndose el sobrenadante correspondiente y el sedimento.

5.7.3. Bioensayo de supervivencia :

La supervivencia fué evaluada durante la exposición directa de las poslarvas al micelio y al sobrenadante del medio de cultivo. El micelio fue preparado a diferentes densidades ópticas: 0.5, 0.25, 0.1 y 0.01 a 540 nm, (Wang, 1979).

Las post-larvas de camarón fueron trasladadas a las instalaciones del CIBNOR, en bolsas de polietileno con agua de mar. A su llegada fueron aclimatadas durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente fueron colocadas en placas de 6 pozos de fondo plano de poliestireno, (BD Falcon) las cuales contenían 5 ml de agua de mar estéril. En cada pozo se colocaron 20 postlarvas y se agregaron 8 ml de la suspensión micelial o del sobrenadante por triplicado. El

volumen final del pozo fue ajustado a 15 ml, con agua de mar estéril. Como controles se usaron postlarvas de camarón colocadas en las mismas condiciones que los experimentos pero, conteniendo únicamente agua de mar estéril y larvas a las que se le adicionó medio de cultivo. Se hicieron observaciones cada 2 h por un periodo de 24 h, en un microscopio estereoscópico a 5X de aumento (SP Southern Precision 1839). Todas las placas se mantuvieron con tapa durante el experimento de acuerdo con Sainz *et al.*, (1998).

6.-RESULTADOS

6.1 Identificación y caracterización del crecimiento de los hongos aislados

6.1.1 Identificación.

Como se aprecia en las figuras 4 y 5, las cepas presentaron morfologías semejantes. Ambas cepas presentaron colonias de apariencia seca y polvosa. Sus hifas eran anchas (2.5 –10 μm), ramificadas en la punta, septadas y expandidas perpendicularmente. Las puntas de la hifas presentaban de 2 ó 3 ramificaciones (Fig. 4 y 5). La ramificación principal era más ancha (7-10 μm) que las ramificaciones laterales (2.5-4.0 μm). Estas últimas presentaron desarticulación temprana (en forma de zigzag) en las artrosporas. Debido a lo anterior, ambas cepas fueron identificadas como pertenecientes al género *Geotrichum* (Whiteside *et al.*, 1988; Tortora *et al.*, 1992; Pitt y Hunking, 1997; Kurtzman y Robnett, 1998) y fueron denominadas como *Geotrichum sp1* y *Geotrichum sp2*. Las características de ambas cepas se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Descripción Morfológica de las cepas aisladas y de *Fusarium solani*

Característica	<i>Geotrichum sp1</i>	<i>Geotrichum sp2</i>	<i>Fusarium solani</i>
Diámetro de colonia	> de 45 mm	>de 45 mm	60-65 mm
Color de la colonia (fase estacionaria)	Negro	Negro	De blanca a crema
Aspecto del micelio	Algodonoso, hialino	Algodonoso, hialino	Algodonoso
Tipo de espora	Artrospora, de cilíndrica a tableada 3-6 x6-12 μm	Artrospora, de cilíndrica a tableada 3-6 x6-12 μm	Macro conidia (forma de media luna) de 3-4 conidias
Tipo de hifa	Septada	Septada	Septada

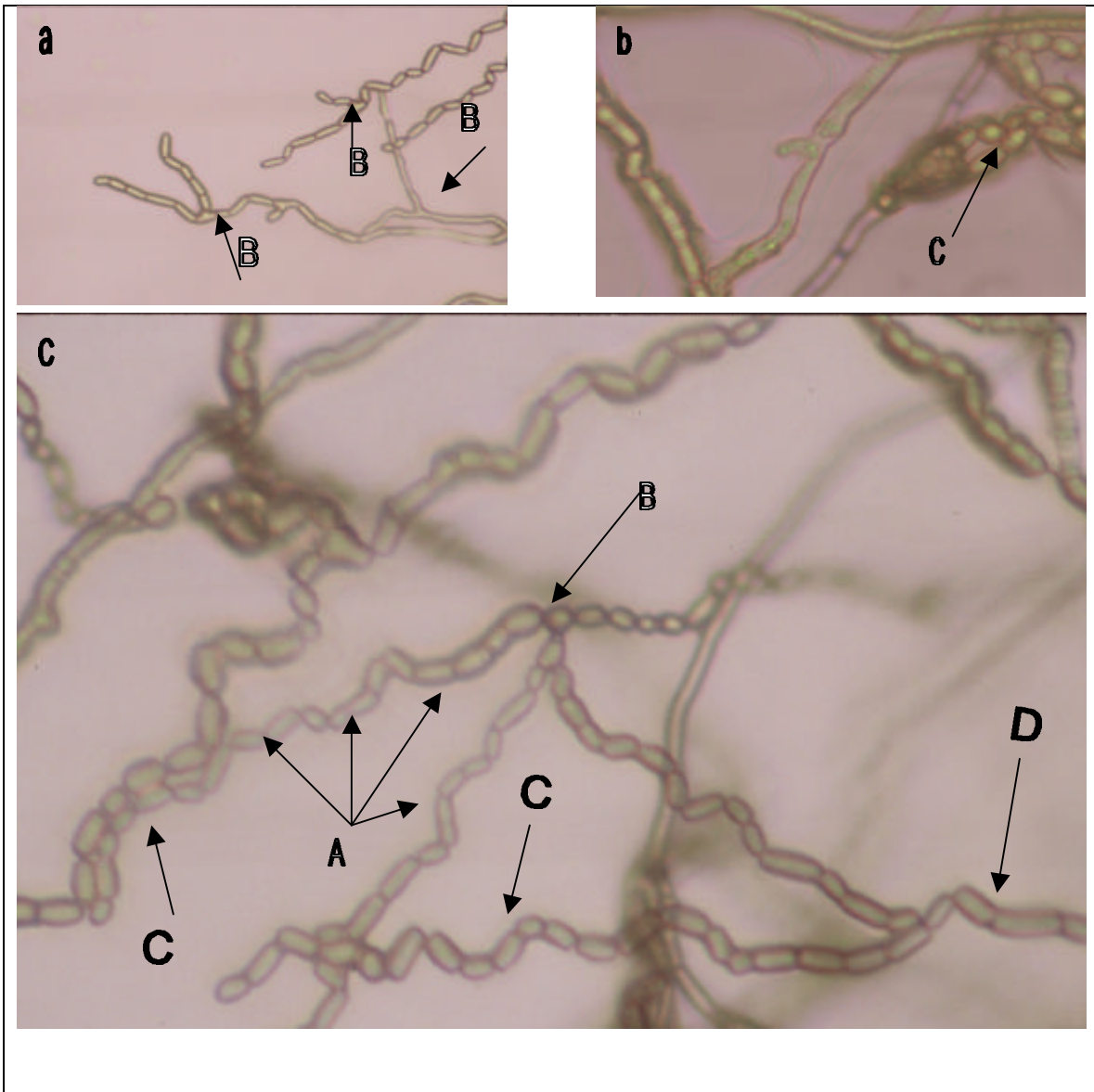


Figura 4. Características morfológicas de *Geotrichum sp1*. Fotografías en contraste de fases 100 x. A: Indica el acomodo en zig-zag de las esporas B: Muestra la punta de la hifa con 2 o 3 ramificaciones. C: Espora D: Septo de la hifa

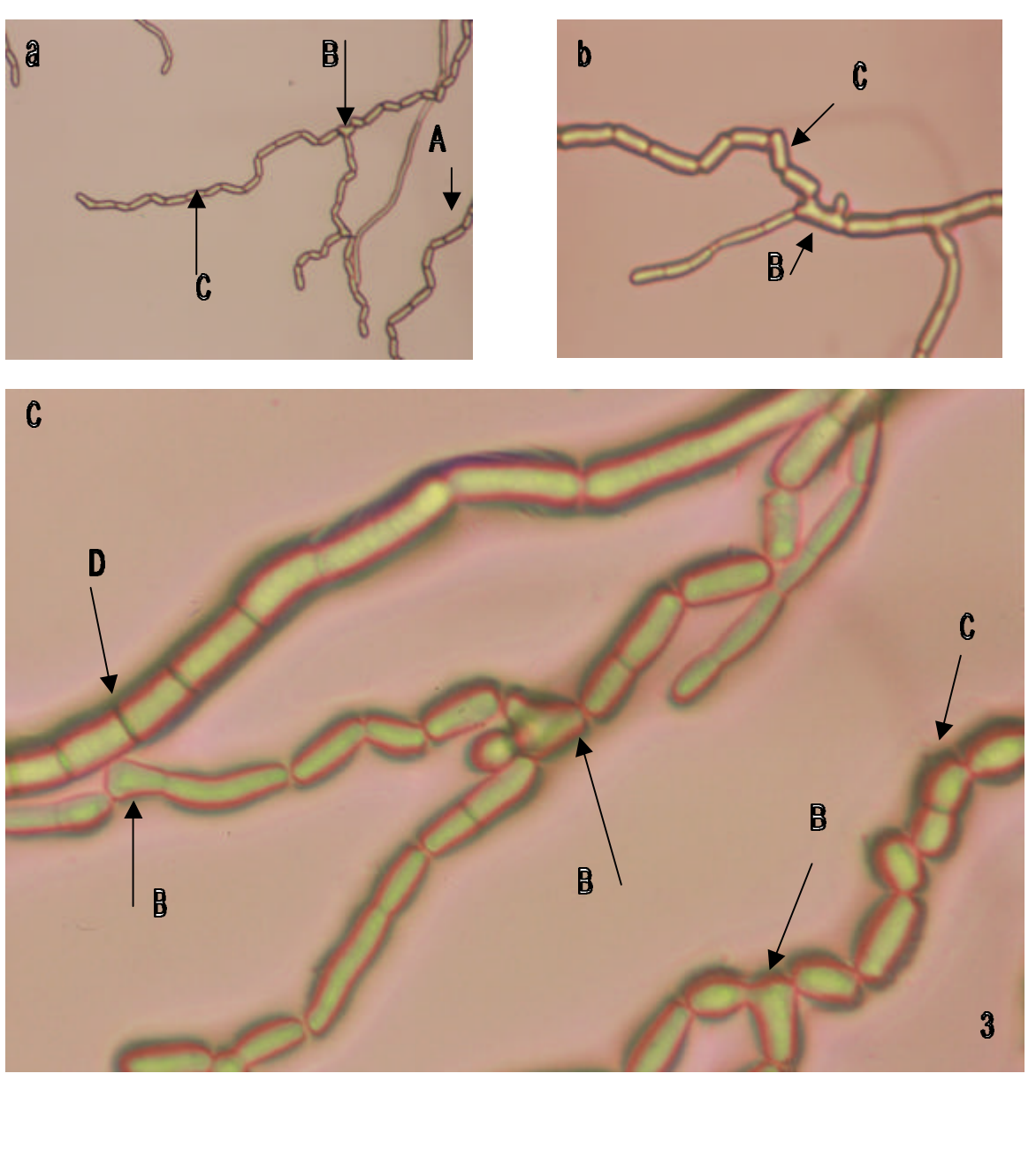


Figura 5. Características morfológicas de *Geotrichum sp2*. Fotografías en contraste de fases 100x. A: Indica el acomodo en zig-zag de las esporas
 B: Muestra la punta de la hifa con 2 o 3 ramificaciones. C: Espora
 D: Septo de la hifa

6.1.2. Crecimiento.

En ambas cepas se observó la misma tendencia de crecimiento, lo que permitió trabajar en condiciones semejantes en relación a los tiempos de incubación. La fase de crecimiento exponencial se presentó entre el día 1 y 2 de incubación y terminó entre el día 3 y 4 (Fig. 6). Se consideró la fase estacionaria del cultivo a partir del día 7 (Fig. 6). Los tiempos de cosecha de micelio y esporas se fijaron en 3 y 10 días de incubación respectivamente.

El crecimiento de ambas cepas se ajustó al modelo logístico: $y = K \cdot (1 + Ae^{-bx})^{-1}$. El crecimiento de la cepa *Geotrichum sp1* se ajustó con un $R = 0.9926$ a la ecuación $y = 10.59 \cdot (1 + (12.416e^{-1.190x}))^{-1}$ y la cepa *Geotrichum sp2* se ajustó con un $R = 0.9949$ a la ecuación, $y = 10.57 \cdot (1 + (15.69e^{-1.099x}))^{-1}$. Se observaron algunas diferencias entre las cepas respecto a su velocidad de crecimiento siendo la cepa *Geotrichum sp1* la de mayor crecimiento. (Fig. 6).

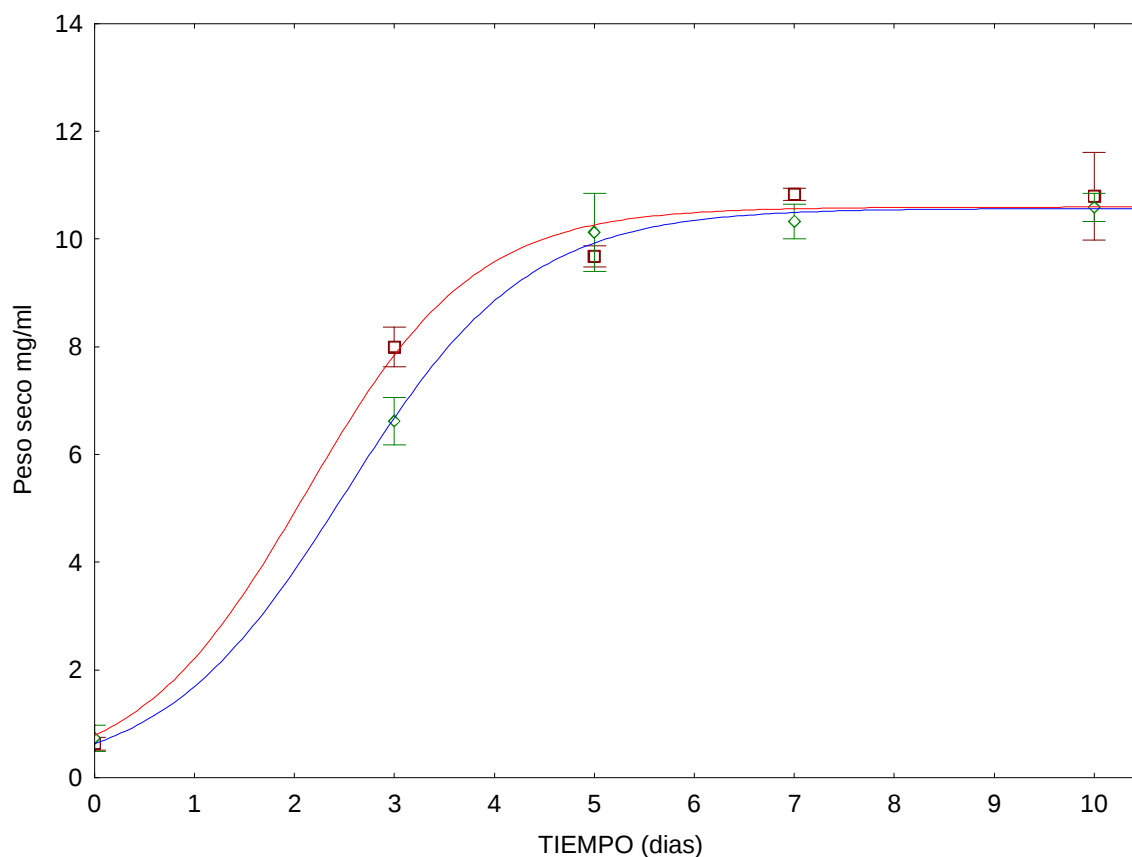


Figura 6 Cinética de crecimiento de *Geotrichum* sp1 (□) y *Geotrichum* sp2 (◇). Los datos corresponden a la media con el intervalo de confianza al 95 %. Las líneas representan el crecimiento teórico aplicando el modelo logístico (ver texto).

6.2 Citotoxicidad de *Geotrichum* sp1 y *Geotrichum* sp2

Se observaron diferencias significativas en la citotoxicidad de los extractos a cada tipo de cultivo primario ($p < 0.001$ los resultados del análisis de varianza, así como de las pruebas de Tukey se muestran en el anexo 2) excepto con los cultivos primarios de branquia e intestino ($p > 0.94$). En el cultivo primario de los hemocitos se observó un efecto citotóxico mayor.

El extracto sonificado y el sobrenadante del cultivo de *Geotrichum* sp1, presentaron un mayor efecto citotóxico en el cultivo primario de hemocitos

respecto a los otros cultivos (Fig. 7). Al realizar el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas en el número de hemocitos muertos respecto a otros tejidos ($p < 0.001$). Igualmente el Sn y el Sonicado de *G.sp1* presentaron un efecto mayor que las toxinas control de *Vibrio cholera*, *V. parahemoliticus* y *V. alginoliticus*. En el cultivo primario de branquias y de intestino no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) respecto al daño (número de células muertas detectadas) ocasionadas por las preparaciones usadas, además de que fueron las menos dañadas (menor número de células muertas detectadas).

Los hemocitos fueron las células más afectadas por el extracto sonicado y el sobrenadante de *Geotrichum sp2* ($p < 0.001$) (Fig. 7). El extracto sonicado, tuvo un mayor efecto en los cultivos primarios de hemocitos que los otros extractos. Para el cultivo primario del tegumento se encontró que las preparaciones que más lo afectaron fueron las de la cepa *Geotrichum sp2* y éstas a su vez, fueron más agresivas que las toxinas control; es decir, mataron mayor número de células. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las diluciones preparadas con el extracto o sobrenadante.

En general los cultivos primarios de branquias y de intestino, fueron las menos afectadas por las soluciones probadas.

El cultivo primario de hemocitos fue el más afectado por los extractos de *Fusarium* (F-37 y F-45) (Fig. 7). No se encontraron diferencias significativas entre las soluciones de F-37 y las toxinas control, en los diferentes cultivos primarios probados. Con la cepa F-45 se observó un mayor efecto del sonicado, sobre los cultivos primarios de hemocitos, que con los controles positivos.

Con la cepa F-45, no se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) en el efecto que provocan sus extractos en los cultivos de intestino, branquia y tegumento

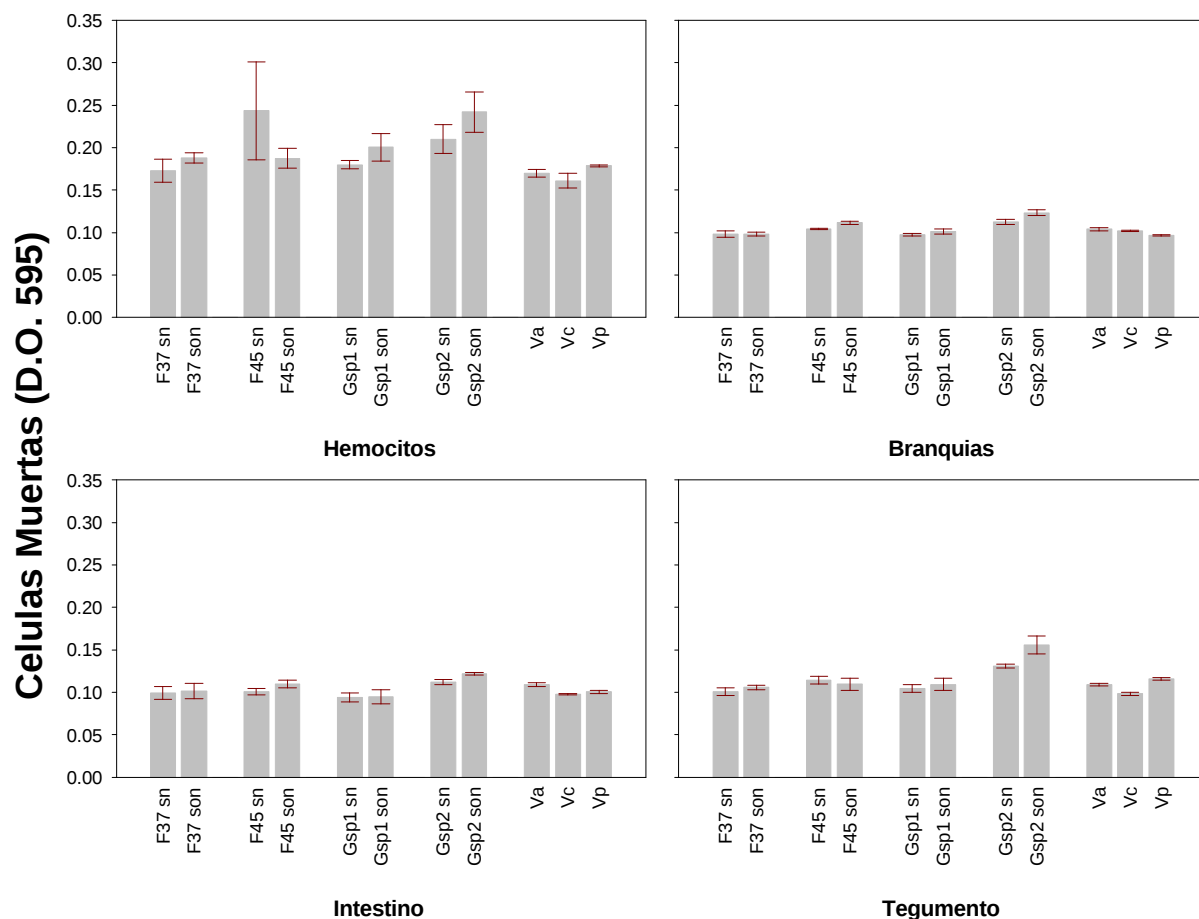


Fig. 7 Citotoxicidad de las cepas: *Geotrichum* sp1, *Geotrichum* sp2, F-37 y F-45, en cultivo primario de camarón blanco (*L.vannamei*).

6.3 Adhesión de *Geotrichum* sp1 y sp2 a células de camarón

Se observaron diferencias significativas en la adhesión de las cepas a cada tipo de células probadas ($P < 0.001$. Los resultados del análisis de varianza, así como de las pruebas de Tukey se muestran en el anexo 3), excepto entre intestino y branquia ($P > 0.66$). Con los hemocitos se observó una mayor adhesión.

Se observaron diferencias significativas entre el nivel de adhesión de los filamentos y las esporas ($P < 0.001$), de las cepas de *Geotrichum* aisladas. En

ambos casos las esporas presentaron un nivel de adhesión menor que los filamentos .

Se observó un incremento significativo, en la adhesión de los filamentos de ambas cepas conforme transcurrió el tiempo ($P < 0.001$). Excepto en el intervalo de 30 y 60 minutos de exposición en ambas cepas ($P > 0.95$).

Comparando la adhesión de esporas y filamento de ambas cepas, no se encontraron diferencias significativas entre las esporas ($P > 0.9$), pero sí se encontraron diferencias entre los filamentos ($P < 0.001$).

La cepa *Geotrichum sp2* presentó una adhesividad significativamente mayor, que la cepa *G. sp1* ($P < 0.001$). Las esporas de ambas cepas no presentaron diferencia significativa, con respecto a los diferentes cultivos primarios usados en el transcurso del tiempo ($p > 0.056$), pero se observó un ligero incremento en la adhesión de las esporas con el cultivo primario de los hemocitos. (Fig. 8 A)

Se observaron diferencias significativas en la adhesión presentada por los filamentos de la cepa *Geotrichum sp2* ($p < 0.01$), a medida que transcurrió el tiempo y ésta fue mayor ante el tejido primario de los hemocitos (Fig. 8 B).

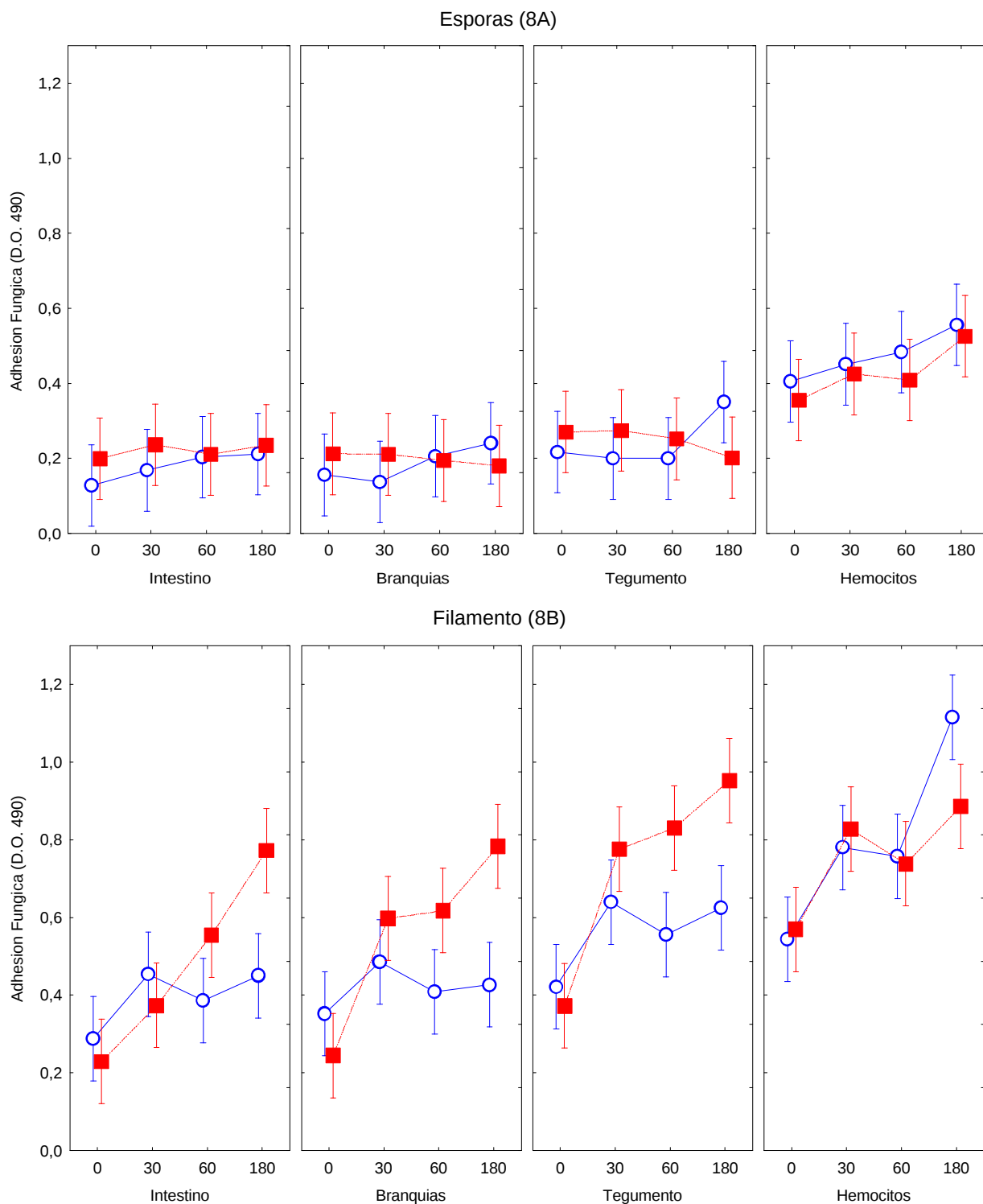


Fig 8 Adhesión de las cepas *Geotrichum sp1* (○) y *Geotrichum sp2* (■) en cultivo primario de intestino, branquia, tegumento y hemocitos de camarón blanco (*L. vannamei*)

6.4 Determinación de la presencia de algunas enzimas producidas por los hongos aisladas y de referencia.

Con las cuatro cepas probadas se observó la producción de amilasa y lipasa y todas fueron negativas en la prueba de quitinasa. A diferencia de las otras, la cepa *Geotrichum sp2* no resultó positiva a la presencia de proteasas (Tabla 2). Las imágenes de las placas, indicando esta reacción aparecen en el anexo 1.

Tabla 2. Actividad enzimática de hongos del género *Geotrichum* y cepas *Fusarium*. Los datos corresponden a la media y la desviación estándar aparece en paréntesis.

Cepa	Amilasa*	Lipasa**	Proteasa*	Quitinasa*
<i>Geotrichum sp1</i>	1.36 (0.17)	+	0.63 (0.05)	-
<i>Geotrichum sp2</i>	0.27 (0.075)	+	-	-
F-37	2.83 (0.17)	+	1.83 (0.038)	-
F-45	1.53 (0.05)	+	3.16 (0.34)	-

* Halo de hidrólisis (mm)

**Presencia de precipitados alrededor de la colonia

6.5 Determinación de la supervivencia de larvas de camarón expuestas a los hongos aislados y de referencia.

Para la cepa *Geotrichum sp1* se pudo preciar que el Sn afectó las larvas, observándose una mortalidad del 25% a las 7 hrs y del 100% a las 20 hrs (Ver anexo 4). La dosis más baja (0.01nm) afectó minimamente a los organismos, observándose un 90 % de supervivencia hasta el final del experimento (ver tabla 3). Las restantes dosis (0.5, 0.25 y 0.1nm) afectaron la supervivencia de las larvas causando el 60 % de mortalidad, a partir de las 7 hrs de contacto.

Tabla 3. Datos de porcentaje de supervivencia de larvas PL8 de camarón blanco, expuestas a las cepas de: *Geotrichum sp1*, *Geotrichum sp2*, F-37, y F-45, por un periodo de 24 horas. Los datos corresponden a la media y la desviación estándar aparece en paréntesis.

Tratamiento	<i>Geotrichum sp1</i>	<i>Geotrichum sp2</i>	F-37	F-45
Sn	0 (0)	1,66 (2.88)	0 (0)	0 (0)
0.5 DO	3,33 (2.88)	6.66 (2.88)	0 (0)	3.33 (2.88)
0.25 DO	11,66 (7.63)	61.66 (16.07)	16.66 (20.81)	26.66 (7.63)
0.10 DO	15 (5)	96.66 (2.88)	65 (8.66)	71.66 (7.63)
0.01 DO	90 (13.22)	96.66 (2.88)	66.66 (14.43)	50 (45)
Testigo	83,33 (5.77)	100 (0)	46.66 (20.20)	5 (5)
Medio de cultivo puro	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Para la cepa *Geotrichum sp2*, el Sn mostró efecto a las 5 hrs de contacto (20% de mortalidad). El 100% de mortalidad fue observado a las 16 hrs (ver anexo 4). Para esta cepa se apreció que la DO más alta (0.5 nm) fue la que más afectó la supervivencia de las larvas (efecto a partir de las 7 hrs de contacto) con mortalidades mayores del 55%; las DO restantes fueron menos agresivas. Por ejemplo, a una DO 0.25 nm se presentó una supervivencia al final del experimento del 61 %, mientras que las diluciones 0.1 y 0.01 de DO afectaron a las larvas induciendo un 3.64 % de mortalidad durante el experimento (ver tabla 3).

El Sn de las cepas de *Fusarium* (ver anexo 4) fue más agresivo. Ambas cepas presentaron mortalidades del 100 % en tan solo 2 hrs de contacto.

En relación al efecto de las DO utilizadas para la cepa F-37 se observó que la preparación de DO 0.5 nm produjo una mortalidad del 80 % a las 2 hrs de contacto. La preparación con una DO de 0.25 nm mostró su efecto a las 10 hrs de contacto (80 % de mortalidad) y las restantes un 40% de mortalidad. Para la cepa F-45 observamos que una preparación de DO de 0.5 nm afectó también a las larvas en un 80 % a las 2 hrs mientras que una preparación de una DO de 0.25 nm las afectó en un 65 % en 10 hrs. Las demás soluciones afectaron la supervivencia en un máximo del 50 % hasta el final del ensayo (ver anexo 4 y tabla 3).

7.-DISCUSIÓN

Para el presente trabajo se aislaron 2 cepas de hongos que se desarrollaron, en los estanques de cultivo de agua marina del CIBNOR en el verano de 1996. Tomando en cuenta su origen, las cepas fueron cultivadas en medio de cultivo M-1, recomendado por Hernández, (1990) para cultivar levaduras de origen marino. En este medio las cepas crecieron y se desarrollaron favorablemente lo cual no es de sorprender si consideramos que las levaduras y los hongos tienen requerimientos nutritivos y físicos muy semejantes (Javor, 1989). Por otro lado, como se desconocía el verdadero origen de las cepas, también se sembraron en medio con agua destilada, resultando que los hongos aislados tienen la facultad de crecer en medios tanto de agua dulce como agua de mar, lo que nos permitió definirlos como hongos marinos facultativos.

De acuerdo a la literatura, la identificación taxonómica de los hongos se realiza de dos formas: una, considerando su morfología macroscópica y microscópica y otra, más actualizada, usando herramientas moleculares (Austin, 1993; O'Donnell, 1996 y Kurtzman y Fell, 1999). Para la identificación de las cepas en estudio se consideraron las propiedades morfológicas, es decir, la apariencia de la colonia y sus estructuras reproductivas, lo que permitió identificar a las cepas dentro del género *Geotrichum*. Cabe señalar que autores como Pagnocca y *etal.*, (1989), así como Kurtzman y Fell (1999), describen al género *Geotrichum*, como un organismo “parecido a una levadura” es decir, que se comporta como levadura o como hongo filamentoso. En nuestro estudio ambas cepas siempre se comportaron como hongo filamentoso.

Una vez lograda la identificación de las cepas se realizó una búsqueda en la literatura acerca del comportamiento de género *Geotrichum*, como agente patógeno, así como de su origen, encontrándose que, efectivamente, es de origen terrestre (Kutzman y Fell, 1999) pero que también se comporta como marino facultativo (Pagnocca et al., 1989). Este género se encuentra reportado como agente causal de enfermedades de frutas y verduras. En los cítricos es causante de la enfermedad llamada pudrimiento agrio, que constituye cuantiosas pérdidas para la agricultura. Igualmente, en la ganadería se encuentra reportado como agente causal de enfermedades en animales de granja como vacas y cerdos; desafortunadamente, en todos estos casos no se describen los mecanismos de acción (Rose y Harrison, 1987). Para camarón, o crustáceos, no se encontró ningún reporte que lo indicara como agente causal de enfermedades. Tomando en cuenta lo anterior, presumimos que este género posee la capacidad de ser agente patógeno oportunista, en determinadas situaciones.

Para determinar si las cepas de *Geotrichum* aisladas son agentes patógenos para el camarón, se trabajó por una parte con cultivos primarios de camarón, de intestino, branquia, tegumento y hemocitos, considerando las ventajas que este tipo de técnicas ofrece tales como: controlar los factores físico químicos (pH, temperatura, niveles de CO₂, etc..) y fisiológicos (factores de crecimiento, densidad celular, etc..) en la mayoría de los casos; homogeneidad de las muestras; economía por la cantidad de reactivos empleados y no menos importantes, las motivaciones éticas (disminución en la cantidad de animales sacrificados) (Reina, 2004). Por otra parte, se trabajó con postlarvas (PL8)

tomando en cuenta lo reportado por autores como Porter (1985) y Noga (1990), quienes encontraron que los huevos y las larvas son los estadios más susceptibles de ser atacados por hongos filamentosos.

Toxinas

Las vías que un parásito emplea para infectar un hospedero son diversas y muy variadas. Estas pueden ser a través de su adhesión a los tejidos, la liberación de toxinas al medio, la invasión, la acción enzimática (Atlas, 1984).

Las toxinas juegan un papel muy importante dentro de los factores de virulencia de varios microorganismos patógenos debido a que en algunos casos el patógeno no requiere penetrar al hospedero para causarle daño, solo excreta las toxinas y al entrar en contacto con el organismo le causa un daño severo. Autores como Atlas (1984), por ejemplo, reportan para los hongos toxinas muy potentes y extremadamente tóxicas para humanos y animales. Alderman y Polglase (1986), Bachere (2000) y Alavandi (2004), reportan al género *Fusarium* como productor de toxinas capaces de causar altas mortalidades en nauplios, protozoeas, juveniles y adultos de camarón cultivado. En nuestro estudio, el efecto citotóxico de las cepas fue evaluado mediante el conteo indirecto de células muertas, determinado por la absorción del cristal violeta, derivada a su vez de la disrupción celular provocada por la exposición de los cultivos primarios a los extractos y sobrenadantes del medio de cultivo de las cepas.

El experimento de citotoxicidad, se llevó a cabo con un cultivo celular el cual presentó una viabilidad del 83 %. Al hacer una revisión bibliográfica a este respecto, se encontró que es aceptado trabajar con un mínimo de 80 % de células

viabiles para indicar que se tuvo éxito en la obtención del cultivo primario de células (Sigma, 1978).

Además de considerar que se trabajó con protocolos previamente reportados y documentados, como los de Fuerts y *et al.*, (1991), Kirsop y Doyle (1991), Jackson y *et al.*, (1993), y más reciente Walton y Smith (1999) en los que la obtención de cultivos primarios de células de los tejidos seleccionados se puede juzgar exitosa. Por su parte Walton y Smith (1999) describen la obtención de cultivo primario de hemocitos de crustáceos decápodos, los cuales se pueden mantener viabiles por un periodo de 14 días, así como la obtención de cultivo primario de tejido linfóide de *Penaeus vannamei* y *P. aztecus* mantenidos por 3-4 semanas con éxito. Kirsop y Doyle (1991), indican que para mantener en óptimas condiciones un cultivo celular es esencial mantenerlo en la fase logarítmica el mayor tiempo posible ya que, normalmente, las células animales se duplican en un periodo aproximado de 24-48 hrs. El mantener las células por periodos prolongados en la fase estacionaria causa perdida de su viabilidad (Kirsop y Doyle (1991). En nuestro estudio, los 4 cultivos primarios obtenidos fueron trabajados 16 hrs después de obtenidos, garantizándonos la viabilidad (observaciones confirmadas mediante el azul tripano) de la células sin haber llegado tal vez a un desdoblamiento en su número. Así mismo, los medios de cultivo utilizados fueron suplementados con antibiótico (Gentamicina 40 µg/ ml) para minimizar la contaminación bacteriana. Las condiciones de trabajo fueron bajo esterilidad (materiales, reactivos, área de trabajo) tal como lo marcan los trabajos antes mencionados. De igual manera, para verificar viabilidad se tiñeron las células con

azul tripano y se hicieron observaciones al microscopio observándose: células brillantes, como esferas luminosas, características de células viables (Kirsop y Doyle, 1991). Adicionalmente, el color del medio que contiene el cultivo primario puede ser usado como indicador de densidad celular y viabilidad. Por ejemplo un color rojo naranja determina un cultivo primario normal, mientras que un color amarillo indica que el cultivo se ha acidificado y probablemente las células ya se encuentran en la fase estacionaria y en declive (Kirsop y Doyle 1991). Estas características coinciden con lo observado en nuestro experimento, a las 16 hrs. de incubación en donde se apreció un color rojo-naranja.

Con los resultados de nuestros experimentos se pudo apreciar que las cepas de hongos de *Geotrichum* aislados tienen un efecto citotóxico significativo, sobre todo ante los cultivos primarios de hemocitos y tegumento (Fig 7). Ello es realmente preocupante si consideramos que las primeras barreras de defensa de los camarones en el estanque son el tegumento y los hemocitos. En este sentido, autores como Vargas-Albores y Yepiz-Plasencia (2000) por ejemplo, encuentran manchas pigmentadas de negro en la cutícula de un camarón al entrar en contacto con una infección fúngica. Esto como resultado del proceso de melanización, el cual es uno de los mecanismos de defensa que poseen los crustáceos al detectar material extraño en su entorno. En relación a los hemocitos, Bachere (2000) indica que el primer paso en el proceso de reconocimiento de microorganismos invasores en el camarón está mediado por los hemocitos y por proteínas plasmáticas, por lo que es claro que si los camarones tienen afectado su sistema de defensa primario, como son los hemocitos y el tegumento, su susceptibilidad al

ataque por este tipo de organismos es enorme. Lo anterior sin tomar en cuenta el hecho de que también habitan en este nicho ecológico bacterias y virus potencialmente patógenos para los cultivos.

ADHESIÓN:

en este experimento se trabajó con un cultivo celular, con una viabilidad inicial del 83 % aproximadamente. Sin embargo, para mejor viabilidad del estudio las células fueron fijadas con glutaraldehído. La adhesión como factor de virulencia ha sido estudiada ampliamente en lo que a bacterias patógenas se refiere (Bustos, 2000). Por este mecanismo existe el riesgo de que el microorganismo empiece a colonizar y llegue a desencadenar un problema serio para el hospedero (Archer *et al.*, 1988). Muchos estudios se han enfocado a tratar de entender los procesos de interacción hospedero-patógeno, con la finalidad de identificar los receptores del hospedero con los cuales tiene afinidad el patógeno (Klemm, 1985, Guzmán-Murillo y Ascencio, 2001). En este trabajo se observó que los filamentos de ambas cepas de *Geotrichum* presentaron una adhesión significativamente mayor que sus esporas ($P < 0.001$). Esta diferencia de adhesión puede deberse a que los filamentos son estructuras en desarrollo, es decir, en constante crecimiento y multiplicación, que le permiten al hongo fijarse a diversos sustratos. Las esporas en cambio, son estructuras de reproducción en estado latente cuya función principal es reproducirse y preservar la especie (Tortora, *et al.*, 1992). Diversos autores, como Alexopoulos (1977), indican que las esporas de los hongos requieren desde un par de horas hasta días para llegar a germinar en un ambiente propicio, lo que coincide con nuestros resultados (Fig 8-A).

Numerosos estudios se han desarrollado en los crustáceos los cuales han permitido observar que poseen una gran capacidad de detectar material extraño a su propia naturaleza. En específico, se tiene documentado que reconocen características comunes presentes en bacterias y hongos, como son lipopolisacáridos y β -glucanos, los cuales pueden activar funciones celulares defensivas del crustáceo como encapsulación, melanización, fagocitosis (Johansson *et al.*, 2000). Sritunyalucsana y Soderhall (2000), sugieren que el sistema de defensa de los crustáceos, conocido como melanización, es capaz de activarse con pequeñas cantidades, a nivel de picogramos por litro, de componentes de pared celular microbiana (como lipopolisacáridos o peptidoglucanos). Igualmente, estos autores observaron que durante el proceso de formación de la melanina, otros metabolitos tóxicos formados, tienen actividad anti-fúngica. Johansson y *et al.*, (2000) por otro lado, observaron que en una infección fúngica se induce una proteína específica unida a un β -1-3 glucano en el plasma de hemolinfa de camarón la cual, primeramente reconoce y luego se une a la pared celular de los hongos, formando un complejo tal que desencadena un mecanismo de defensa para combatir esta infección. Estos autores igualmente reportan cómo, en esta infección, el número de hemocitos libres disminuye y su recuperación es muy lenta, contrario a lo que observaron cuando se inyectó una solución salina al camarón. Lo anterior coincide con nuestros resultados, si consideramos que los filamentos de los hongos presentaron una mayor adhesión con los hemocitos, los cuales seguramente serán los que primeramente se activen para defender al camarón de una invasión fúngica (Fig 8-B). En general diversos

autores han encontrado que los hemocitos juegan un papel importante y central en la defensa del hospedero y en específico en infecciones bacterianas o fúngicas.

ENZIMAS:

Los hongos, por ser organismos incapaces de producir sus propios alimentos tienen que ingerir los nutrientes del medio ambiente que los rodea, haciendo uso, en muchos casos, de algunas enzimas que les permiten degradar moléculas grandes a compuestos pequeños asimilables. Algunas de las enzimas que utilizan para este fin son lipasas y amilasas etc; (Alderman y Polglase, 1986) Como se describe en la metodología, las condiciones de cultivo de las cepas fueron modificadas, en sus fuentes de carbono (0.4 %) y fuente de Nitrógeno (0.2 %) con la finalidad de inducir a las enzimas de acuerdo al sustrato que se les suministró. De esta manera se pudo detectar que las cepas de *Geotrichum sp1* y *sp2* tienen la capacidad de producir enzimas extracelulares tales como lipasas, amilasas y proteasas (ver tabla 2), coincidiendo con los estudios previos de Mukherjee y Kiewitt (1996) que reportaron la presencia de lipasa de *Geotrichum candidum*, que le sirven para hidrolizar parcialmente aceites de algunas semillas de plantas.

Otra de las enzimas que se exploró en nuestro trabajo fue la quitinasa, considerando sobre todo que la pared celular de los hongos está compuesta de quitina principalmente (Pelczar *et al.*, 1977). Sin embargo, al realizar las determinaciones cualitativas no se observó la presencia de esta actividad, lo que nos lleva a pensar que tal vez el sustrato empleado no fué el más adecuado.

Adicionalmente, otras enzimas producidas por el género *Geotrichum* han sido estudiadas por otros autores como Nakamura *et al.*, (2002), quienes confirmaron la presencia de poligalacturasa como mecanismo para facilitar la infección en cítricos y el desarrollo de la enfermedad conocida como pudrimiento agrio de los frutos.

Probablemente, las enzimas extracelulares producidas por los hongos cumplan con la misma función que en las bacterias, sobre todo si consideramos que los hongos son organismos quimioheterótrofos, incapaces de producir sus propios alimentos, dependiendo de su maquinaria enzimática para proveerse de sus nutrientes que le permitan sobrevivir como individuo.

SUPERVIVENCIA:

En las infecciones provocadas por hongos filamentosos en los crustáceos, se ha observado que los estadíos más susceptibles son los huevos y larvas (Porter, 1985; Noga, 1990). Por ejemplo Alavandi (2004), reporta lo devastadora que puede llegar a ser una micosis ocasionada por los géneros *Lagenidium*, *Haliphthoros* y *Sirolopidium* en cultivos de camarón (estadios de protozoa y misis principalmente), donde se han reportados mortalidades de hasta el 100%, en solo 1 o 2 días de aparecer los primeros signos. Igualmente, indican que las larvas afectadas por micosis larval se observan opacas previo a la ocurrencia de mortalidad. Afortunadamente en la actualidad las micosis de este tipo han disminuido considerablemente, al mejorar las practicas de manejo de los cultivos.

La propagación de una infección fúngica depende de distintos aspectos relacionados con el estado de salud del hospedero (Hunter *et al.*, 1979; Magarelli,

et al., 1979; Noga, 1990), así como las vías que el huésped emplea para infectar al hospedero, (Atlas, 1984; Noga, 1990), sin perder de vista que las condiciones de cultivo son de vital importancia (Hunter *et al.*, 1979). En relación al género *Geotrichum* algunos autores, como Alderman y Polglase (1986), O' Donnell (1996), y Aldarf, *et al.*, (2002) han demostrado que *Geotrichum candidum* excreta amoníaco al medio como metabolito secundario, lo cual puede ser tóxico para los camarones. Por su parte Le Moullac y Haffner (2000) afirman que el amoníaco es muy tóxico para los organismos acuáticos y puede causar serios daños a numerosos órganos. Estos autores encontraron que a mayores dosis de amoníaco la cantidad de hemocitos en los camarones se ve disminuida en un 50 % (3.0 mg l⁻¹) por ejemplo, en especies como *P. stylirostris*, indicando que la capacidad de defensa de los camarones se ve directamente afectada haciéndolos mas susceptibles a los patógenos y, por tanto, a enfermedades infecciosas. En los cultivos intensivos de camarón, por ejemplo, el problema del amoníaco en los estanques resulta de la excreción de los mismos animales y de la generacion de amoníaco del alimento no consumido. En nuestro trabajo observamos que al poner en contacto a las postlarvas con sobrenadantes de las cepas de *Geotrichum sp1* (Anexo 4), éstos empezaron a morir a partir de las 7 hrs y el número fue aumentando paulatinamente conforme pasaba el tiempo hasta alcanzar una mortalidad total a las 20 hrs de exposición. En cambio, para la cepa *Geotrichum sp2*, la muerte inicio 2 hrs antes que para la primera cepa y el 100 % de mortalidad se alcanzó a las 16 hrs, indicándonos de alguna manera que los posibles componentes tóxicos de los hongos excretados al medio son diferentes para cada

cepa. No obstante, estos componentes parecen ser menos agresivos que los componentes excretados por las cepas control del género *Fusarium* los cuales produjeron mortalidades del 100 % a las 2 hrs de exposición. Se sabe que algunas cepas del género *Fusarium* excretan diversos tipos de metabolitos secundarios tóxicos para el camarón (Chelkowski, 1989). Dadas las características de nuestro experimento, no se pudo identificar el tipo de compuesto tóxico, presente en los sobrenadantes, solamente se pudo demostrar que están presentes.

En relación al efecto de los filamentos en algunos crustáceos, autores como Polglase *et al.*, (1986), describieron como los filamentos del hongo *Fusarium solani* actúan como agente causal de muerte en los camarones al bloquear las branquias, desencadenando la melanización, lo que ocasiona que las branquias se pigmenten de color negro y se produzca la muerte por asfixia (Lightner, 1981; Nosanchuk *et al.*, 2002; Alavandi, 2004). También se pueden presentar manchas por todo el cuerpo (Alderman y Polglase, 1986; Bachere *et al.*, 2000), inflamación del exoesqueleto, necrosis (Noga, 1990) y problemas para desarrollar la muda (Sindermann, 1990). Por otra parte Lignot *et al.*, (2000) expusieron al cangrejo de río (*Astacus leptodactyles* en talla adulta) a hifas de *F. oxysporum* por un periodo de 36 horas observando la presencia de manchas negras en las branquias como resultado de la activación del mecanismo de defensa de la melanina.

Por su parte Arala-Chavez y Sequeira (2000) demostraron que las tasas de proliferación de hemocitos se ven incrementadas considerablemente al poner en contacto *P. monodon* y *Drosophila* con antígenos fúngicos. En nuestro caso, al

poner en contacto las larvas de *L.vannamei* con los filamentos de los hongos *Geotrichum sp1* y *sp2* se observó un aumento en la mortalidad conforme pasaba el tiempo. Tal vez por lo breve de nuestro experimento (solo duró 24 hrs) no se pudieron observar efectos tan notables como la melanización, que reportaron Lignot *et al.*, (2000).

La cantidad o dosis con la que un organismo puede causar daño a un hospedero es de suma importancia (Atlas, 1984). En nuestro caso se pudo apreciar que al ir incrementando las dosis las mortalidades presentadas eran mayores. Por otro lado, la calidad de la larva es de vital importancia en experimentos de reto. Esto se manifestó como lo podemos apreciar en la figura 8 (a y b, anexo 4), con el grupo testigo (camarones en agua sin inoculo) que no se vió afectado, mientras que en la fig 8 (c y d, anexo 4), se observó que los testigos sí fueron afectados en su supervivencia. Igualmente, se observó que la supervivencia de las larvas fue muy afectada (100 % de mortalidad en 2 hrs de contacto) al ponerlas en contacto con el medio de cultivo puro (tabla 3). Esto puede deberse a que los lotes eran diferentes y en particular el lote con el cual se hicieron los experimentos de reto con las cepas de *Fusarium* y las de contacto con el medio de cultivo, no era de la misma calidad que los que se utilizaron con las cepas de *Geotrichum*. Todo ello confirma la necesidad de estandarización en cada una de las etapas en las pruebas de patogenicidad porque muchos parámetros ambientales, factores del mismo patógeno, o del hospedero, pueden influir en los resultados de los experimentos como lo han sugerido Saulnier *et al.*, (2000). En el presente trabajo, se comprobó que el daño que en un momento

dado pueden ocasionar patógenos como los hongos filamentosos es considerable para los cultivos en la acuicultura. La prevención y control de enfermedades en el camarón necesita un de conocimiento integrado de varias disciplinas como: la patología, fisiología, inmunidad, ecología y genética, para lograr que esta industria siga siendo rentable (Bachere, 2000).

8.- CONCLUSIONES:

Derivado del presente trabajo se llegaron a las siguientes conclusiones.

- 1) Se aislaron e identificaron parcialmente 2 cepas de hongos filamentosos de estanquería supralitoral de camarón pertenecientes al género *Geotrichum*.
- 2) Los cultivos primarios de células de tegumento y hemocitos del camarón blanco (*L.vannamei*) fueron altamente susceptibles al contacto con sustancias citotóxicas provenientes de cepas del género *Geotrichum*.
- 3) Los filamentos de las cepas de *Geotrichum* presentaron una adhesión significativamente mayor que las esporas con respecto a los cultivos primarios de células de camarón probadas y el cultivo primario al que se le adhirieron mayormente los filamentos fue al de los hemocitos.
- 4) Las cepas *Geotrichum sp1* y *Geotrichum sp2* tienen la capacidad para producir enzimas tales como lipasas, proteasas y amilasas.
- 5) Las postlarvas PL8 de camarón blanco (*L. vannamei*) presentaron mortalidades apreciables al entrar en contacto con diferentes dosis de filamentos de cepas de *Geotrichum* así como con su sobrenadante.

9.- RECOMENDACIONES

1) Con la experiencia lograda con este trabajo se recomienda en el futuro:

a) Identificar las cepas aisladas con herramientas moleculares para describir su especie

b) Conservarlas como cepas de referencia.

2) Respecto a la naturaleza de los compuestos tóxicos es recomendable:

a) Identificar el grupo químico al que pertenecen los compuestos que las cepas excretan, así como los presentes en su sonicado, los cuales pueden presentar un efecto citotóxico.

3) Es importante elucidar el tipo de adhesina que poseen los filamentos de las cepas *Geotrichum* hacia los cultivos primarios de células de camarón y principalmente hacia los hemocitos.

4) Se deben complementar estos hallazgos con estudios histológicos para apreciar el nivel de daño ocasionado por los filamentos y el sobrenadante de las cepas de *Geotrichum* a las larvas de camarón.

5) Finalmente, es recomendable hacer monitoreos regulares en los cultivos de camarón que permitan detectar inmunodeficiencias en los camarones y por tanto reducir sensiblemente las enfermedades provocadas por virus, bacterias y hongos.

10.-BIBLIOGRAFIA

- Aguirre, G. G., Vázquez-Juárez, R., y Ascencio F., 2003. Efecto de diferentes especies de *Vibrio* sobre la sobrevivencia y desarrollo larval del camarón blanco de acuicultura (*L. vannamei*). VI Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. V Congreso Latinoamericano de Acuicultura. pp. 94-103.
- Alavandi, S.V., 2004. Manual of shrimp disease diagnosis and health management. [http:// www.icar.Org.in/ciba/GBD.web/manual](http://www.icar.Org.in/ciba/GBD.web/manual).
- Alba, C.D., 1980. Mariculture on coastal bodies of water of Baja California and their potential. 2nd International workshop on biosaline reseach. La Paz, B. C. S., México.
- Aldarf, M., Amrane, A., Prigent, Y., 2002. Reconstruccion of the biomass history from carbon and nitrogen substrate consumption, ammonia release and proton transfer during solid cultures of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camembertii*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58 (6) 823-82.
- Alderman, D.J., Polglase, J.L., 1986. Are fungal diseases significant in the Marine environment?. In: Moss, S.T. (Ed.), The Biology of Marine Fungi. Cambridge Univ. Press, pp.189-198.
- Alexopoulos, C.J., 1977. Introduccion a la micologia. Ed. Universitaria de Buenos Aires, pp 421-422.
- Archer, J.R., Romero, S., Ritchie, A.E., 1988. Characterization of an unclassified microaerophilic bacterium associated with gastroenteritis. J. Clin. Microbiol. 27, 101-105.
- Arala-Chavez, M and Sequeira, T., 2000. Is there any kind of adaptative immunity in invertebrates?. Aquaculture 191: 247-258
- Atlas, R.M., 1984. Microbiology fundamentals and applications. MacMillan Press, p 467-473.
- Anuario Estadístico de Pesca. 2001. p 65
- Austin, B., 1993. Marine Microbiology. Cambridge press, p 120, 129.
- Bachere, E., 2000. Shrimp inmunity and disease control. Aquaculture 191, 3-11.
- Bachere, E., Destoumieux, D. and Bulet, P., 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparasion with other effectors of innate immunity. Aquaculture 191, 71-88
- Bachere, E., Mialhe, E., Rodriguez, J., 1995. Identification of defence effectors in the haemolymph of crustaceans with particular reference to the shrimp *Penaeus*

- japonicus* (Bate). Prospects and applications. Fish & Shellfish Immunol. 5, 597-612.
- Bainy, A. C. D., 2000. Biochemical responses in Penaeids caused by contaminants. Aquaculture 191, 163-168.
- Bertke, C.C., and Aronson, J.M., 1992. Hyphal wall chemistry of *Lagenidium callinectes* and *L.chthamalophilum*. Bot. Mar. Vol. 35, 147-152.
- Brock, T., 1978. Biología de los microorganismos. Ed . OMEGA, S.A. 2 Ed. pp 720
- Bustos, R. E., 2000. Inmunidad sistémica y de mucosa inducida contra infecciones por *Helicobacter pylori* en ratones (Balb/c). Tesis Doctoral. CIBNOR pp 92.
- Chen, B. O., Wu, Y., Yang, J., 1992. Studies on pathogenecity of a species *Fusarium* in the culured adult prawn (*Penaeus chinensis* Donghai). Mar. Sci. 10 (4) 7-15.
- Coll-Morales, J., 1986. Acuacultura Marina Animal. Ediciones Mundi-Prensa. 2ª Edición. pp. 150-158.
- Chelkowski, J., 1989. *Fusarium*, Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity. Elsevier Science Publisher, pp. 1-39.
- Dahot, M.U., 1993. Cultivation of *Penicillium Expansum* on rice husk powder for proteasa production. J. of Islamic Acad. Sci. 6, (3)
- Del Valle, M., 1992. The yield of the penaeid offshore fishery in the Mexican pacific Coast during 1990-1991; lower than expected. Primera Conferencia Europea de crustáceos. Paris Francia. pp. 94.
- Dore, I. and Claus, F., 1987. An illustration guide to shrimp of the world. Van Nostrand Reinhold; NY. Pp 70
- Frankland, J.C., Dighton, J. and Boddy, L., 1990. Methods in Microbiology. Academic Press, pp. 359.
- Franklin, C.L., Kinden, D. A., Stogsdill, L. and Riley, L.K., 1993. In vitro model of adhesion and invasion by *Bacillus piliformis*. Infection and Immunology 61, 4242-4279
- Fuerst, J.A., Sambhi, S.K., Paynter, J.L., Hawkins, J.A. and Atherton, J.G, 1991. Isolation of a bacterium resembling *Pirellula* species from primary tissue culture of the giant tiger prawn (*Penaeus monodon*). Appl. Environ. Microbiol. 57, (11) 3127-3134.
- Gareth J.E. B. (2000); Marine fungi: Some factors influencing biodiversity; J. Fungal diversity 4, 53-73.

- Gómez-Gil, B., Roque, A., and Turnbull, J., F., 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 191, 259-270.
- Gray, W.D., Pinto, P. and Pathak, G.S., 1963. Growth of fungi in sea water medium. *Appl., Microbiol.* 11, 501-505.
- Grigorova, R. and Norris, J.R. 1990. *Methods in Microbiology, Techniques in Microbial Ecology*. Academic Press. Vol 22, pp 587.
- Guzmán-Murillo, M. A. and Ascencio, F., 2001. Enzyme-Linked, Biotin-Streptavidin Bacterial-Adhesion Assay for *Helicobacter pylori* Lectin-Like Interactions with Cultured Cells. *J. Microb. Biotechnol.* 11, (1) 35-39.
- Harlow, E. and Lane, D., 1988. *Antibodies. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, pp. 319-358.
- Hernández, L. J., 1995. Activación del sistema Fenoloxidasa de Hemocitos de camarón café (*Penaeus californensis* Holmes) y su efecto en la fagocitosis. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN pp 43
- Hernández, L. J., Gollas-Galvan, T. And Vargas-Albores, F., 1996. Activation of the Prophenoloxidase System of the Brown Shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.* 113C, 61-66.
- Hernández, S. N., 1990. Levaduras marinas aisladas en la costa occidental de Baja California Sur, México. Tesis de Licenciatura, UNAM, Los Reyes Iztacala, México pp 107.
- Hewitt, W. and Vincent, S., 1989. *Theory and application of microbiological assay*. Academic Press, pp 16-18.
- Hilne, H. E. and Jayasree, S., 2001. Biological properties of a natural agglutinin in the hemolymph of Indian white prawn, *Penaeus indicus*. *Aquaculture*, 194, (3-4) 245-252.
- Hunter, B., Magarelli, P.C. and Leightner, D.V., 1979. Ascorbic acid dependent Collagen formation in penaeid shrimp. *Comp Biochem. Physiol.* 64, (4) 381-385.
- Jackson, R.J., Fuhiihashi, K., Xu-Amano, J., Kiyono, H., Elson, C.O. and McGhee, J.R., 1993. Optimizing oral vaccines: Induction of Sistemic and mucosal B-cell and antibody responses to tetanus toxoid by use of cholera toxin as adjuvant. *Infect. Immunol.* 61, 4272-4279.
- Javor, B., 1989. *Hypersaline enviroment: Mycrobiology and Biochemistry*. Cap. 11: Yeast and Fungi. Brock/ Springer Series in contemporany .pp 163-175

- Jaw-Kai, W., and Leiman, J., 2000. Optimizing multi-stage shrimp production systems. *Aquacult. Engineering*, 22, (4) 243-254.
- Jennings, D.H., 1983. Some aspects of the physiology and biochemistry of Marine fungi. *Rev. Microb.* 58, 423-459.
- Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K. And Soderhall, K., 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* 191, 45-52.
- Kautsky, N, Ronnback, P, Tadengren, M; and Troell, M, 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* 191, 145-162.
- Kirsop, B.E. and Doyle, A, 1991. Maintenance of microorganisms and cultured cells. A manual of Laboratory Methods. 2^a Ed. Academic Press, pp. 29, 133.
- Klemm, P., 1985. Fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Rev. Infect. Dis.* 7, 321-330.
- Kurtzman, C. P and Fell, J.W., 1999. The yeast, A taxonomic study. 4^a Ed. Elsevier Science, pp 210-213
- Kurtzman, C. P. and Robnett C. J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetes yeast from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antoine van Leeuwenhoek*. 73, 331-371.
- Lavens, P., and Sorgeloos, P., 2000. Experiences on importance of diet for shrimp postlarval quality. *Aquaculture* 191, 169-176.
- Le Moullac, G. and Haffner, P., 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* 191, 121-132.
- Lightner, D.V., 1981. Fungal disease of marine crustacea. In pathogenesis of invertebrate microbial disease. In: Davidson, E.W. (Ed). pp. 451-484.
- Lightner, R.M., Hose, J.E., 1984. Observations on the pathogenesis of the Imperfect fungus, *Fusarium solani*, in the California brown shrimp *Penaeus californensis*. *J. Inver. Path.* (44) 292-303.
- Lignot, J., H., Spanings-Pierrot, C., and Chamantier, G., 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture* 191, 209-246.
- McLaughlin, P. A., 1980. Comparative morphology of recent crustacean. Freeman and company. pp. 126, 131.
- Magarelli, P.C., Hunter, B. and Leightner, D.V., 1979. Black death: An ascorbic acid deficiency disease in penaeid shrimp. *Comp. Biochem. Physiol.* 63, (1) 103-108.

- Messiaen, C.M. y Lafon, R., 1968. Enfermedades de las hortalizas. Oikos-tau,S.A. Ediciones. pp.104-105.
- Mukkerjee, K.D. and Kiewitt, I., 1996. Enrichement of very-long-chain mono-unsaturated fatty acids by lipase-catalysed hydrolysis and transesterification. Appl. Microbiol. Biotechnol. 44, (5) 557 – 562.
- Nakamura, M., Iwai, H., Arai, K., 2002. Fungal disease, cloning and characterization of a polygalacturonase gene Ap2pg1 from *Geotrichum candidum* citrus race Ap2 pathogenic to apple Fruit. J. General Plant Pathol. 68, (4) 333-337.
- Noga, E., 1990. Pathology in marine science. Academic Press. pp. 143-160.
- Nolasco, H. y Tovar, D., 1998. Manual de técnicas Bioquímicas, laboratorio de Fisiología y Bioquímica comparada. Grupo de Nutrición Acuicola. Centro de Investigaciones biológicas del Noroeste, C.S.
- Nosanchuk, J.D., Gomez, B.L., Diez, S., Youngchim, S., Aisen, P., Zancoppe-Oliviera, R. M., Restrepo, A., Casadevall, A., Hamilton, A.J., 2002. Histoplasma capsulatum synthesizes melanin-like pigments in vitro and during mamalian infection. Abstracts of the general meeting of the American Society for Microbiology. 102 pp 204-205
- O'Donnell K., 1996. Progress towards a philogenetic classification of *Fusarium*. Sydowia 48, (1) 57-70.
- O'Leary, W., 1989. Microbiology- practical handbook. CRC Press, pp 70.
- Pagnocca, F. G., Mendonca-Hagler, L.C., Hagler, A.N., 1989. Yeast 2002 Associated with the white shrimp *Penaeus schmitti*, sediment and water of Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brazil. Journal Code 8607637. pp 479-483
- Pelczar, M. J., Reid, R. D. and Chan, E.C.S.,1977. Microbiology .4 ed. pp 285-296
- Perez-Farfante, I. and Kensley, B., 1997. Penaeid and Sergestoid shrimps and prawns of the world. Key and diagnoses for the families and genera. Editons du Museum National d'histoire Naturelle du Paris, Francia, pp 233.
- Pitt J.L. and Hocking A.D., 1997. Fungi anf food spoilage. 2^a Ed. Blackie academic professional, cap 4, pp. 39.
- Pierce and Leboffe, 2003 Exercises for the mirobiology Laboratory. <http://www2.austin.cc.tx.us/microbugz/labindex.html>
- Polglase, J.L., Alderman, D.J. and Richards, R.H., 1986. Aspects of the progress of mycotic infections in marine animals. OSU MAR SCI CTR. Pp.155-164
- Porter, D., 1985. Mycoses of marine organism: An overview of pathogenic Fungi, The Biology of marine fungi. OSU MAR SCI CTR. pp 141-153

- Reina, Manuel, 2004 Técnicas de estudio de líneas celulares.
<http://www.ub.es/biocel/wbe/tecnicas/cap1.htm>.
- Rheinheimer, J., 1994. Aquatic Microbiology. 4th ed G, Wiley Press. pp 48-60
- Rodríguez de la Cruz, M.C., 1981. Fishery aspects of the shrimps found in Mexican Pacific Waters. Ciencia Pesquera, 1, (2) 1-19.
- Rodríguez, J. and Le Moullac, G., 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. Aquaculture 191, 89-108.
- Rose, A. and Harrison, J.S., 1987. The Yeast 2. 2^a Ed. Academic Press Inc. pp 182-184
- Sainz, J.C., Maeda-Martinez, A.N., Ascencio-Valle, F., 1998. Experimental Vibriosis Induction with *Vibrio alginolyticus* of larvae of the Catarina Scallop (*Argopecten ventricosus*: circularis) (Sowerby II, 182); Microbial Ecol. 35, 188-192.
- Sanchez-Paz, A., 1996. Informe técnico. Dirección de Apoyo Técnico, CIBNOR, La Paz, Mexico, pp 2
- Saulnier, D., Haffner, P., P. Haffner, C., Goarant, P., Levy, and D. Ansquer, 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies a review. Aquaculture 191, 133-144.
- Secretaría de Pesca, 1988. Lineamientos normativos para la salinidad y nutrición acuícola en México. pp. 152-178.
- Sieburth, J. M., 1979. Sea microbes. Oxford University press. Pp 325-327
- Sigma (1978) Producto No. 1077-1. Chemical company. San Louis, MO, USA
- Sindermann, K. J., 1990. Principal diseases of marine fishes and shellfish 2 ; 2^a Ed. Academic Press. pp 516
- Sritunyalucksana, K. and Soderhall, K., 2000. Immediate immune reactions. Aquaculture 191, 53-70
- Tortora, G.J., Funke, B.R. and Case C.L., 1992. Microbiology An Introduction. 4^a ed. The Benjamin/ Cummings Pub. comp. Inc. pp. 292-306.
- Vargas-Albores, F. and Yepiz-Plasencia, G., 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. Aquaculture, 191, 13-21.
- Varughese, M., Teixeira, A.V., Liu, Shihui and Leppla, H., 1999. Identification of a receptor-binding region within domain 4 of the protective antigen component of anthrax toxin. Infection and Immunity. 67, (4) 1860-1865.

- Walton, A. and Smith, V.J., 1999. Primary culture of the hyaline haemocytes from marine decapods. *Fish & Shellfish Immunology* 9, 181-194.
- Wang, C., 1979. Cap. 6 Cinética de Fermentaciones, p 66. En *Fermentaciones en la industria*. (Ed) John Wiley and Son.
- Wen-Young, T., 1986. *Shrimp Mariculture- A Practical Manual*. Chien Cheng Publisher, pp. 185-191.
- Whiteside, J.O., Garnsey, S.M. and Timmer, W., 1988. *Compendium of Citrus Diseases*. APS Press, pp 70.
- Williamson, P., 1986. UK Marine culture collections and culture – related research. Swindon, UK Nat. Environ. Research Council. pp. 86.
- Zar, J.H., 1996. *Bioestadistical Análisis*. 3 Ed. Prentice Hall Editorial. 662 pp.

11.- APÉNDICE I DE FORMULAS Y REACTIVOS

Medio de cultivo M-1:

Glucosa 2 %
Peptona 1 %
Extracto de Levadura 0.5 %
Agar 2 %
PH 4.5
Agua de mar

Técnica para evaluar viabilidad de cultivos primarios (Azul de tripano)

Azul de Tripano (solución 0.4 %) preparado en 0.8 % de Cloruro de sodio mas 0.06 % de Fosfato de Potasio Di básico.

Se usa una solución 1:1 de azul de Tripano y de muestra, se mezclan 5 minutos a temperatura ambiente (minino 5 min., Máximo 10 min.). Las células vivas se observaran sin teñir y las células muertas teñidas de azul.

Reactivos para experimento de citotoxicidad:

1) Solución de cristal de violeta:

0.13 g de cristal violeta
5 ml de etanol

Preparar 100 ml con 2 % de formalina in PBS

2) Solución de Formalina:

Formalina 2 % en PBS (pH 7.2)

Solución de Dodecil sulfato de sodio (SDS):

1 g de SDS
50 ml de etanol

Preparar 100 ml con PBS (pH 7.2)

PBS (Phosphate Buffered Saline)

8 g de Cloruro de Sodio
0.2 g Cloruro de Potasio
2.9 g Fosfato de Sodio di básico
0.2 g Fosfato de Potasio monobásico

Disolver todos los ingredientes en 1 litro de agua destilada y ajustar el pH a 7.2

Reactivos para experimento de adhesión:

EDTA: Ácido etilen diamino tetracético

DMSO: Dimetil Sulfosido

Tinción de ascos poras con verde de Malaquita

Las preparaciones son fijadas con calor, posteriormente inundadas con Verde de Malaquita acuosa 5 % por 30-60 segundos y calentar para fijar la tinción de 3-4 veces. El exceso de colorante es lavado con agua corriente por 30-60 segundos.

La preparación es entonces contrastada con 0.5 % de safranina por 30 segundos. Alas ascosporas maduras se teñirán de azul-verde y las células vegetativas rojas.

Para esta técnica se hizo una modificación: Una vez que se inunda con verde de Malaquita el cubre objeto, este se pondrá sobre un baño Maria caliente, para que los vapores fijen el colorante y no se hizo directo a la flama como lo indica la técnica, porque se observo que el verde de Malaquita, no se adhiere uniformemente a las esporas.

El verde de Malaquita para que penetre en la espora debe calentarse lo suficiente para que despida vapores y el hecho de lograr esto implica que se tenga mas tiempo a la flama y esto dañaba a las esporas.

ANEXO 1:



Fotografia 1: Halo de hidrólisis de la enzima amilasa, revelada con lugol (G.sp1)



Fotografia 2: Presencia de precipitado por la enzima lipasa positiva (*Geotrichum sp1* y *Geotrichum sp2*).↑



Fotografia 3: Halo de hidrólisis de la enzima proteasa positiva



Fotografia 4: Enzima quitinasa negativa

ANEXO 2: Resultados del análisis de varianza y pruebas de Turkey para el experimento de citotoxicidad.

Para la prueba de Turkey: La diferencias significativas se expresan en color rojo.

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	4,474329	1	4,474329	14834,68	0,000000
cult prim	0,338180	3	0,112727	373,75	0,000000
toxin	0,044694	18	0,002483	8,23	0,000000
cult prim*toxin	0,036269	54	0,000672	2,23	0,000017
Error	0,078419	260	0,000302		

a) citotoxicidad de las cepas *Geotrichum sp1* y *G.sp2* a los diferentes cultivos primarios. B= Branquia, H: Hemocitos, I= Intestino y T=Tegumento.

	cult prim	{1}	{2}	{3}	{4}
1	B		0,000008	0,945142	0,000100
2	H	0,000008		0,000008	0,000008
3	I	0,945142	0,000008		0,001000
4	T	0,000100	0,000008	0,001000	

b) Citotoxicidad de las diferentes toxinas a los cultivos primarios provenientes de las cepas:.

Toxinas de *Geotrichum sp1*: Sn conc C1= Sobrenadante concentrado, Sn dil C1= Sobrenadante diluido, Son conc C1= Sonicado concentrado, Son dil C1= Sonicado diluido.

Toxinas de *Geotrichum sp2*: Sn conc C2= Sobrenadante concentrado, Sn dil C2= Sobrenadante diluido, Son conc C2= Sonicado concentrado, Son dil C2= Sonicado diluido.

Toxinas de *Fusarium solani*: Sn conc F37= Sobrenadante concentrado, Sn dil F37= Sobrenadante diluido, Son conc= Sonicado concentrado F37, Son dil F37= Sonicado diluido

Toxinas de *Fusarium javanicum*: Sn conc F45= Sobrenadante concentrado, Sn dil F45= Sobrenadante diluido, Son conc= Sonicado concentrado F45, Son dil F45= Sonicado diluido

Controles positivos: Va= Toxina de *Vibrio alginoliticus*, Vc= Toxina de *Vibrio cholera*, Vp = Toxina de *Vibrio alginoliticus*.

ANEXO 3: Resultados del Análisis de varianza y pruebas de Turkey para el experimento de adhesión.

Para la prueba de Turkey: La diferencias significativas se expresan en color rojo.

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	35,49736	1	35,49736	3924,969	0,000000
{1}culprim	2,61978	3	0,87326	96,557	0,000000
{2}inoculo	4,78867	1	4,78867	529,486	0,000000
{3}cepa	0,10754	1	0,10754	11,891	0,000764
{4}tiempo	1,19435	3	0,39812	44,020	0,000000
culprim*inoculo	0,16234	3	0,05411	5,983	0,000754
culprim*cepa	0,13849	3	0,04616	5,104	0,002276
inoculo*cepa	0,08628	1	0,08628	9,540	0,002467
culprim*tiempo	0,08833	9	0,00981	1,085	0,378235
inoculo*tiempo	0,59755	3	0,19918	22,024	0,000000
cepa*tiempo	0,05186	3	0,01729	1,911	0,130992
culprim*inoculo*cepa	0,05021	3	0,01674	1,851	0,141314
culprim*inoculo*tiempo	0,05650	9	0,00628	0,694	0,713192
culprim*cepa*tiempo	0,13294	9	0,01477	1,633	0,112403
inoculo*cepa*tiempo	0,19960	3	0,06653	7,356	0,000138
1*2*3*4	0,22615	9	0,02513	2,778	0,005257
Error	1,15763	128	0,00904		

a) Adhesión de las cepas a los diferentes cultivos primarios utilizados: I= Intestino
B= Branquia, T= Tegumento y H= Hemocitos

Prueba de Turkey

	Cult prim	{1}	{2}	{3}	{4}
1	I		0,666874	0,000008	0,000008
2	B	0,666874		0,000008	0,000008
3	T	0,000008	0,000008		0,000008
4	H	0,000008	0,000008	0,000008	

b) Adhesión presentada por los Filamentos (F) y Esporas (E) de las diferentes cepas

Prueba de Turkey

	inoculo	{1}	{2}
1	F		0,000009
2	E	0,000009	

c) Adhesión de cepas: 1) *Geotrichum sp1* y 2) *Geotrichum sp2*

Prueba de Turkey

	cepa	{1}	{2}
1	1		0,000570
2	2	0,000570	

d) Adhesión de las cepas de *Geotrichum sp1* y *G.sp2* en el tiempo (Expresado en minutos)

Prueba de Turkey

	tiempo	{1}	{2}	{3}	{4}
1	0		0,000008	0,000008	0,000008
2	30	0,000008		0,999709	0,000019
3	60	0,000008	0,999709		0,000015
4	180	0,000008	0,000019	0,000015	

e) Adhesión de la interacción cultivo primario con inoculo: de las cepas de *Geotrichum sp1* y *G.sp2*

Prueba de Turkey

	culprim	inoculo	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
1	I	F		0,000032	0,576022	0,000032	0,000032	0,000032	0,000032	0,999761
2	I	E	0,000032		0,000032	0,999996	0,000032	0,688436	0,000032	0,000032
3	B	F	0,576022	0,000032		0,000032	0,000032	0,000032	0,000032	0,862759
4	B	E	0,000032	0,999996	0,000032		0,000032	0,512813	0,000032	0,000032
5	T	F	0,000032	0,000032	0,000032	0,000032		0,000032	0,000080	0,000032
6	T	E	0,000032	0,688436	0,000032	0,512813	0,000032		0,000032	0,000032
7	H	F	0,000032	0,000032	0,000032	0,000032	0,000080	0,000032		0,000032
8	H	E	0,999761	0,000032	0,862759	0,000032	0,000032	0,000032	0,000032	

f) Adhesión de la interacción cultivo primario con cepas de *Geotichum sp1* y *G.sp2*

Prueba de Turkey

	Cult prim	cepa	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
1	I	1		0,252714	0,999278	0,014385	0,000747	0,000032	0,000032	0,000032
2	I	2	0,252714		0,609630	0,967376	0,610675	0,000041	0,000032	0,000032
3	B	1	0,999278	0,609630		0,080699	0,006907	0,000032	0,000032	0,000032
4	B	2	0,014385	0,967376	0,080699		0,994682	0,001358	0,000032	0,000032
5	T	1	0,000747	0,610675	0,006907	0,994682		0,023271	0,000032	0,000032
6	T	2	0,000032	0,000041	0,000032	0,001358	0,023271		0,000032	0,005771
7	H	1	0,000032	0,000032	0,000032	0,000032	0,000032	0,000035		0,738684
8	H	2	0,000032	0,000032	0,000032	0,000032	0,000032	0,005771	0,738684	

g) Adhesión de la interacción inoculo con las cepas de *Geotichum sp1* y *G.sp2*

Prueba de Turkey

	inoculo	cepa	{1}	{2}	{3}	{4}
--	---------	------	-----	-----	-----	-----

1	F	1		0,000029	0,000008	0,000008
2	F	2	0,000029		0,000008	0,000008
3	E	1	0,000008	0,000008		0,994233
4	E	2	0,000008	0,000008	0,994233	

h) Adhesión de la interccion inoculo de las cepas *Geotichum sp1* y *G.sp2* con tiempo

Prueba de Turkey

	inoculo	tiempo	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
1	F	0		0,000032	0,000032	0,000032	0,000055	0,000785	0,002246	0,255798
2	F	30	0,000032		0,999938	0,000055	0,000032	0,000032	0,000032	0,000032
3	F	60	0,000032	0,999938		0,000035	0,000032	0,000032	0,000032	0,000032
4	F	180	0,000032	0,000055	0,000035		0,000032	0,000032	0,000032	0,000032
5	E	0	0,000055	0,000032	0,000032	0,000032		0,996218	0,976862	0,180823
6	E	30	0,000785	0,000032	0,000032	0,000032	0,996218		0,999996	0,614852
7	E	60	0,002246	0,000032	0,000032	0,000032	0,976862	0,999996		0,779374
8	E	180	0,255798	0,000032	0,000032	0,000032	0,180823	0,614852	0,779374	

I) Adhesión entre la interacción de inoculo, cepas de *Geotichum sp1* y *G.sp2* y tiempo:

Prueba de Turkey:

	inoculo	cepa	tiempo	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}	{16}
1	F	1	0		0,000157	0,089472	0,000029	0,998010	0,000029	0,000029	0,000029	0,000758	0,003097	0,074026	0,970714	0,023193	0,190090	0,043908	0,175681
2	F	1	30	0,000157		0,964586	0,957067	0,000029	0,992207	0,503480	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029
3	F	1	60	0,089472	0,964586		0,077920	0,000936	0,165617	0,004628	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029	0,000182	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029
4	F	1	180	0,000029	0,957067	0,077920		0,000029	1,000000	0,999989	0,000091	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029
5	F	2	0	0,998010	0,000029	0,000936	0,000029		0,000029	0,000029	0,000029	0,077920	0,187144	0,778341	1,000000	0,519839	0,938595	0,663097	0,928875
6	F	2	30	0,000029	0,992207	0,165617	1,000000	0,000029		0,999547	0,000043	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029
7	F	2	60	0,000029	0,503480	0,004628	0,999989	0,000029	0,999547		0,002805	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029
8	F	2	180	0,000029	0,000029	0,000029	0,000091	0,000029	0,000043	0,002805		0,000029	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029	0,000029
9	E	1	0	0,000758	0,000029	0,000029	0,000029	0,077920	0,000029	0,000029	0,000029		1,000000	0,998304	0,208455	0,999977	0,976600	0,999710	0,980763
10	E	1	30	0,003097	0,000029	0,000029	0,000029	0,187144	0,000029	0,000029	0,000029	1,000000		0,999963	0,406457	1,000000	0,997890	0,999998	0,998436
11	E	1	60	0,074026	0,000029	0,000029	0,000029	0,778341	0,000029	0,000029	0,000029	0,998304	0,999963		0,944527	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
12	E	1	180	0,970714	0,000029	0,000182	0,000029	1,000000	0,000029	0,000029	0,000029	0,208455	0,406457	0,944527		0,786371	0,993367	0,886220	0,991568
13	E	2	0	0,023193	0,000029	0,000029	0,000029	0,519839	0,000029	0,000029	0,000029	0,999977	1,000000	1,000000	0,786371		0,999998	1,000000	0,999999
14	E	2	30	0,190090	0,000029	0,000029	0,000029	0,938595	0,000029	0,000029	0,000029	0,976600	0,997890	1,000000	0,993367	0,999998		1,000000	1,000000
15	E	2	60	0,043908	0,000029	0,000029	0,000029	0,663097	0,000029	0,000029	0,000029	0,999710	0,999998	1,000000	0,886220	1,000000	1,000000		1,000000
16	E	2	180	0,175681	0,000029	0,000029	0,000029	0,928875	0,000029	0,000029	0,000029	0,980763	0,998436	1,000000	0,991568	0,999999	1,000000	1,000000	

ANEXO 4

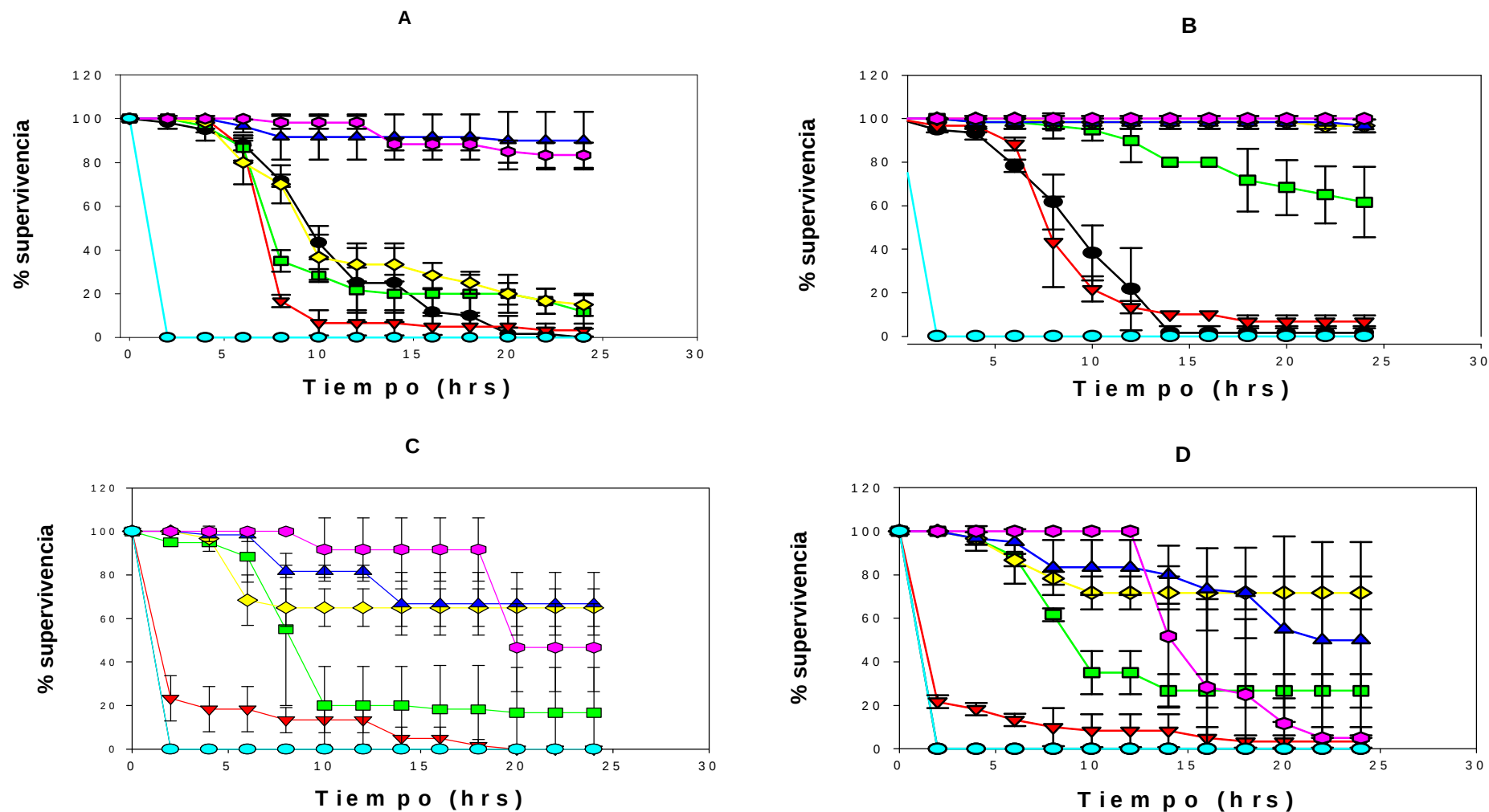


Fig. 8.- Curvas de sobrevivencia de larvas PL8 (*L.vannamei*) contra las cepas de: A) *Geotrichum sp2*; B) *G.sp2*; C) F-37 y D) F-45. Símbolos:

• Sn, ▼ 0.5 DO, ■ 0.25 DO, ◆ 0.1 DO, ▲ 0.01 DO, ● Testigo, ● Medio de cultivo puro