



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**LA FAGOTERAPIA COMO ESTRATEGIA PARA
REDUCIR LA MORTALIDAD POR VIBRIOSIS EN
LARVAS DE CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus*
*vannamei***

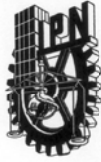
TESIS

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

PRESENTA

CARLOS OMAR LOMELÍ ORTEGA

LA PAZ, B.C.S., DICIEMBRE DE 2011



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

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 10 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

"LAFAGOTERAPIA COMO ESTRATEGIA PARA REDUCIR LA MORTALIDAD
POR VIBRIOSIS EN LARVAS DE CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*"

Presentada por el alumno:

LOMELÍ
Apellido paterno

ORTEGA
materno

CARLOS OMAR
nombre(s)

Con registro:

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

Aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

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

LA COMISION REVISORA

Director(a) de Tesis

DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ

DR. DAVID ALFARO SIQUEIROS BELTRONES

DR. JESÚS IVÁN MURILLO ALVAREZ

DR. RENATO PEÑA MARTÍNEZ

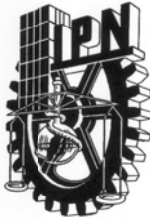
DRA. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ



IPN
CICIMAR
DIRECCION



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 23 del mes Noviembre del año 2011
el (la) que suscribe BM. CARLOS OMAR LOMELÍ ORTEGA alumno(a) del
Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS
con número de registro B091370 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:
DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ


y cede los derechos del trabajo titulado:

"LA FAGOTERAPIA COMO ESTRATEGIA PARA REDUCIR LA MORTALIDAD
POR VIBRIOSIS EN LARVAS DE CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*"

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

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: darkmagician6@hotmail.com - sdiaz@ipn.mx

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


BM. CARLOS OMAR LOMELÍ ORTEGA
nombre y firma

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por el apoyo brindado, a mi mamá Armida Ortega por su cariño y por que siempre ha estado para mi en los buenos y malos momentos, a mi hermana Laura ya que a pesar de hacerme enojar cada 5 min me demuestra su cariño, aunque de una manera muy particular; y a Jorge Nieto por ser un ejemplo de ser humano, su amistad y por apoyarnos en todo momento.

Al Dr. Sergio Martinez por la oportunidad y todo el apoyo brindado para realizar esta tesis bajo su dirección, con la cual obtuve una gran cantidad de información y experiencia. También agradezco la paciencia, el tiempo y los consejos aportados, sin dejar de mencionar todas esas juntas de laboratorio en Chiltepinos.

A la Dra. Bárbara González por sus consejos, las pláticas en la mañana tomando un rico cafecito y la amistad brindada, la cual atesoraré por siempre. Académicamente agradezco sus correcciones, aportaciones y comentarios, los cuales fueron clave para mejorar mi formación y redacción (eso sí, aún no la supero jaja).

Al Dr. David Siqueiros, Dr. Renato Peña, Dr. Iván Murillo y Dra. Christine Band, a todos les agradezco su paciencia y por aceptar ser parte de mi comité revisor. Sus sugerencias fueron muy valiosas para mejorar este documento y ampliar mi visión como estudiante de ciencias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN) por permitir el uso de las instalaciones y el equipo para la realización de la tesis.

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

A la granja de producción larvaria Acuacultura Mahr, Lucy y Chuy por haber proporcionado las larvas utilizadas en esta tesis.

A Alicia Márquez ya que además de ser una gran amiga, también fuiste un apoyo importante en mis malos momentos (estrés, malviajadas, berrinches) y también en los buenos (pláticas eternas en el carro, risas, trabajo de laboratorio, múltiples salidas). La verdad resumí todo lo que hemos pasado en estos años (si Alicia ya son varios años de amistad), pero espero que con en este pequeño párrafo sepas lo importante que has sido y eres para mi, gracias por tu amistad, de corazón.

A Lina Zermeño ya que desde que llegué a trabajar con esta tesis fuiste la persona que me enseñó las técnicas y todo lo necesario para trabajar en el laboratorio (Aclaro no fui tu esclavo, ¿verdad lina?, jaja). Además de ello, te agradezco tus consejos, aportes, apoyo y principalmente por tu amistad, ya que siempre encontré en ti una amiga con quien conversar.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio Lalo y Diana por ayudarme en múltiples ocasiones para la realización de esta tesis (desde prestarme una placa hasta brindarme un consejo). Román gracias por llevarme en varias ocasiones a la granja por larvas, por ayudarme con las presentaciones (aún soy un asco jaja), por generar esos buenos momentos de risas en el laboratorio y por conseguirnos las becas Sergio bajo tu mandato como líder sindical.

Fui el primero en decir que no se deberían incluir personas en los agradecimientos a menos de que hayan aportado directamente algo a esta tesis, pero cambié de opinión. Agradezco a la Dra. Claudia Hernández, M.en C. Noemí Águila, Sonia Valencia, Ismael Ortíz, Cynthia Montes y Yessica Parera, por brindarme tantos momentos agradables en el laboratorio, los cuales me desestrezaban y evitaron un suicidio durante la realización de esta tesis. Nunca los olvidaré, ni tampoco a los kilos subidos por tanta comida ingerida durante los miles de festejos que celebramos.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE	I
RELACIÓN DE TABLAS	IV
RELACIÓN DE FIGURAS	V
ABREVIATURAS.....	VIII
GLOSARIO.....	X
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Acuicultura: importancia y problemas infecciosos	1
2. <i>Vibrio</i> sp. en el ambiente	2
3. Vibriosis en camarón	2
3.1 Signos de vibriosis en camarón	3
3.2 Especies relacionadas con vibriosis en camarón	4
4. Tratamientos correctivos de la vibriosis.....	5
4.1 Antibióticos	5
4.2 Fagos.....	6
II. ANTECEDENTES	8
1. Estudios sobre infecciones experimentales con <i>Vibrio</i>	8
2. Terapias no fágicas contra vibriosis	9
3. Fagoterapia	11
III. JUSTIFICACIÓN	13
IV. OBJETIVOS	14
1. General.....	14
2. Objetivos específicos.....	14
V. HIPÓTESIS	14
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	15
1. Microorganismos	15
1.1. Bacterias.....	15
1.2. Fagos	16
1.3. Microalga	16
1.4. Producción masiva de fagos	17
2. Cinética de infección de los fagos.....	17
3. Desarrollo de un modelo de infección para reproducir la vibriosis	

en larvas de camarón	18
3.1. Estandarización de condiciones para el mantenimiento de larvas	18
I. Evaluación de dos fuentes de agua y densidad de larvas ...	18
II. Evaluación de diferentes alimentos para el mantenimiento de las larvas.....	19
III. Reducción del número de bacterias asociadas en el alimento vivo y en las larvas de camarón blanco.....	21
a) Reducción de la carga bacteriana en el cultivo de <i>C. calcitrans</i>	21
b) Reducción de la carga bacteriana en larvas de camarón blanco.....	22
3.2. Evaluación de la virulencia de <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>V. harveyi</i>	23
I. Aclimatación y mantenimiento de las larvas	23
II. Efecto del dióxido de cloro sobre la estandarización del modelo de infección	23
III. Selección de la cepa patógena.....	24
IV. Evaluación del efecto de la dosis de <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802 en la supervivencia de las larvas	25
V. Cinética de infección con <i>V. parahaemolyticus</i>	26
4. Fagoterapia.....	27
4.1. Evaluación del efecto de la suspensión de los fagos vpms1 y A3S sobre vibriosis	27
4.2. Dosis efectiva del fago vpms1	27
4.3. Efecto de la suspensión del fago vpms1 sobre larvas de camarón	28
4.4. Tiempo de aplicación	28
VII. RESULTADOS	29
1. Bacterias y fagos	29
1.1. <i>Vibrio harveyi</i>	29
1.2. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	31
2. Estandarización de las condiciones para el mantenimiento de larvas.....	33
1.1. Evaluación de dos fuentes de agua y densidad de larvas	33
1.2. Evaluación de diferentes alimentos para el mantenimiento de larvas	34
1.3. Optimización en el uso de <i>C. calcitrans</i> como alimento.....	37
3. Reducción del número de bacterias asociadas al alimento vivo proporcionado y a las larvas de camarón blanco	39
1.1. Reducción de la carga bacteriana en el cultivo de	

	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	39
1.2.	Reducción de la carga bacteriana en larvas de camarón blanco	39
4.	Inducción de la vibriosis en larvas	41
1.1.	Selección de la cepa patógena	41
1.2.	Evaluación del efecto de la dosis de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802 en la supervivencia de las larvas	45
1.3.	Cinética de la infección con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> 17802	50
5.	Fagoterapia	52
1.1.	Evaluación del efecto del extracto crudo de vpms1 y A3S específicos para <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802.....	52
1.2.	Dosis efectiva de los fagos A3S y vpms1	54
1.3.	Efecto de la suspensión del fago vpms1 sobre larvas de camarón.....	56
1.4.	Tiempo de aplicación	57
VIII.	DISCUSIÓN	59
1.	Estandarización de las condiciones de cultivo de larvas de camarón blanco	59
2.	Infecciones experimentales	66
3.	Fagoterapia	73
IX.	CONCLUSIONES.....	77
X.	RECOMENDACIONES	78
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
XII.	ANEXOS	95

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla I.	Dosis de alimento empleadas en la alimentación de larvas de camarón blanco en unidades experimentales con 100 mL de agua de mar artificial.....	20
Tabla II.	Supervivencia de larvas incubadas en dos tipos de agua y tres densidades de organismos.....	33
Tabla III.	Supervivencia de alimentadas con tres densidades de <i>C. calcitrans</i> por un periodo de 96 h.....	34
Tabla IV.	Dosis y absorbancias de los alimentos Nestum®, Royal Caviar® y Harina de fermentos.....	35
Tabla V.	Supervivencia de larvas zoea I alimentadas con levadura (<i>S. cerevisiae</i>) durante 96 h.....	36
Tabla VI.	Valores de multiplicidad de infección (MOI).....	95
Tabla VII.	Valores estadísticos de ANOVA y Kruskal-Wallis.....	96

RELACIÓN DE FIGURA

Figura 1.	Principales regiones del cuerpo de zoea II señaladas en la descripción de los signos de vibriosis.....	25
Figura 2.	Cinética del vibriófago F8.....	30
Figura 3.	Cinética del vibriófago F12.....	30
Figura 4.	Cinética de crecimiento de <i>V. parahaemolyticus</i> en medio de cultivo CM y TSB durante 20 h.....	32
Figura 5.	Cinética de los vibriófagos vpms1 y A3S con la cepa 17802 en medio TSB durante 8 h.....	32
Figura 6.	Supervivencia de larvas zoea I alimentadas con las microalgas <i>Chaetoceros calcitrans</i> , <i>C. muelleri</i> y <i>Thalassiosira weissflogii</i> ..	37
Figura 7.	Supervivencia de larvas de camarón blanco <i>L. vannamei</i> alimentadas diariamente con una densidad de $1 \cdot 10^5$ cel·mL ⁻¹ de <i>C. calcitrans</i> durante 288 h.....	38
Figura 8.	Supervivencia de larvas sometidas a cuatro concentraciones de ClO ₂ (0.03, 0.15, 0.3 y 1.5 ppm) y cuatro tiempos de exposición (1, 3, 5 y 10 minutos).....	40
Figura 9.	Reducción en la carga bacteriana externa asociada a las larvas con tres tiempos de exposición a una concentración de 0.3 ppm de ClO ₂	41
Figura 10.	Supervivencia de larvas resultado de las infecciones experimentales realizadas con cepas patógenas de <i>V. harveyi</i> y <i>V. parahaemolyticus</i>	42

Figura 11.	Supervivencia de larvas de camarón con y sin tratamiento de ClO ₂ , expuestas a cepas potencialmente patógenas de <i>V. harveyi</i> y <i>V. parahaemolyticus</i>	43
Figura 12.	Principales signos de vibriosis observados en larvas zoea II.....	44
Figura 13.	Supervivencia de larvas expuestas a las cepas 14126, EC11 (<i>V. harveyi</i>) y 17802 (<i>V. parahaemolyticus</i>).....	45
Figura 14.	Supervivencia a las 96 h de larvas de camarón expuestas a cinco densidades de <i>V. parahaemolyticus</i> 17802.....	46
Figura 15.	Supervivencia de larvas de camarón blanco a las 96 h post-infección con tres cepas de <i>Vibrio</i>	46
Figura 16.	Larvas de camarón blanco infectadas con <i>Vibrio harveyi</i> cepa EC11.....	48
Figura 17.	Larvas de camarón blanco infectadas con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> cepa PS-017.....	48
Figura 18.	Larvas de camarón blanco infectadas con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> cepa 17802.....	49
Figura 19.	Cinética de infección con <i>V. parahaemolyticus</i> 17802 durante 96 h.....	50
Figura 20.	Larvas de camarón blanco infectadas a diferentes tiempos de exposición con la cepa <i>V. parahaemolyticus</i> cepa 17802.....	51
Figura 21.	Larvas de camarón blanco sometidas a fagoterapia con los fagos vpms1 y A3S.....	52

Figura 22.	Supervivencia de larvas de camarón blanco infectadas con <i>V. parahaemolyticus</i> 17802 y tratadas con los fagos vpms1 y A3S	53
Figura 23.	Fagos vpms1 (A) y A3S (B) empleados como terapia con dosis de 100, 200, 400 y 800 L de extracto crudo en larvas infectadas con <i>V. parahaemolyticus</i> 17802 durante 96 h.....	54
Figura 24.	Larvas de camarón blanco sometidas a terapia de fagos contra <i>V. parahaemolyticus</i> cepa 17802 a las 96 h.....	55
Figura 25.	Supervivencia de larvas de camarón blanco expuestas a diferentes dosis de extracto crudo del fago vpms1.....	56
Figura 26.	Supervivencia de larvas zoea expuestas durante 96 h a <i>V. parahaemolyticus</i> 17802 y tratadas a diferentes horas con suspensión del fago vpms1.....	58

ABREVIATURAS Y UNIDADES DE MEDIDA

Abreviaturas

ATCC	American Type Culture Collection
CM	Caldo marino
AM	Agar marino
TSB	Caldo tripticasa de soya
TSA	Agar tripticasa de soya
AM Ae	Agua de mar artificial estéril
AM Ne	Agua de mar natural estéril
UFC	Unidades formadoras de colonia
UFP	Unidades formadoras de placa
Cel	Células
ClO ₂	Dióxido de cloro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
MOI	Múltiplicidad de infección
MOS	Manano-oligosacáridos
DO	Densidad óptica

Unidades

L – Litros

μm – Micrómetro

mL – Mililitros

g – Gramo

μL – Microlitro

Mg – Miligramo

ppm - Partes por mil

Mg – Microgramo

$^{\circ}\text{C}$ - Grados centígrados

nm – Nanómetros

X g - Fuerza centrífuga relativa

h – Horas

min – Minutos

t – Tonelada

GLOSARIO

Antibiótico: Sustancia química derivada o producida por microorganismos que posee la capacidad de matar o inhibir el desarrollo de otros organismos (Santiago *et al.*, 2009)

Bacteriofago: Son virus que infectan y se replican dentro de células bacterianas (Abedon, 2009).

Ciclo lítico: Ciclo de replicación en el cual el genoma del virus toma el control del metabolismo del hospedero usando su maquinaria molecular en la producción de partículas virales. Se genera la lisis de la bacteria como proceso final del ciclo (Hanlon, 2007).

Ciclo lisogénico: Ciclo de replicación en el cual el genoma del fago se integra al genoma de la bacteria replicándose con ella. Sin embargo, bajo condiciones desfavorables el genoma del fago puede entrar al ciclo lítico matando a su hospedero (Hanlon, 2009).

Enzibiótico: Hidrolasa de mureina que destruye las células bacterianas desde el exterior (Hermoso *et al.*, 2007)

Fagoterapia: Uso de fagos o sus productos como bioagentes para el tratamiento o profilaxis de enfermedades infecciosas bacterianas (Kutter & Sulakvelidze, 2005)

Gnotobiótico: Organismos libres de bacterias o con una composición microbiana conocida (Marques *et al.*, 2006)

Hospedero (célula): Célula bacteriana que puede ser infectada por un fago (Kutter & Sulakvelidze, 2005).

Microbiota: Conjunto de microorganismos presentes de forma natural asociados a un macroorganismo. Su estructura y diversidad se ve afectado por condiciones fisicoquímicas como temperatura, salinidad, oxígeno (Balcázar *et al.*, 2006).

Patógeno: Es toda aquella entidad biológica capaz de producir enfermedad o daño en la biología de un hospedero (humano, animal, vegetal, etc.) sensiblemente predispuesto (Morales-Covarrubias, 2008).

Probiótico: Bacterias utilizadas para mejorar la salud de otros organismos (Balcázar *et al*, 2006)

Signo: Se entiende por signo clínico a cualquier manifestación objetivable consecuente con una enfermedad o alteración de la salud, y que se hace evidente en la biología del organismo enfermo (Morales-Covarrubias, 2008).

Vibriofago: Bacteriófago que infecta específicamente bacterias del género *Vibrio* (Kutter & Sulakvelidze, 2005).

Vibriosis: Enfermedad generada por bacterias del género *Vibrio* relacionada principalmente a organismos crustáceos en sistemas de cultivo (Morales-Covarrubias, 2008).

Virulencia: Designa el carácter patogénico, nocivo y violento de un microorganismo, como una bacteria, hongo o virus, o en otras palabras, la capacidad de un microbio de causar una enfermedad (Morales-Covarrubias, 2008).

RESUMEN

En este trabajo la virulencia de varias cepas de *Vibrio* fue evaluada sobre larvas de camarón y se analizó la capacidad de la terapia con fagos para controlar la vibriosis. Se implementó un modelo para inducir experimentalmente la vibriosis, el cual fue usado durante los ensayos de fagoterapia. Las infecciones experimentales se realizaron en recipientes con 100 mL de agua de mar artificial estéril a una densidad de un nauplio por mL. Las larvas fueron mantenidas en durante 96 h con un alimento a base de microalgas (*Chaetoceros calcitrans* o *Thalassiosira weissflogii*) a dosis diarias de $1 \cdot 10^5$ cel \cdot mL $^{-1}$. Para evitar la interferencia causada por las bacterias asociadas a los nauplios o microalgas, las larvas fueron desinfectadas con dióxido de cloro (ClO₂) a 0.3 ppm durante 180 segundos y las microalgas tratadas con antibióticos para reducir su carga bacteriana. Con *V. parahaemolyticus* cepa ATCC 17802 se indujeron experimentalmente los signos de vibriosis y las mortalidades registradas fueron mayores al 40 % a una dosis de $2 \cdot 10^6$ UFC \cdot mL $^{-1}$; los signos de vibriosis incluyeron excitación de cromatóforos, anorexia, deformación de apéndices y puntos negros sobre el cuerpo. Los fagos Vpms1 y A3S fueron efectivos para reducir la mortalidad y los signos de vibriosis en las larvas. Una sola dosis de $1 \cdot 10^6$ UFP \cdot mL $^{-1}$ (a un índice de multiplicidad de infección MOI= 0.4) para ambos fagos fue suficiente para eliminar los efectos negativos de *V. parahaemolyticus*. La aplicación del fago vpms1 dentro de un lapso de tiempo no mayor de 12 h post-infección generó los mejores valores de supervivencia (71 % \pm 3.81) los cuales no fueron significativamente diferentes del control sin infectar (P>0.05), y retrasando la aplicación de fagos por más tiempo (de 24 a 36 h) se detiene la mortalidad, lo que es una evidencia del potencial correctivo del uso de fagos. En consecuencia, el uso de la fagoterapia en el tratamiento de la vibriosis de camarón blanco puede considerarse efectivo para prevenir y controlar la vibriosis.

Palabras clave: Vibriosis, Fagoterapia, Fagos, *V. parahaemolyticus*, Larvas, Camarón.

ABSTRACT

In this study the virulence of several *Vibrio* strains was evaluated on shrimp larvae and examined the ability of phage therapy to control vibriosis. A model to experimentally induce the vibriosis was implemented, which was used during phage therapy testing. Experimental infections were performed in containers with 100 mL of sterile artificial seawater at a density of 1 nauplii per mL. The larvae were kept during 96 h with an algae-based food (*Chaetoceros calcitrans* or *Thalassiosira weissflogii*) at daily doses of $1 \cdot 10^5$ cel \cdot mL⁻¹. To avoid interference of bacteria associated to nauplii or algae, larvae were disinfected with chlorine dioxide (ClO₂) at 0.3 ppm for 180 seconds and microalgae treated with antibiotics to reduce bacterial load. The experimental vibriosis was induced with *V. parahaemolyticus* strain ATCC 17802, including signs and mortalities greater than 40% at a dose of $2 \cdot 10^6$ CFU \cdot mL⁻¹, the signs of vibriosis include excitation of chromatophores, anorexia, deformed appendages and black spots on the body. The phages Vpms1 and A3S were effective to reduce mortality and signs of vibriosis in larvae. A single dose of $1 \cdot 10^6$ PFU \cdot mL⁻¹ (at an index of multiplicity of infection MOI = 0.4) for both phages was enough to eliminate the negative effects of *V. parahaemolyticus*. The application of phage vpms1 within a period not longer than 12 h post-infection produced the best survival values (71% \pm 3.81) which were not significantly different from uninfected control ($P > 0.05$), and delaying the application of phages for longer (24 to 36 h) the mortality was stopped, which is evidence of the corrective potential of using phages. Consequently, the use of phage therapy can be considered effective to preventing and controlling vibriosis in whiteleg shrimp.

Keywords: Vibriosis, Phage therapy, Phages, *V. parahaemolyticus*, Larvae, Shrimp.

I. INTRODUCCIÓN

1. Acuicultura: importancia y problemas infecciosos.

La acuicultura es la actividad que produce proteína animal para consumo humano con el más rápido crecimiento en el mundo (10-20 % por año) (Alagappan *et al.*, 2010). En instalaciones de producción a gran escala los organismos acuáticos están expuestos a condiciones estresantes como enfermedades y deterioro de los factores bióticos y abióticos (Balcázar *et al.*, 2006), los cuales son considerados factores limitantes para el desarrollo de los organismos en cultivo (Flegel, 2006).

El control de enfermedades virales y bacterianas en la camaronicultura representa el reto más importante que enfrenta esta industria debido a la intensificación de los cultivos y a la transferencia de organismos alrededor del mundo (Scholz *et al.*, 1999; Saulnier *et al.*, 2000). Si bien, los virus son de los principales patógenos que afectan esta industria en todo el mundo como el síndrome de Taura (TSV), virus de la cabeza amarilla (YHV) y el virus de la mancha blanca (WSSV), provocando mortalidades hasta del 100 % de los organismos cultivados.

Otros microorganismos de tipo bacteriano también pueden ocasionar infecciones que son destructivas para las granjas de camarón. Tal es el caso de las bacterias del género *Vibrio*, las cuales son unas de las principales responsables de las infecciones relacionadas a las especies de camarón de cultivo (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2005; Santiago *et al.*, 2009). Se han reportado mortalidades hasta del 100 % en condiciones de cultivo y experimentales relacionadas con este género, afectando principalmente a los estadios de desarrollo larvario (Prayitno & Latchford, 1995; Harris & Owens, 1999; Sung *et al.*, 2001; Thakur *et al.*, 2003; Aguirre-Guzmán *et al.*, 2010).

2. *Vibrio* sp. en el ambiente

Las bacterias del género *Vibrio* son gram-negativas, oxidasa positivas (en la mayoría de las especies), rectas o curvas con forma de bastón y anaerobias facultativas (Sung *et al.*, 2001). Son ubicuas y están ampliamente distribuidas en ambientes acuáticos, desde agua salobre hasta agua de mar profunda, en asociación con animales marinos, algas y detritus (Gopal *et al.*, 2005). La distribución y dinámica de las poblaciones planctónicas de *Vibrio* están influenciadas por factores como la temperatura y salinidad, disponibilidad de recursos, la depredación por protozoarios y virus, y la abundancia de los organismos hospederos (Thompson & Polz, 2006). Los *Vibrio* contribuyen ampliamente en los ciclos de nutrientes (tal es el caso de *V. diazotrophicus* una especie fijadora de nitrógeno); sin embargo, el principal papel que se atribuye a estos organismos es como patógenos de humanos (*V. cholerae*) y de organismos de cultivo (Colwell, 2006).

Los *Vibrio* también están presentes en los ecosistemas acuáticos estuarinos y marinos donde los camarones se encuentran naturalmente y/o son cultivados (Saulnier *et al.*, 2000; Gopal *et al.*, 2005). Las bacterias de éste género son consideradas parte de la microbiota normal de camarones peneidos, ya que constituyen el mayor porcentaje del total de bacterias aisladas del tracto digestivo, branquias y cutícula de camarones penaeidos, y ocasionalmente en la hemolinfa (Morales-Covarrubias, 2008; Santiago *et al.*, 2009). Sin embargo, en presencia de factores estresantes, éstas bacterias pueden desencadenar el desarrollo de infecciones en los organismos tales como vibriosis (Gómez-Gil *et al.* 1998).

3. Vibriosis en camarón

La vibriosis es una enfermedad común en el cultivo de camarón y es conocida también como enfermedad bacteriana, septicemia bacteriana de camarones peneidos, vibriosis de camarones peneidos, síndrome gaviota o enfermedad de la cola roja (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2004; Morales-Covarrubias, 2008). La vibriosis afecta a todas las especies de camarón usadas en acuicultura cuando estas se

encuentran bajo condiciones de estrés o se presenta un desbalance en la microbiota bacteriana natural (Gómez-Gil *et al.*, 1998; Gopal *et al.*, 2005). Además, un incremento en el número de *Vibrio* spp. patógenos es necesario para que la vibriosis ocurra (Sung *et al.*, 2001).

Las rutas naturales de infección reportadas son vía oral, trans-cuticular, causada por heridas o por transmisión vertical del patógeno, aunque no existe evidencia de que esta última ruta de infección pueda ocurrir (Saulnier *et al.*, 2000; Santiago *et al.*, 2009). En Infecciones experimentales se han empleado métodos como la inmersión, inyección intramuscular y hemolinfa, intubación oral, o a través de vectores (*Artemia*) pero además podría ser necesario generar un estrés en forma de daño físico a los organismos para proveer a las bacterias una ruta de acceso (Roque *et al.*, 2000; Aguirre-Guzmán *et al.*, 2001).

3.1 Signos de vibriosis en camarón

Los principales signos de vibriosis reportados son letargo, necrosis de apéndices y tejido, lento crecimiento, metamorfosis lenta y deformación del cuerpo en larvas, bolitas nigricans, bioluminiscencia, músculos opacos, melanización, tracto medio vacío y anorexia. El efecto y la gravedad de la infección está relacionado a la dosis y especie de *Vibrio*, calidad del agua, alimentación, calidad del camarón y manejo del cultivo (Aguirre-Guzmán & Ascencio-Valle, 2000; Aguirre-Guzmán *et al.*, 2004). Las lesiones histológicas causadas por vibriosis en larvas y poslarvas se pueden agrupar en: vibriosis oral y entérica y vibriosis de los apéndices y cuticular. En la vibriosis oral y entérica las larvas afectadas típicamente muestran una alta colonización bacteriana (en altas magnificaciones, 40x – 100x, se observan masas de bacterias en forma de barra) en la cutícula de varias partes de la boca y apéndices, en el revestimiento cuticular del esófago y en el revestimiento cuticular y componentes del estómago. Comúnmente también se presenta redondeo y descamación del túbulo hepatopancreático y células epiteliales del intestino medio (bolitas blancas). La invasión bacteriana del intestino medio y lumen del hepatopáncreas puede continuar

con el desarrollo de la colonización cuticular, con infecciones sistémicas que empiezan a ser presentes en la fase terminal de la enfermedad. En la vibriosis de los apéndices y cuticular, las terminaciones de los apéndices pueden ser colonizadas por vibrios, generándose la necrosis del revestimiento interno del epitelio cuticular, con la consecuente inflamación hemocítica y melanización. La invasión sistémica puede ocurrir en individuos con invasión severa y colonización cuticular (Lightner, 1996).

3.2 Especies relacionadas con vibriosis en camarón

Del género *Vibrio*, las principales cepas virulentas para camarón son *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* (Sung *et al.*, 1999; Aguirre-Guzmán *et al.*, 2004; Somboonwiwat *et al.*, 2006). En la crianza larvaria los agentes más frecuentemente reportados incluyen: *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *Vibrio sp.*, mientras que en crianza de juveniles y engorda las especies más frecuentemente reportadas son: *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus* y *Vibrio sp.* (Lightner, 1996). *V. harveyi* es la especie más comúnmente aislada durante procesos epidémicos y es considerada un patógeno primario de estadios larvarios en peces y crustáceos y patógeno secundario para juveniles y adultos. La vibriosis luminiscente debida a *V. harveyi* es una de las principales causas de enfermedades en crustáceos, provoca bajos niveles de supervivencia y en casos severos, los organismos afectados emiten una luminiscencia verdosa (Madigan *et al.*, 1999; Saulnier *et al.*, 2000; Alday-Sanz *et al.*, 2006; Vinod *et al.*, 2006; Alday-Sanz *et al.*, 2007). *V. parahaemolyticus* es considerado el principal agente causal de gastroenteritis alrededor del mundo por consumo de productos marinos, pero también está asociado con infecciones bacterianas en camarones peneidos y generalmente se considera un patógeno oportunista en camarones estresados (Thakur *et al.*, 2003; Gopal *et al.*, 2005; Yano *et al.*, 2006; Won & Park, 2008).

4. Tratamientos correctivos de la vibriosis

4.1 Antibióticos

La prevención y control de enfermedades en el cultivo de camarón se basó primordialmente en el uso de antibióticos, sin embargo, se ha cuestionado la utilidad de los antibióticos como una medida preventiva, ya que es ampliamente reconocido que el uso extensivo de los antibióticos en la acuicultura contribuye a la selección de patógenos humanos resistentes, los cuales pueden llegar a infectar a otros organismos y a humanos (Holmström *et al.*, 2003; Defoirdt *et al.*, 2007; Santiago *et al.*, 2009). Los mecanismos de resistencia pueden surgir de dos formas: mutación cromosómica o adquisición de plásmidos. Las mutaciones cromosómicas no pueden ser transferidas a otras bacterias, pero los plásmidos pueden transferir la resistencia rápidamente. Varios taxa de bacterias patógenas pueden desarrollar resistencia mediada por plásmidos. Los plásmidos con genes de resistencia a antibióticos han sido encontrados en especies marinas de vibrio y pueden ser intercambiados lateralmente (Holmström *et al.*, 2003; Balcázar *et al.*, 2006).

El uso de los antibióticos como tratamiento correctivo debería considerarse como última alternativa en los sistemas de cultivo ya que aunado al grave problema de resistencia, existen una serie de limitantes que comprometen su efectividad como terapia (Santiago *et al.*, 2009). Dentro de estos tenemos que los antibióticos son incorporados a un medio donde factores como la lixiviación y unión a cationes trivalentes o divalentes disminuyen su efectividad, por lo cual la mejor opción es incorporarlos dentro del alimento para mantener su estabilidad. Sin embargo, esta medida conlleva a un suministro inadecuado para todos los organismos enfermos y dosis no adecuadas (Cabello, 2004; Santiago *et al.*, 2009). Otros factores que determinan la efectividad del antibiótico son la temperatura de los estanques, pH, oxigenación, salinidad, etapa de la enfermedad, cambios climáticos y presencia de alimento natural. Además del daño directo sobre los antibióticos, se debe considerar el efecto que estos ejercen en contra de la microbiota autóctona, las bacterias del sistema de filtración biológica y probióticas ya que el mecanismo de acción que presentan muchos de los antibióticos es la inhibición de rutas metabólicas

importantes, lo cual lo hace un tratamiento poco específico. Finalmente y el problema más urgente es la fuerte restricción de los residuos de antibióticos en productos para el consumo humano (Gómez-Gil *et al.*, 2001; Alday-Sanz *et al.*, 2006; Alday-Sanz *et al.*, 2007; Santiago *et al.*, 2009). Dado lo anterior, es pertinente buscar propuestas alternativas para el tratamiento de infecciones bacterianas en los sistemas de cultivo, tomando como criterios: la eliminación de bacterias resistentes a los antibióticos, los tratamientos deben ser inocuos para las bacterias no patógenas y organismos, y que sus residuos no generen efectos secundarios al ambiente y consumidores finales del producto.

4.2 Fagos

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan las células bacterianas. Se calcula que son diez veces más numerosos que las bacterias, haciendo de ellos las formas de “vida” más abundantes en el planeta (Brüssow & Kutter, 2005; Hanlon, 2007; Rohwer *et al.*, 2009), de los cuales apenas 5,100 han sido identificados y reportados hacia el final del último siglo (Ackermann, 2003). Los fagos tienen una amplia distribución en los ambientes acuáticos, dentro de los cuales la lisis viral se considera juega un papel importante en el control de las poblaciones microbianas removiendo entre el 20 y 40 % de los procariontes y permite la liberación de materia orgánica y componentes celulares altamente lábiles secuestrados por las células (Suttle, 2007; Rohwer *et al.*, 2009).

Los bacteriófagos son parásitos obligados altamente específicos debido a su sistema de reconocimiento que sólo se acopla a componentes en la pared celular de las bacterias tales como proteínas, oligosacáridos, ácido teicoico, peptidoglicano y lipopolisacáridos (Hanlon, 2007; Donlan, 2009). Usan a la bacteria hospedera como una “fábrica” para su reproducción, presentándose dos tipos de ciclo de vida: a) Fagos virulentos o líticos que generan la rápida lisis y muerte de la célula hospedera, lo cual los hace de gran interés en la fagoterapia y b) los fagos temperados o lisogénicos que pasan parte de su ciclo de vida en un estado de inactividad

intracelular llamado profago. Además de no ocasionar rápidamente la lisis del hospedero, el ADN del profago puede conferir genes de resistencia, patogenicidad o incrementar la virulencia de la célula hospedera, por lo tanto para propósitos de fagoterapia los fagos temperados son una alternativa poco valorada (Morrison & Rainnie, 2004; Weinbauer, 2004; Hanlon, 2007).

El uso de fagos presenta mayores ventajas que los antibióticos ya que eliminan bacterias patógenas multiresistentes a drogas y, al contrario de estos, logran un efecto muy específico ya que actúa a nivel de especie o cepa sin alterar la flora normal del organismo tratado o el ambiente (Matsuzaki *et al.*, 2005; Skurnik *et al.*, 2007). Por otra parte, los fagos generalmente están constituidos de proteínas y ácidos nucleicos, por lo que sus productos de degradación consisten exclusivamente de aminoácidos y ácidos nucleicos. Esto los hace no xenobióticos a diferencia de los antibióticos y agentes antisépticos, por lo cual su distribución dentro de un ecosistema dado puede ser visto como un proceso natural (Carlton *et al.*, 2005). Además, la farmacocinética de la terapia de fagos muestra que con una dosis inicial se incrementa exponencialmente el número de virus, los cuales se siguen multiplicando dentro de bacterias hospederas susceptibles, por lo cual, sólo se necesitará una dosis y el número decrecerá una vez que la población de bacterias blanco desaparezca (Carlton *et al.*, 2005; Matsuzaki *et al.*, 2005; Alday-Sanz *et al.*, 2007; Hanlon, 2007). En adición, el costo de desarrollar un sistema de fagos es más económico en comparación con el desarrollo de un nuevo antibiótico (Carlton *et al.*, 2005; Skurnik *et al.*, 2007). Considerando la efectividad de los fagos como terapia alternativa al uso de antibióticos en organismos terrestres, incluyendo humanos, el presente trabajo tuvo como objetivo la evaluación de dos fagos líticos como medida preventiva y/o de control de vibriosis durante infecciones experimentales con larvas zoea de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

II. ANTECEDENTES

1. Estudios sobre infecciones experimentales con *Vibrio*.

Tomando en cuenta que los vibrios pueden generar la pérdida de los cultivos, Roque *et al.* (2000) mencionaron que es necesario generar un modelo de infección experimental con el cual se pueda investigar la virulencia de las cepas y evaluar el tratamiento o medidas de prevención. Además con el modelo se pueden determinar los factores de estrés ambiental que comienzan con los brotes de vibriosis en camarón de cultivo y entender mejor la relación entre el estrés ambiental y las bacterias en la etiología de la enfermedad.

Uno de los métodos empleados en la recreación de vibriosis es la exposición directa o inmersión. Lavilla-Pitogo *et al.* (1990) y Prayitno & Latchford (1995) utilizaron este método encontrando que *V. harveyi* aparentemente es más virulento sobre los estadios zoea y mysis que en los estadios poslarva. Por su parte, Robertson *et al.* (1998) reportaron que la cepa STD3-101, correspondiente a *V. harveyi*, fue patogénica a partir de una dosis de 10^5 cel·ml⁻¹ sobre larvas zoea de *Penaeus vannamei* expuestas durante dos horas a la bacteria. Aguirre-Gúzman *et al.* (2010) utilizaron el método de inmersión para imitar las condiciones naturales a las cuales el camarón está expuesto a la bacteria. Con ello, generaron mortalidades significativas y presencia de signos de vibriosis en juveniles de camarón blanco expuestos durante dos horas a una dosis de 10^6 UFC·mL⁻¹ de la cepa HL57 correspondiente a *V. parahaemolyticus*. Roque *et al.* (2000) propusieron el uso de *Artemia* como vector para recrear la infección con *V. parahaemolyticus* en poslarvas de camarón blanco. Los autores encontraron que su modelo no fue reproducible, sin embargo, proponen que la bioencapsulación de patógenos en *Artemia* es un buen modelo ya que asegura el contacto directo entre el agente patógeno y el tracto digestivo de poslarvas. Un año más tarde, Sudheesh & Xu (2001) inyectaron intramuscularmente la cepa 25C correspondiente a *V. parahaemolyticus* en *P. monodon*. A través de este método, ellos reportaron que la cepa 25C es altamente

virulenta, con una dosis letal 50 (LD50) de 10^5 UFC·camarón⁻¹. Martin *et al.* (2004) encontraron un resultado similar al inyectar en la hemolinfa de camarones adultos de *Sicyonia ingentes* 10^6 UFC·camarón⁻¹ de *V. harveyi* y 10^4 UFC·camarón⁻¹ de *V. parahaemolyticus*, encontrando en todos los casos una mortalidad mayor al 50 % a las 168 h post-infección.

Además del método de infección es importante considerar la densidad inoculada, la especie y la cepa a evaluar. Con respecto a esto, Aguirre-Gúzman *et al.* (2001) reportaron la susceptibilidad de diferentes estadios larvarios del camarón blanco expuestos a cuatro cepas de *Vibrio*. Se encontró que *V. peneicida* fue la cepa más virulenta generando mortalidades significativas con respecto al blanco y a las otras cepas a la menor dosis empleada (10^3 UFC·mL⁻¹). Además sólo se observaron signos de vibriosis con las cepas de *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* y *V. peneicida*. Un resultado similar fue reportado por Thakur *et al.* (2003), quienes aislaron cepas de *Vibrio* a partir de camarones enfermos (*Penaeus monodon*) las cuales fueron probadas sobre organismos sanos con dosis entre 10^3 y 10^8 UFC·mL⁻¹. En general reportaron que la mortalidad dependió de la dosis y de la especie, siendo la cepa de *V. vulnificus* la más virulenta causando mortalidades significativas con todas las dosis empleadas entre las 24 y 96 h post-infección. Contrario a los dos trabajos anteriores Soto-Rodriguez *et al.* (2006) reportaron que a pesar de encontrar diferencias significativas en la mortalidad de larvas expuestas a *V. harveyi* y *V. cambelli* con respecto al blanco, no se presentaron diferencias significativas entre las cepas.

2. Terapias no fágicas en el tratamiento de vibriosis.

El uso de antibióticos contribuye a la selección de cepas resistentes o multirresistentes, principalmente por el manejo inadecuado (Karunasagar *et al.* 1994; Santiago *et al.*, 2009). Por lo anterior, se generó el interés por técnicas alternativas al uso de antibióticos para el control de vibriosis luminiscente en acuicultura como: probióticos, agua verde, disrupción de la comunicación celular (quorum-sensing), inhibición del crecimiento con ácidos grasos de cadena corta y polihidroxicanoatos

y fagoterapia (Defoird *et al.*, 2007). Cada técnica tiene sus ventajas y limitaciones, por lo cual un uso alternado de técnicas podría ser una buena opción para el biocontrol de patógenos, sin embargo, técnicas como la interrupción del quorum-sensing han sido evaluadas recientemente y sólo se cuentan con pruebas a nivel laboratorio; en contraste con el uso de probióticos y la fagoterapia las cuales han sido estudiadas desde hace tiempo y su efectividad ha sido probada en los sistemas de cultivo y humanos (Gatesoupe, 1999; Balcázar *et al.*, 2006; Defoird *et al.*, 2007).

Los probióticos son bacterias utilizadas para mejorar la salud de otros organismos (Balcázar *et al.*, 2006), ayudando en la prevención y profilaxis de infecciones bacterianas (Chythanya *et al.*, 2002; Vázquez *et al.*, 2005; Balcázar *et al.*, 2007; Balcázar & Rojas-Luna, 2007; Wang, 2007). Chythanya *et al.* (2002) utilizaron la cepa *Pseudomonas* I-2 en pruebas de antagonismo con células viables, productos extracelulares y pruebas de reto con larvas de camarón en contra de *Vibrio harveyi*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. damsela* y *V. vulnificus*. Ellos reportaron que la cepa tiene las propiedades necesarias para el biocontrol en el cultivo de camarón y que existe la posibilidad de usar el extracto obtenido con cloroformo a partir del sobrenadante de la cepa en el control de *Vibrio* spp. luminiscente en los sistemas de cultivo. Caso similar es reportado con la cepa de UTM126 correspondiente a *Bacillus subtilis*, la cual fue propuesta como un candidato prometedor al suprimir al patógeno *V. parahaemolyticus* en condiciones *in vitro* e *in vivo* (Balcázar & Rojas-Luna, 2007).

A pesar de que la aplicación de probióticos en acuicultura es una medida prometedora, es necesario un esfuerzo considerable de investigación para su aplicación, siendo la primera inquietud el destino de los probióticos en los cultivos de larvas y tracto intestinal de juveniles y adultos (Gatesoupe, 1999). Además, es necesario evaluar la mejor manera de introducción, dosis óptima y soluciones técnicas que permitan mantener al probiótico vivo en los pellets secos. Wang *et al.* (2008) mencionaron que constantemente se están encontrando nuevas especies y cepas específicas con potencial probiótico, pero que no se puede suponer que estas comparten la seguridad histórica de los probióticos tradicionales, por lo que es necesaria la aplicación de técnicas moleculares en la identificación de los nuevos

probióticos y con ello tener información más completa acerca de su calidad, seguridad y eficacia.

3. Fagoterapia.

La terapia de fagos como modelo experimental ha sido probada tanto en animales como humanos. En modelos animales hay una amplia variedad de organismos usados con este fin: ratones, pollos, ovejas, conejos, entre otros; para el tratamiento de infecciones con cepas de *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecium*. En la mayoría de los casos se reportó una reducción en los signos de las enfermedades y un aumento significativo en la supervivencia de los organismos (Carlton, 1999; Biswas *et al.*, 2002; García & López, 2002; Matsuzaki *et al.*, 2005; Fruciano, 2007). En estudios recientes se tiene un amplio intervalo de resultados positivos en la aplicación de fagos para humanos. Uno de estos estudios es el de Anne Bruttin & Harald Brüssow (2005) quienes utilizaron preparaciones del fago T4 administrada oralmente en voluntarios, los cuales no manifestaron signos de enfermedad alguna (Kropinski, 2006).

Sulakvelidze *et al.* (2001) mencionaron que a pesar de su poca aceptación, desde un inicio se han generado productos comerciales de los bacteriófagos. Dentro de los primeros productos están las preparaciones de bacteriófagos de d'Hérelle por parte de los laboratorios de L'Oréal y los lisados de fagos contra Staphylococci, Streptococci, *E. coli* y otras bacterias patógenas, por parte de la compañía Eli Lilly en Estados Unidos. A pesar de que la efectividad de estas preparaciones fue controversial, se continuó con la investigación, producción y el uso terapéutico de los fagos en Europa del Este y la Unión Soviética. Estas actividades se centraron en el Instituto de Bacteriófagos, Microbiología y Virología de Eliava (EIBMV) de la Academia de Ciencias de Georgia y el Instituto de Inmunología y Terapia Experimental de Hirsfeld (HIET) de la Academia de Ciencias de Polonia. En años recientes la FDA aprobó el uso de productos basados en bacteriófagos para el tratamiento de alimentos, dentro de los cuales se encuentran LISTEX™ P100 por

parte de la EBI Food Safety (Carlton *et al.*, 2005) y LMP 102 de OmniLytics Inc. los cuales son preparaciones de bacteriófagos específicos contra cepas de *Listeria monocytogenes*. El uso en humanos cuenta con pocas alternativas, como PhagoBioDerm™ producto de la empresa Intralytix y el producto denominado “Staphage Lysate” de los laboratorios Delmont en E.U.A., ambos específicos contra *S. aureus*.

En acuicultura la aplicación de fagos ha demostrado su efectividad para el tratamiento y profilaxis de algunos patógenos bacterianos. Park *et al.* (2000) encontraron que el uso de fagos en contra de infecciones de *P. plecoglossicida* es efectivo al aumentar la supervivencia de los organismos infectados hasta las 24 h de administración de los fagos. Además, sugieren que los fagos pueden ser usados como medida profiláctica al inhibir el crecimiento de las bacterias en el agua. Nakai & Park (2002) hicieron una revisión acerca del tratamiento de fagos sobre infecciones bacterianas de *Lactococcus garvieae* y *Pseudomonas plecoglossicida* sobre *Seliora quinqueradiata* y *Plecoglossus altivelis*. En ambos casos se reportó una mayor supervivencia en los peces infectados e inoculados con extractos de fagos (dosis entre 10^6 y 10^9 UFP·Pez⁻¹), respecto a los organismos infectados sólo con la bacteria. Además se observó un alto efecto protector incluso en peces que fueron inoculados con fagos hasta 24 h después de la infección con la bacteria.

En camaronicultura, Vinod *et al.* (2006) reportaron que el fago A aislado de cultivo larvario de camarón tiene un potencial para el biocontrol de *V. harveyi* al reducir hasta dos ordenes de magnitud la concentración de esta bacteria, logrando un aumento del 55 % en la supervivencia de los organismos. Asimismo, Karunasagar *et al.* (2007) encontraron que una combinación de los bacteriófagos Viha8 y Viha10 fue efectiva en el control las poblaciones de *V. harveyi* en los sistemas de crianza larvaria con un aumento de la supervivencia del 20.5 % con respecto a larvas sólo tratadas con los antibióticos oxitetraciclina y kanamicina.

III. JUSTIFICACIÓN

La fagoterapia como tratamiento antimicrobiano alternativo ha retomado gran interés principalmente por la capacidad de los fagos para eliminar bacterias resistentes a los antibióticos. Además se consideran inocuos para los organismos cultivados y los consumidores finales y su obtención se considera más rápida con respecto a la generación de un nuevo antibiótico. A pesar de que se ha demostrado el efecto benéfico de los fagos para reducir las mortalidades en los sistemas de cultivo es necesario realizar evaluaciones que permitan definir las mejores condiciones para su aplicación. Debido a esto, en el presente trabajo se evaluó la fagoterapia como medida preventiva y correctiva de la vibriosis en camarón a través de pruebas con valores de multiplicidad de infección (MOI) bajos, diferentes dosis y el retraso en la aplicación de la terapia usando como base un modelo de infección estandarizado que recrea la vibriosis en condiciones controladas.

IV. OBJETIVOS:

Objetivo general

Evaluar la eficacia de la terapia de fagos para prevenir y/o controlar los signos de infección y las mortalidades durante la vibriosis experimental en larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Objetivos específicos

1. Desarrollar un modelo estándar para reproducir la vibriosis en larvas de camarón blanco bajo condiciones controladas
2. Seleccionar una cepa de *Vibrio* que induzca signos de vibriosis y mortalidad en larvas de camarón blanco.
3. Evaluar el efecto de extractos crudos de fagos durante la vibriosis experimental en larvas de camarón blanco.
4. Evaluar el efecto de la dosis y el retraso en la aplicación del tratamiento sobre la efectividad de los fagos como medida terapéutica.

V. HIPÓTESIS:

En condiciones naturales el control de las poblaciones de *Vibrio* parece estar sujeto a un control mediado por fagos líticos a través de infecciones periódicas. Se ha observado que la aplicación de fagos líticos en el cultivo larvario de camarón mejora la supervivencia. De esto se colige que la aplicación de fagos líticos específicos para cepas patógenas de *Vibrio* reducirá significativamente la presencia de signos clínicos y mortalidades en larvas de camarón blanco durante vibriosis inducida de forma experimental.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMOS

1.1 Bacterias

Se usaron dos cepas de *Vibrio harveyi* y dos de *Vibrio parahaemolyticus*. Las cepas ATCC 14126 (*V. harveyi*) y ATCC 17802 (*V. parahaemolyticus*) fueron obtenidas directamente de la colección American Type Culture Collection (ATCC). Estas cepas fueron recibidas en forma de liofilizado, y para su reactivación fueron inoculadas en caldo de infusión cerebro y corazón (BHI - DIFCO™) e incubadas a 35° C. Una vez reactivadas fueron mantenidas en el mismo caldo adicionado con glicerol al 50 % a -50°C. Las cepas EC11 (*V. harveyi*) y PS-017 (*V. parahaemolyticus*), proporcionadas por el Dr. Jose L. Balcázar (ICRA España), estas cepas fueron aisladas de juveniles de *L. vannamei* enfermos en Ecuador (Balcázar y Rojas-Luna, 2007) y pertenecen a la colección del Laboratorio de Acuicultura de la Universidad Técnica de Machala, Ecuador. Durante el presente estudio también se usaron dos cepas luminiscentes de *V. harveyi* denominadas Lum1 y Lum2, las cuales fueron aisladas del laboratorio de producción de poslarvas de Acuicultura Mahr (Pichilingue B.C.S. Mexico) durante operaciones normales de producción a partir de muestras de larvas y pertenecen a la colección del Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de CICIMAR. Todas las cepas fueron reactivadas en 5 mL de caldo marino (CM) estéril a 30 °C durante 24 h. Para los experimentos las cepas fueron cultivadas en placas de agar marino (AM), incubadas a 30° C y cosechadas a las 24 h. Con las células recién cosechadas se ajustó la densidad óptica (DO) a 1 a 585 nm. El número de UFC a esa concentración equivale a: $1 \cdot 10^8$ UFC·ml⁻¹. En el caso de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 se utilizó el medio de cultivo TSB para la obtención de biomasa.

1.2 Fagos

Los fagos F8 y F12, específicos contra *V. harveyi*, fueron obtenidos de muestras de agua de la Ensenada de La Paz (Quiróz-Guzman, 2005). En el caso de los fagos específicos para *V. parahaemolyticus*, el fago A3S fue aislado de larvas sanas de camarón blanco en estadio Zoea (Makarov, 2008), mientras que el fago vpms1 fue aislado de muestras de almeja chocolata *Megapitaria squalida* y pertenece a la colección de fagos del Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular. Los fagos se mantuvieron criopreservados en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de CICIMAR. El aislamiento se realizó mediante la técnica de enriquecimiento, brevemente muestras de 25 mL de agua fueron centrifugadas a 1783.6 xg por 30 min. Se tomó 1 mL de sobrenadante y se añadió a un cultivo en crecimiento de 8 h de la bacteria blanco contenido en 5 mL de CM dejándose en incubación a una temperatura de 30 °C durante 8-12 h. La mezcla se centrifugó a 1783.6 xg por 30 min a 4 °C para eliminar el botón celular y el sobrenadante se filtró con una membrana de 0.2 µm. La presencia de fagos se corroboró por la formación de placas o calvas sobre una película de la bacteria blanco, ello se obtuvo inoculando 13 µL del filtrado sobre una placa de AM inoculada masivamente con la bacteria blanco. Para la purificación de los fagos, se tomaron placas individuales obtenidas por dilución y se utilizó el proceso de enriquecimiento para aumentar el número de partículas virales.

1.3 Microalga

Un cultivo de la cepa CHCAL-5 (*Chaetoceros calcitrans*) de la colección de microalgas del CIBNOR (La Paz B.C.S. México), fue mantenido por una semana en incubación a 25 °C con un fotoperiodo de 12:12 h luz-oscuridad. El cultivo se inició con 1 mL de inóculo en 10 mL de medio F/2 estéril. Cada día las células fueron resuspendidas mediante agitación manual (aproximadamente 5 segundos). El cultivo fue sembrado por estría cruzada en placas de petri con agar F/2 (10 %) para lograr el aislamiento de la microalga y en TSA (2.5% NaCl) para cultivar a las bacterias asociadas al cultivo. Por su parte, la microalga *C. muelleri* fue proporcionada por

CENAIM-ESPOL, Ecuador y la microalga *Thalassiosira weissflogii* fue proporcionada y cultivada por el laboratorio de microalgas de la empresa BIOGEMAR, Ecuador.

1.4 Producción masiva de fagos

Cultivos frescos de cada cepa en AM fueron cosechados a las 24 h de incubación (30° C) e inoculadas en matraces con 1 L de caldo marino. Al mismo tiempo, se adicionaron 10 µL de cada uno de los bacteriófagos de prueba y los matraces se incubaron a 30° C durante 48 h. Transcurrido este tiempo, se agregaron 10 mL de cloroformo a cada matraz y se dejaron reposando por 30 min a 12 °C para eliminar las bacterias no lisadas. El exceso de cloroformo fue descartado por decantación y el sobrenadante fue centrifugado a 1783.6 xg 30 min a 4 °C. El sobrenadante se recuperó por decantación y fue filtrado a través de un filtro de 0.2 µm.

2. CINÉTICA DE INFECCIÓN DE LOS FAGOS.

El efecto de los fagos sobre el crecimiento de las cepas se evaluó en medio líquido. Para ello, se agregaron 25 µL de *V. harveyi* (cepas 14126 y EC11) ajustada a una DO de 1 a 585 nm (SpectraQuant, Merck) en tubos de ensaye con tapón de rosca con 10 mL de CM. Simultáneamente se adicionaron los fagos F8 y F12 a una concentración de $1 \cdot 10^6$ UFP·mL⁻¹. Las muestras fueron incubadas a 30 °C en baño maría y se realizaron lecturas cada 30 min hasta cumplir 12 h de incubación. Los fagos usados en este experimento fueron obtenidos como se describió en la sección (1.4) con la adición de cloroformo, pero un segundo concentrado fue obtenido sin la adición de cloroformo e igualmente se empleó en la cinética de infección.

En el caso de los fagos vpms1 y A3S se realizó una prueba de gota en TSA y AM para descartar un efecto por el medio de cultivo. Una vez seleccionado el medio de cultivo se evaluó la cinética de los fagos A3S y vpms1. Para ello se inoculó, por

triplicado, 10 mL de CM con *V. parahaemolyticus* hasta llegar a una DO de 0.12 ± 0.05 a 585 nm y fagos a una concentración de $1 \cdot 10^6$ UFP·mL⁻¹. Las muestras fueron incubadas a 30 °C en baño maria. Se realizaron lecturas cada hora hasta cumplir 8 h de incubación.

Se realizaron pruebas previas de Kolmogorov-Smirnov y Cochran a los valores de absorbancia y posteriormente se analizaron mediante ANOVA de una vía para medir el efecto del tiempo. Se utilizaron comparaciones múltiples de Tukey para conocer en que tiempo la reducción en la absorbancia fue significativa con respecto al control.

3. DESARROLLO DE UN MODELO DE INFECCIÓN PARA REPRODUCIR LA VIBRIOSIS EN LARVAS DE CAMARÓN

3.1 Estandarización de condiciones para el mantenimiento de larvas

I. Evaluación de dos fuentes de agua y densidad de larvas

Las larvas de camarón fueron recolectadas individualmente mediante una pipeta Pasteur, con cuidado de no generar daños físicos, e introducidas en unidades experimentales con 100 mL de AM estéril en estadio nauplio V. Se evaluaron dos fuentes de agua: agua de mar natural estéril (AMNe) y agua de mar artificial estéril (AM Ae) (Coral Reef). Simultáneamente se colocaron 10, 50 y 100 larvas por cada unidad experimental para evaluar el efecto de la densidad. Las unidades experimentales fueron mantenidas sin aireación ni recambio de agua, en una incubadora sin iluminación durante 48 h a 30 °C. Se realizó el registro de la supervivencia a las 24 y 48 h.

Debido a que los datos de supervivencia no presentaron normalidad ni homocedasticidad, estos fueron analizados mediante Kruskal-Wallis para medir el efecto de la densidad. Además de la supervivencia también se consideró el estadio de desarrollo.

II. Evaluación de diferentes alimentos para mantenimiento de las larvas

Se registró la supervivencia de larvas de camarón en unidades experimentales durante un periodo de mantenimiento en el que se les proporcionaron diferentes dietas y con diferentes dosis. Los alimentos utilizados fueron Royal Caviar®, levadura de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*), una mezcla de harinas de cereal Nestum®, una mezcla de harinas fermentadas por bacterias (Carmona, 2010), y las microalgas *Chaetoceros calcitrans*, *C. muelleri* y *Thalassiosira weissflogii*. Para cada caso, 100 larvas en estadio nauplio V fueron colocadas en unidades experimentales con 100 mL de AMAe. A cada unidad se le agregó la dosis correspondientes de alimento (evaluando cada alimento y dosis por triplicado) y se mantuvieron a 30 °C durante al menos 24 h. Al final del experimento, se registró el estadio de desarrollo y la supervivencia de las larvas. Las dosis probadas con cada alimento se resumen en la tabla I.

En los experimentos donde la supervivencia fue mayor a cero se realizaron pruebas previas de Kolmogorov-Smirnov y Cochran. Posteriormente se analizaron mediante ANOVA de una vía y se utilizaron comparaciones múltiples de Tukey para detectar diferencias significativas. Además de la supervivencia se consideró el estadio de desarrollo y la presencia de alimento en el tracto digestivo.

Tabla I. Dosis de alimento empleadas en la alimentación de larvas de camarón blanco en unidades experimentales con 100 mL de agua de mar artificial.

Experimento	Tratamiento	Royal C (mg·mL ⁻¹)	Nestum® (mg·mL ⁻¹)	HFB (mg·mL ⁻¹)	<i>S. cerevisiae</i> (cel·mL ⁻¹)	<i>C. calcitrans</i> (cel·mL ⁻¹)	<i>C. muelleri</i> (cel·mL ⁻¹)	<i>T. weissflogii</i> (cel·mL ⁻¹)
1	T1	32.5	-	-	-	30 000	-	-
	T2	65	-	-	-	60 000	-	-
	T3	130	-	-	-	100 000	-	-
2	T1	60	60	-	-	100 000	-	-
	T2	12	12	-	-	-	-	-
	T3	6	6	-	-	-	-	-
3	T1	2.8	2.8	2.8	-	100 000	-	-
	T2	2	2	2	-	-	-	-
	T3	1.1	1.1	1.1	-	-	-	-
4	T1	-	-	-	400 000	100 000	-	-
	T2	-	-	-	200 000	-	-	-
	T3	-	-	-	100 000	-	-	-
	T4	-	-	-	50 000	-	-	-
	T5	-	-	-	25 000	-	-	-
5	T1	-	-	-	-	100 000	100 000	100 000

III. Reducción del número de bacterias asociadas en el alimento vivo y en las larvas de camarón blanco

a) Reducción de la carga bacteriana en el cultivo de *C. calcitrans*

Para reducir la carga de bacterias en la microalga, se pasaron 10 mL de cultivo fresco fueron filtrados a través de filtros Whatman GF/A de 1.6 μm previamente esterilizados. Los filtros fueron lavados con 10 mL de medio F/2 estéril durante 10 ocasiones para eliminar la mayor parte de bacterias asociadas. Posteriormente con un asa estéril se tomó una muestra de células de la superficie del filtro y se hizo una siembra por estría cruzada en agar F/2. Se adicionó una segunda capa de agar F/2 suave (4% a 30 °C aprox.). A la par se realizó la inoculación de la muestra en tubos de ensaye con tapón de rosca con 10 mL de caldo F/2 y se mantuvo en incubación a 25 °C con un fotoperiodo de 12:12 h luz-oscuridad durante siete días. Para eliminar a las bacterias asociadas se probaron seis concentraciones de ampicilina (160, 80, 40, 20, 10 y 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), eritromicina (160, 80, 40, 20, 10 y 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y cloranfenicol (80, 40, 20, 10, 5 y 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), las pruebas se realizaron en tubos con 10 mL de caldo F/2 previamente inoculados con 0.5 mL de cultivo fresco de la microalga (aprox. $2.5\cdot 10^5$ cel). Los tubos fueron mantenidos en las condiciones previamente descritas.. El inóculo de microalga usado en esta prueba fue sometido al mismo proceso de limpieza descrito anteriormente, con el objetivo de reducir la carga bacteriana. Al séptimo día se realizó una evaluación en placas de TSA (2.5 % NaCl) para determinar la presencia de bacterias en los tubos que mostraron crecimiento de microalgas.

b) Reducción de la carga bacteriana en larvas de camarón blanco

Para disminuir la carga bacteriana en las larvas de camarón se evaluó la desinfección con dióxido de cloro (ClO_2) (TWINOXIDE® 0.3% SOLUTION). Para ello los organismos fueron expuestos a concentraciones de 0.03, 0.15, 0.3 y 1.5 ppm ($1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} = 1\text{ppm}$) y a 1, 3, 5 y 10 minutos de exposición. En cada caso los organismos fueron concentrados en un tamiz de $35\ \mu\text{m}$ y sumergidos en la solución correspondiente. Al finalizar el tiempo de exposición, se realizó un lavado con una solución de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) $0.6\ \mu\text{M}$ para neutralizar los restos de cloro; finalmente los organismos fueron enjuagados con AMNe durante 10 seg. De cada tratamiento, 100 organismos fueron introducidos en unidades experimentales con 100 mL de AMAe e incubados a $30\ ^\circ\text{C} \pm 1\ ^\circ\text{C}$ por 24 h. Transcurrido este periodo se registró la supervivencia de los organismos y se realizaron observaciones al microscopio para descartar daño estructural debido al tratamiento. La selección de la dosis y tiempo de aplicación se realizó mediante el análisis de superficie de respuesta tomando en cuenta la supervivencia. Una vez seleccionada la dosis y el tiempo de tolerancia de las larvas al desinfectante, se corroboró la disminución de la carga bacteriana. Se tomaron 100 larvas tratadas con 0.3 ppm de ClO_2 a 4, 8 y 12 min de exposición y fueron maceradas con un disruptor de tejidos estéril. Por triplicado, se realizaron diluciones decimales seriadas para cada muestra, tomando $13\ \mu\text{L}$ de cada dilución para realizar la siembra masiva en AM. Las placas fueron incubadas durante 24 h a $30\ ^\circ\text{C}$ y transcurrido el periodo de incubación se registró el número de colonias para estimar el número de UFC por larva.

Se realizaron pruebas previas de Kolmogorov-Smirnov y Cochran a los datos de supervivencia. Posteriormente datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía y se utilizaron comparaciones múltiples de Tukey para conocer las diferencias entre los tratamientos. Aunado a la supervivencia se usaron como criterios el estadio de desarrollo y la presencia de signos de vibriosis.

3.2 Evaluación de la virulencia de *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*

I. Aclimatación y mantenimiento de las larvas

Las larvas de camarón blanco *L. vannamei* usadas en los experimentos fueron proporcionados por los laboratorios comerciales Acuacultura Mahr, La Paz, B.C.S. México y BIOGEMAR Salinas, Ecuador. En ambos casos, los nauplios provenían de varias hembras puestas a desovar simultáneamente en tanques de 1000 L. Las larvas de Acuacultura Mahr en estadio nauplio IV-V fueron sometidas a un tratamiento de ClO_2 a una concentración de 0.3 ppm durante 5 min para la reducción de la carga bacteriana. Las larvas de BIOGEMAR S.A. únicamente se sometieron a un lavado con AMNe durante 20 segundos. Las larvas en estadio nauplio IV-V, en grupos de 100 organismos, se introdujeron asépticamente en las unidades para experimentación (cajas para cultivo de tejidos con 100 mL de AMAe) y fueron incubadas a $30\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h con la adición de la microalga *C. calcitrans* o *T. weissflogii* a una dosis de $1 \cdot 10^4\text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$. Durante las 96 h de la fase experimental las unidades se mantuvieron sin aireación, sin iluminación, a $30\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ y con la adición diaria de la microalga *C. calcitrans* o *T. weissflogii* a una dosis de $1 \cdot 10^5\text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$.

II. Efecto del dióxido de cloro sobre la estandarización del modelo de infección

Se probó el efecto del ClO_2 sobre las infecciones experimentales. Para ello, se ajustaron las cepas 14126, EC11, 17802 y PS-017 una DO de 1 a 585 nm que equivale aproximadamente a una concentración $1 \cdot 10^8\text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$. Para corroborar la concentración de bacterias utilizadas en el bioensayo, de forma paralela se llevaron a cabo conteos en placa en agar TCBS, las placas se incubaron a $35\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24-48 h y al final del periodo de incubación se hicieron los conteos (Labrie *et al.*, 2003). Se tomaron dos lotes de larvas, unas tratadas con ClO_2 a 0.3 ppm durante 5 min y otro sin tratamiento de ClO_2 . Ambos lotes fueron infectados con las cepas de bacterias a

través de la adición directa de cada cepa a una dosis de $2 \cdot 10^6$ UFC·ml⁻¹ en las cajas de cultivo. Los organismos se mantuvieron acorde a la sección 3.2.I. con la microalga *C. calcitrans*. Al término del bioensayo se realizó el conteo de larvas, estadio de desarrollo y se registraron los signos de vibriosis en cada caso.

III. Selección de la cepa patógena

Para reproducir la vibriosis experimentalmente se probaron por separado diferentes cepas aisladas durante brotes infecciosos y cepas de referencia de *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*. Para ello, las cepas de bacteria fueron cultivadas en AM, incubadas a 30°C y cosechadas a las 24 h para la infección experimental. La densidad celular se ajustó a una DO de 1 a 585 nm. Con las suspensiones de cada bacteria se inocularon unidades experimentales que contenían larvas previamente aclimatadas, a una dosis de $2 \cdot 10^6$ UFC·mL⁻¹. El blanco fueron unidades experimentales con larvas sin la exposición a bacterias. Los organismos se mantuvieron acorde a la sección 3.2.I. con la microalga *C. calcitrans* o *Thalassiosira weissflogii*. Al final del bioensayo se realizó el conteo de larvas, estadio de desarrollo y se registraron los signos de vibriosis en cada caso. En las tres primeras infecciones experimentales no se utilizó el desinfectante ClO₂, en la cuarta infección experimental se observó el efecto del dióxido de cloro sobre la estandarización del modelo de infección (sección 3.2.II) y en las últimas infecciones experimentales se utilizó el desinfectante ClO₂ a una concentración de 0.3 ppm durante 5 min. Adicionalmente se realizó la descripción de las principales regiones del cuerpo de zoea II (Figura 1) donde se observan los signos de vibriosis en los organismos.

Se realizaron pruebas previas de Kolmogorov-Smirnov y Cochran a los datos de supervivencia. Posteriormente datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía para medir el efecto de cada cepa y se utilizaron comparaciones múltiples de Tukey para conocer las diferencias entre ellas. Aunado a la supervivencia se usaron como criterios el estadio de desarrollo y la presencia de signos de vibriosis.

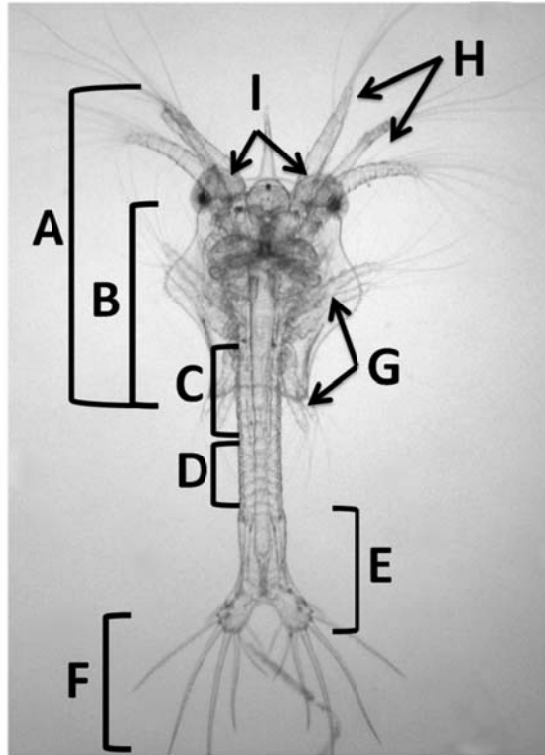


Figura 1. Principales regiones del cuerpo de zoea II señaladas en la descripción de los signos de vibriosis. A) Región cefálica; B) Caparazón; C) Tórax dividido en seis segmentos; D) Abdomen dividido en seis segmentos; E) Lóbulos furcales; F) Espinas furcales; G) Maxilas y maxilípedos; H) Primera y segunda antena y I) Ojos.

IV. Evaluación del efecto de la dosis de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 en la supervivencia de larvas.

En esta evaluación se emplearon cinco densidades de bacteria $2 \cdot 10^5$, $6 \cdot 10^5$, $1 \cdot 10^6$, $1.5 \cdot 10^6$ y $2 \cdot 10^6$ UFC·mL⁻¹, tomando como densidad máxima la dosis usada en la selección de la cepa patógena (sección 3.2.III). Las larvas, previamente aclimatadas, fueron infectadas con cada una de las densidades a través de la adición directa en las unidades experimentales. El tratamiento blanco constó de larvas sin la exposición a la bacteria. Los organismos se mantuvieron acorde a la sección 3.2.I. con la microalga *C. calcitrans*. Al final del experimento, se realizó la evaluación de la supervivencia, estadio de desarrollo y en cada caso se registraron los signos de vibriosis.

Una vez seleccionada la dosis necesaria para recrear la vibriosis, se procedió a confirmar el valor. Las larvas previamente aclimatadas fueron infectadas con las cepas EC11 (*V. harveyi*), 17802 y PS-017 (*V. parahaemolyticus*) a través de la adición directa en las unidades experimentales con una dosis de $2 \cdot 10^6$ UFC·ml⁻¹ (cepas EC11 y PS-017 fueron empleadas como control). El tratamiento blanco constó de larvas sin la exposición a bacterias. Los organismos se mantuvieron acorde a la sección 3.2.I. con la microalga *T. weissflogii*. Transcurrido el periodo de tiempo, se realizó el conteo de la supervivencia, estadio de desarrollo y registro de signos de vibriosis en cada caso.

Se realizaron pruebas previas de Kolmogorov-Smirnov y Cochran a los datos de supervivencia. Posteriormente datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía para medir el efecto de cada densidad y se utilizaron comparaciones múltiples de Tukey para conocer las diferencias entre ellas. Aunado a la supervivencia se usaron como criterios el estadio de desarrollo y la presencia de signos de vibriosis.

V. Cinética de infección con *V. parahaemolyticus*

Para la obtención de la cinética, las larvas zoea I fueron expuestas a la cepa 17802 con una dosis de $2 \cdot 10^6$ UFC·mL⁻¹. Los organismos se mantuvieron acorde a la sección 3.2.I. con la microalga *T. weissflogii*. A las 6, 12, 24, 36, 48, 72 y 96 h post infección se retiraron tres unidades experimentales para el registro de la supervivencia, estadio de desarrollo y presencia de signos de vibriosis. Se realizaron pruebas previas de Kolmogorov-Smirnov y Cochran para determinar la normalidad y homocedasticidad de los datos. Posteriormente estos fueron analizados a través de ANOVA de una vía y se usaron comparaciones múltiples de Tukey, además se obtuvo el mejor modelo que describe el comportamiento de los datos. Aunado a la supervivencia se usaron como criterios el estadio de desarrollo y la presencia de signos de vibriosis.

4. FAGOTERAPIA

4.1 Evaluación del efecto de la suspensión de fagos vpms1 y A3S sobre vibriosis

En esta sección se utilizaron suspensiones de los fagos vpms1 y A3S previamente evaluadas con respecto a su viabilidad y número de UFP's por mililitro. Para evaluar el efecto de las suspensiones, larvas previamente aclimatadas fueron expuestas a la bacteria *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 a una dosis de $2 \cdot 10^6$ UFC·mL⁻¹ e inoculadas con 100 µL de fago A3S o vpms1. Los organismos se mantuvieron acorde a la sección 3.2.I. con la microalga *C. calcitrans*. A las 96 h, se realizó el conteo de larvas, estadio de desarrollo y registro de signos de vibriosis en cada caso.

Se realizaron pruebas previas de Kolmogorov-Smirnov y Cochran a los datos de supervivencia. Posteriormente datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía para medir el efecto de cada cepa de fago y se utilizaron comparaciones múltiples de Tukey para conocer las diferencias entre ellas. Aunado a la supervivencia se usaron como criterios el estadio de desarrollo y la presencia de signos de vibriosis.

4.2 Dosis efectiva del fago vpms1

Las larvas fueron infectadas experimentalmente con *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 a través de exposición directa a una dosis de $2 \cdot 10^6$ UFC·mL⁻¹. Al mismo tiempo, se adicionaron 100, 200, 400 y 800 µL de suspensión del fago vpms1 a las unidades. El tratamiento blanco constó de larvas sin la exposición a bacterias o fagos y el tratamiento negativo contó sólo con la adición de bacteria. Los organismos se mantuvieron acorde a la sección 3.2.I. con la microalga *T. weissflogii*. A las 96 h, se registró la supervivencia, estadio de desarrollo y presencia de signos de vibriosis en cada caso.

Previamente los datos de supervivencia de vpms1 fueron analizados con Kolmogorov-Smirnov y Cochran. Posteriormente datos fueron analizados mediante

ANOVA de una vía para medir el efecto de la dosis y se utilizaron comparaciones múltiples de Tukey para conocer las diferencias entre ellas. En el caso de A3S los datos no presentaron normalidad ni homocedasticidad, por lo cual fueron analizados mediante Kruskal-Wallis para medir el efecto de la dosis. En ambos casos, además de la supervivencia se usaron como criterios el estadio de desarrollo y la presencia de signos de vibriosis.

4.3 Efecto de la suspensión de fago vpms1 sobre larvas de camarón

Las larvas previamente aclimatadas en unidades experimentales fueron adicionadas con 100, 300, 600 y 1200 μL de la suspensión de vpms1, dejando como blanco unidades sin la adición de la suspensión. Los organismos se mantuvieron acorde a la sección 3.2.I. con la microalga *C. calcitrans*. A las 96 h, se realizó el conteo de la supervivencia, estadio de desarrollo y registro de signos de vibriosis en cada caso.

Se realizaron pruebas previas de Kolmogorov-Smirnov y Cochran a los datos de supervivencia. Posteriormente datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía para medir el efecto de cada dosis y se utilizaron comparaciones múltiples de Tukey para conocer las diferencias entre ellas. Aunado a la supervivencia se usaron como criterios el estadio de desarrollo y la presencia de signos de vibriosis.

4.4 Tiempo de aplicación

En esta sección, larvas zoea I fueron expuestas a la cepa 17802 con una dosis de $2 \cdot 10^6 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$, dejando como blanco tres unidades sin la adición de la bacteria. A las 0, 6, 12, 24 y 36 h post infección se inocularon tres unidades experimentales con 100 μL de la suspensión de vpms1. Los organismos se mantuvieron acorde a la sección 3.2.I. con la microalga *C. calcitrans*. Transcurridas las 96 h del experimento, se realizó el conteo de la supervivencia, estadio de desarrollo y registro de signos de vibriosis en cada caso.

Se realizaron pruebas previas de Kolmogorov-Smirnov y Cochran a los datos de supervivencia. Posteriormente datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía para medir el efecto del tiempo y se utilizaron comparaciones múltiples de Tukey para conocer las diferencias entre ellos. Aunado a la supervivencia se usaron como criterios el estadio de desarrollo y la presencia de signos de vibriosis.

VII. RESULTADOS

Bacterias y fagos

– *Vibrio harveyi*

En la colección de fagos del laboratorio de Microbiología se cuentan con dos vibriófagos específicos para *Vibrio harveyi* (14126 ATCC) denominados F8 y F12, los cuales fueron seleccionados como potenciales fagos líticos. En las figuras 2 y 3 no se observan diferencias entre las cinéticas de los fagos obtenidos con o sin la adición de cloroformo; por lo cual se descarta un efecto del compuesto sobre los fagos. En la determinación de UFP se encontró una concentración máxima de $4.73 \cdot 10^5$ UFP·mL⁻¹ para F12 y $2.34 \cdot 10^5$ UFP·mL⁻¹ para F8.

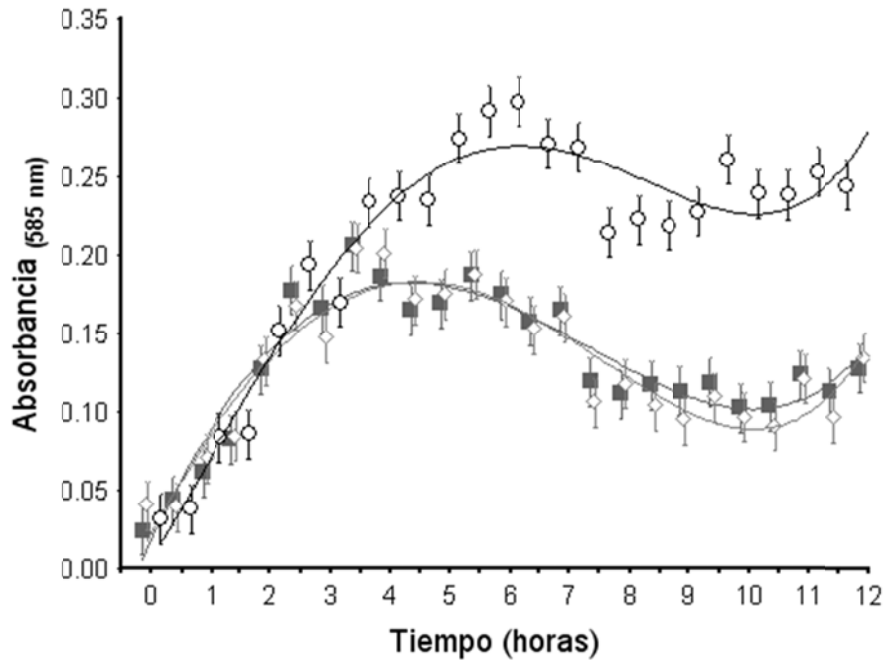


Figura 2. Cinética del vibriófago F8. ■ F8 – con cloroformo; ◇ F8 – sin cloroformo; y ○ Control – 14126. Los puntos representan la media \pm SD.

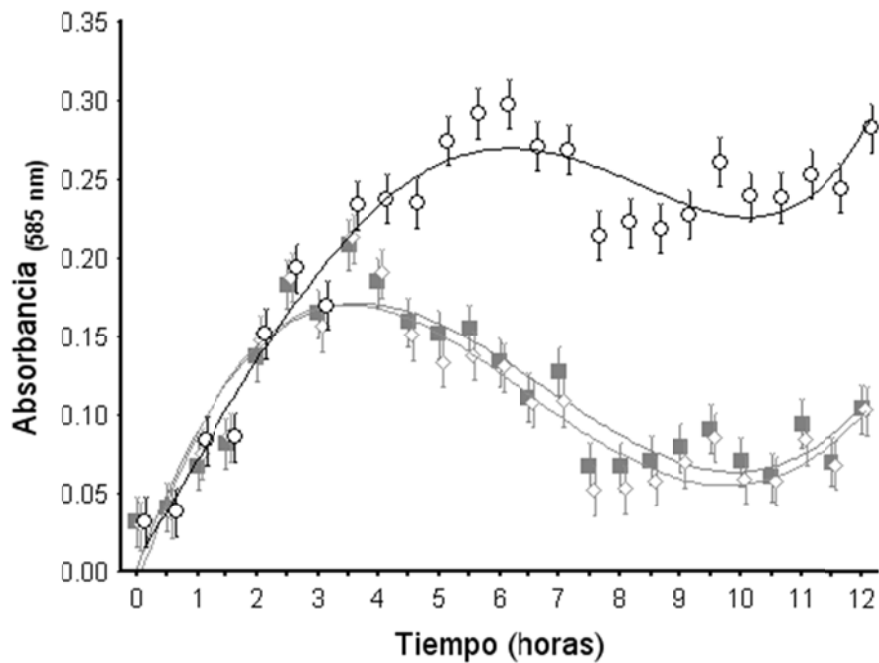


Figura 3. Cinética del vibriófago F12. ■ F12 – con cloroformo; ◇ F12 – sin cloroformo; y ○ Control – 14126. Los puntos representan la media \pm SD.

– *Vibrio parahaemolyticus*

Para obtener una mayor biomasa de *V. parahaemolyticus* se realizó el cultivo de la cepa 17802 en dos medios de cultivo: caldo marino (CM) y caldo tripticasa de soya (TSB). En la figura 4 se observa que el máximo valor de absorbancia se presenta entre la séptima y la octava hora en medio CM, mientras que a partir de la cuarta hora en TSB la bacteria llega a su máximo valor de absorbancia. Al obtenerse mayores valores de absorbancia en menor tiempo en CM y aunado a la nula sedimentación de partículas como carbonatos, se decidió emplear este medio para la producción de la bacteria.

Antes de realizar la cinética de los fagos vpms1 y A3S se realizó una prueba de gota en agar marino (AM) y agar tripticasa de soya (TSA). Esta prueba consiste en poner 13 μL de suspensión de fagos sobre un crecimiento masivo de la bacteria. En ambos casos se observó la formación de placas (halos de inhibición por fagos) sobre el cultivo masivo de la cepa 17802 en AM y TSA, lo cual descartó un efecto asociado al medio de cultivo. Los extractos crudos obtenidos en TSB presentaron una concentración de $7.6 \cdot 10^8$ UFP $\cdot\text{mL}^{-1}$ para vpms1 y $3.4 \cdot 10^7$ UFP $\cdot\text{mL}^{-1}$ para A3S. En la cinética de crecimiento se observó que ambos fagos disminuyen la absorbancia de la bacteria debido a la ruptura celular generada al final del ciclo de replicación lítico (Figura 5). También se observó que el fago A3S genera una disminución de la absorbancia cercana a cero a partir de la segunda hora, mientras que vpms1 logra una disminución cercana a cero a partir de la octava hora.

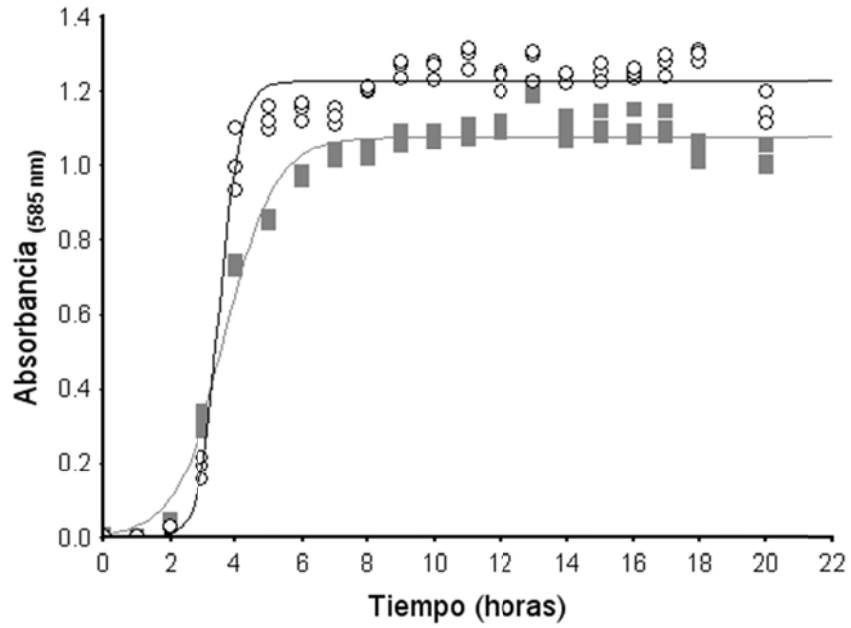


Figura 4. Cinética de crecimiento de *V. parahaemolyticus* en medio de cultivo CM (○) y TSB (■) durante 20 h.

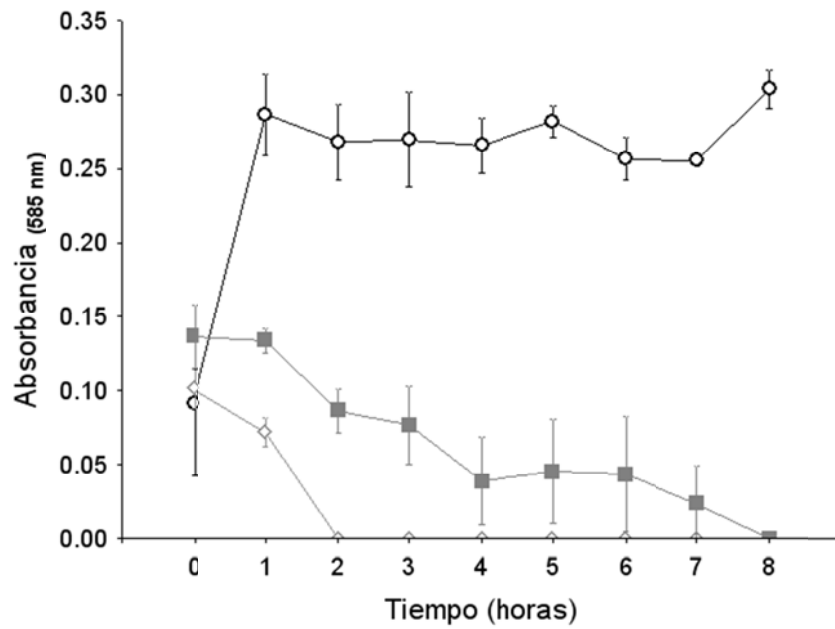


Figura 5. Cinética de los vibriófagos vpms1 (■) y A3S (◇), con la cepa 17802 de *Vibrio parahaemolyticus* (○) en medio de cultivo TSB durante 8 h. Los puntos representan la media \pm SD.

Estandarización de Condiciones para el Mantenimiento de Larvas

Evaluación de dos fuentes de agua y densidad de larvas

Las larvas presentan una mortalidad del 100 % a las 24 h de incubación en AMNe, mientras que las larvas en AMAe presentan una mortalidad menor al 3 % a este mismo tiempo (Tabla II). A pesar de que a las 48 h se observa una mortalidad del 100 % en AMAe, esto es atribuido a la falta de alimento. Con respecto a las densidades en AMAe (tabla II) no se encontró diferencia significativa con el análisis de Kruskal-Wallis ($p > 0.05$), sin embargo se decidió utilizar la densidad de 100 larvas $\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ de AMAe en las pruebas posteriores.

Tabla II. Supervivencia de larvas incubadas en dos tipos de agua y tres densidades de organismos.

Tiempo (horas)	Densidad (org $\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$)	AMAe	AMNe
		Sup. (%) \pm SD	Sup. (%) \pm SD
24	10	98.6 \pm 2.31	0.00 \pm 0.0
	50	99.3 \pm 1.15	0.00 \pm 0.0
	100	100.0 \pm 0.0	0.00 \pm 0.0
48	10	0.00 \pm 0.0	0.00 \pm 0.0
	50	0.00 \pm 0.0	0.00 \pm 0.0
	100	0.00 \pm 0.0	0.00 \pm 0.0

Sup. (%): Supervivencia promedio en porcentaje \pm SD: desviación estándar.

Evaluación de diferentes alimentos para el mantenimiento de larvas

En el primer ensayo se empleó el alimento Royal Caviar ® de 5 - 50 µm y la microalga *C. calcitrans*. Todas las larvas alimentadas con la microalga *C. calcitrans* presentaron una supervivencia mayor al 98 % hasta el final del experimento (Tabla III). No se encontró diferencia significativa, a través de Kruskal-Wallis ($p > 0.05$), para las densidades empleadas. Sin embargo, se observaron diferencias en el estadio de desarrollo para cada densidad de microalga utilizada, siendo la concentración de $1 \cdot 10^5$ cel·mL⁻¹ con la cual las larvas alcanzaron el estadio zoea III, máximo estadio de desarrollo observado. El alimento comercial Royal Caviar presentó una mortalidad del 100 % a las 24 h de su administración que posiblemente se debió a un exceso de alimento, lo cual fue observado como una alta turbidez en las unidades y adhesión de partículas en los organismos.

Tabla III. Supervivencia de larvas alimentadas con tres densidades de *C. calcitrans* por un periodo de 96 h.

Tiempo (horas)	Dosis de microalga (cel·mL ⁻¹)		
	3·10 ⁴	6·10 ⁴	1·10 ⁵
24	100.0 ± 0.0	99.3 ± 1.15	99.0 ± 1.0
48	100.0 ± 0.0	99.0 ± 1.0	98.3 ± 2.08
72	99.3 ± 1.15	98.7 ± 1.53	98.0 ± 1.73
96	98.0 ± 2.0	98.7 ± 1.53	98.0 ± 1.73

Sup. (%): Supervivencia promedio en porcentaje ± SD: desviación estándar.

En la segunda prueba de alimento se empleó la mezcla de harinas fermentadas, Nestum ® y Royal Caviar ® de 5 – 50 µm. En todos los casos se presentó una mortalidad del 100 % a las 24 h, lo cual fue atribuido a la concentración utilizada, ya que se observó una alta turbidez en las unidades y adhesión de partículas de

alimento en los organismos. Debido a lo anterior se realizó una prueba para conocer la turbidez en AMA para cada alimento. En la tabla IV se muestran las nuevas dosis y su absorbancia a 585 nm, de las cuales se tomaron las concentraciones de 2.8, 2.0 y 1.1 mg·mL⁻¹ en la siguiente prueba de alimento. Con las nuevas dosis, se observó nuevamente una mortalidad del 100 % a las 24 h, además de presentarse adhesión de partículas de alimento en varias regiones del cuerpo.

Tabla IV. Dosis y absorbancias de los alimentos Nestum®, Royal Caviar® y Harina de Fermentos.

Dosis (mg·mL ⁻¹)	Nestum®	Royal Caviar®	Harina de Fermento
2.8	0.178	0.085	0.149
2.3	0.147	0.076	0.131
2.0	0.125	0.060	0.115
1.6	0.097	0.044	0.110
1.1	0.086	0.042	0.077

Las larvas alimentadas con levadura de pan (*S. cerevisiae*) presentaron una mortalidad menor al 1% a las 24 h. En todas las dosis las larvas se encontraron con tracto lleno y presencia de heces fecales. A las 48 h la mortalidad fue del 100 % en la mayoría de los casos, exceptuando las larvas alimentadas con la dosis de 2.5·10⁴ cel·mL⁻¹ donde no se presentó mortalidad (Figura 6). En esta dosis la mortalidad fue de 78 % y 100 % a las 72 y 96 h respectivamente.

Tabla V. Supervivencia de larvas zoea I alimentadas con levadura (*S. cerevisiae*) durante 96 h.

Dosis (cel·mL ⁻¹)	Tiempo (horas)			
	24	48	72	96
2.5·10 ⁴	99.6 ± 0.57	99.6 ± 0.57	22.0 ± 8.7	0.00 ± 0.0
5·10 ⁴	100.0 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
1·10 ⁵	100.0 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
2·10 ⁵	100.0 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
4·10 ⁵	100.0 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
Microalga	100.0 ± 0.0	99.6 ± 0.57	99.6 ± 0.57	99.6 ± 0.57

Sup. (%): Supervivencia promedio en porcentaje ± SD: desviación estándar.

Como prueba final en la selección del alimento se usaron las microalgas *Chaetoceros calcitrans*, *C. muelleri* y *Thalassiosira weissflogii*. En los tres casos no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la supervivencia de las larvas a las 24 h post-alimentación (Figura 7). Las larvas presentaron alimento en todo el tracto digestivo y solamente en el caso de las larvas alimentadas con las especies de *Chaetoceros* se observó (aproximadamente en menos del 5 % de los organismos) la presencia de pequeños agregados de microalgas en los apéndices anteriores y espinas furcales, los cuales no afectaron la sobrevivencia de los organismos. Las larvas alimentadas con *C. calcitrans* y *T. weissflogii* presentaron una supervivencia mayor al 80 % hasta las 96 h haciendo viable su uso en el mantenimiento de los organismos.

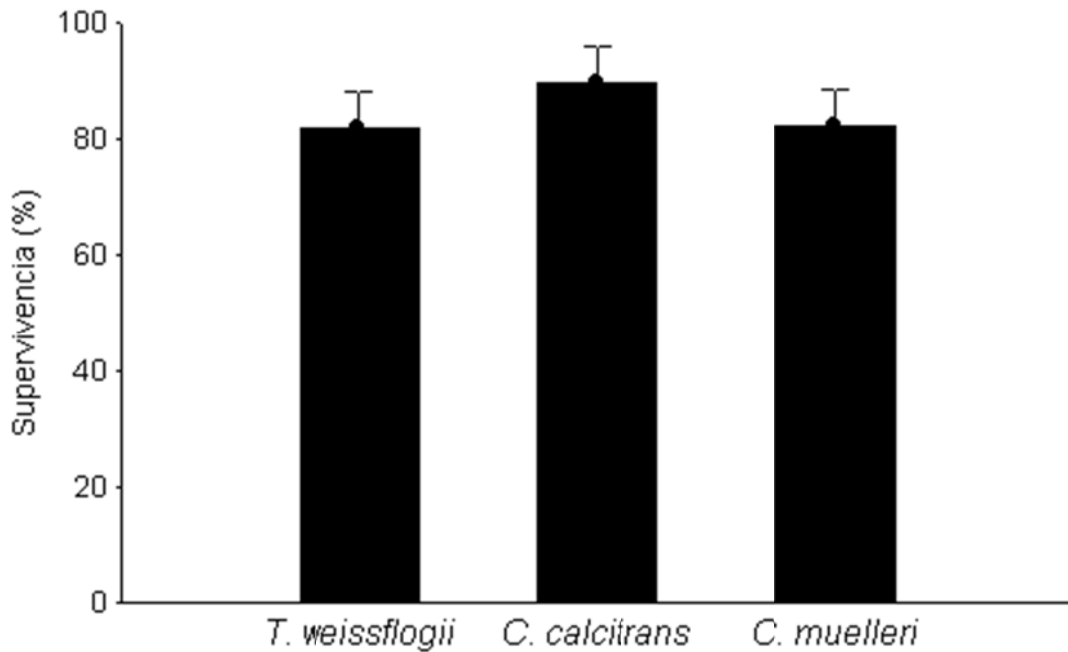


Figura 6. Supervivencia de larvas zoea I alimentadas durante 24 h con las microalgas *Chaetoceros calcitrans*, *C. muelleri* y *Thalassiosira weissflogii*. Los puntos representan la media \pm SD.

Optimización en el uso de *C. calcitrans* como alimento

Chaetoceros calcitrans se utilizó como dieta única para las larvas de camarón provenientes de Acuicultura Mahr. Esta creció en medio de cultivo F/2 a una densidad de $2 \cdot 10^6$ cel·mL⁻¹ en un periodo de 7 días con un tamaño promedio de 2.5 – 5 μ m de ancho y 2.5 – 7.5 μ m de largo. Las larvas alimentadas con dosis diarias de $1 \cdot 10^5$ cel·mL⁻¹ de la microalga mantuvieron una supervivencia mayor del 90 % hasta las 240 h (Figura 8). Además se observó la presencia de alimento en tracto digestivo, formación de heces fecales continuas y no se observó algún signo relacionado con vibriosis en todas las réplicas. En relación al estadio de desarrollo se observó la presencia de nauplio V a las 24 h, ya que los nauplios para esta prueba se encontraban en estadio nauplio II-III. Con respecto al estadio zoea se observó una

transición completa a zoea I, zoea II y zoea III a las 48, 72 y 120 h respectivamente. En el caso de los estadios de mysis I y mysis II se presentaron a las 168 y 216 h; sin embargo no se llegó a obtener una población homogénea, presentándose siempre en mezcla con el estadio anterior.

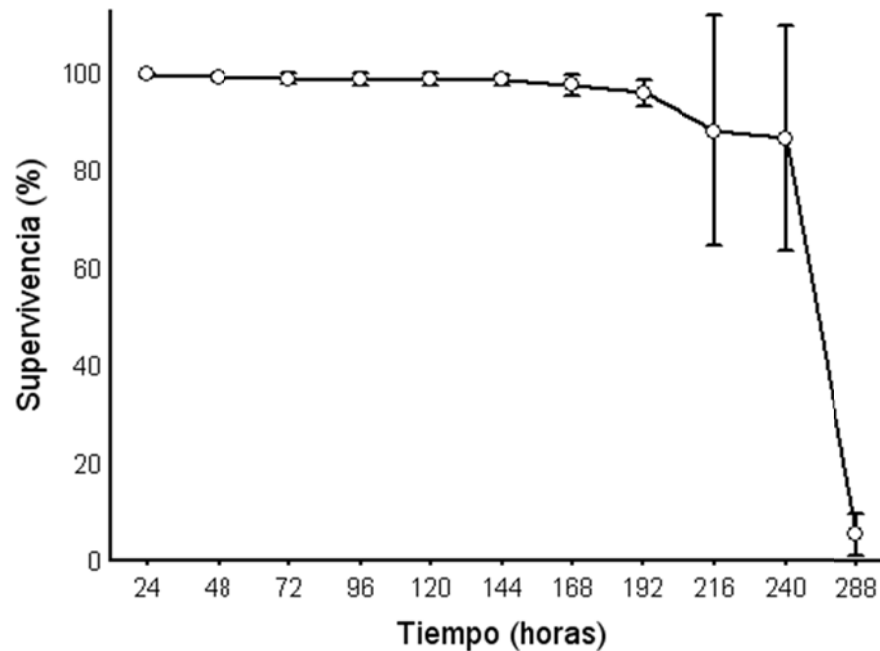


Figura 7. Supervivencia de larvas de camarón blanco *L. vannamei* alimentadas diariamente con una densidad de $1 \cdot 10^5$ cel·mL⁻¹ de *C. calcitrans* durante 288 h. Los puntos representan la media \pm SD.

Reducción del número de bacterias asociadas al alimento vivo proporcionado y a las larvas de camarón blanco.

Reducción de la carga bacteriana en el cultivo de *C. calcitrans*

De la primera siembra en placa de agar F/2 hubo un crecimiento pobre de la microalga, solamente en la zona de descarga y asociada a colonias de bacterias. A la par se encontró la presencia de siete morfotipos de colonias bacterianas asociadas al cultivo. De los tres antibióticos empleados, la eritromicina y cloranfenicol inhibieron el crecimiento de *C. calcitrans* en todas las dosis empleadas, mientras que la ampicilina no tuvo efecto sobre el crecimiento de la microalga. Con respecto a las bacterias, se observó su presencia en la microalga expuesta a las dosis de 5 a 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ampicilina y negativo en las dosis de 80 y 160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Sin embargo, al octavo día de crecimiento de la microalga se observó la presencia de bacterias para el tratamiento de 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Sólo en el cultivo de microalga tratada con 160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ampicilina se logró la reducción a una colonia de bacteria la cual no tuvo un efecto antagónico sobre las cepas de *Vibrio*. Por lo anterior el cultivo de microalga fue catalogada como gnotobiótico y a partir de este cultivo se escaló la producción en medio libre de antibiótico.

Reducción de la carga bacteriana en larvas de camarón blanco

Con respecto al estadio de desarrollo no se observó diferencia entre las larvas sobrevivientes, alcanzando todas el estadio zoea I. La supervivencia de las larvas fue menor conforme se aumentó la concentración de ClO_2 y el tiempo de exposición. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) de las larvas blanco con respecto a las larvas tratadas con 0.03, 0.15 y 0.3 ppm a 1, 3 y 5 minutos de

exposición (Figura 9). Se observó que la mayor dosis de 0.3 ppm de ClO_2 generó una disminución del 99.6 % de la carga bacteriana con respecto al blanco (Figura 10) a 4 minutos de exposición. A pesar de observarse una reducción del 100 % de la carga bacteriana a 8 y 12 minutos de exposición, en estos tiempos también se generó una mortalidad del 100 % de las larvas tratadas; por lo que se utilizó el tratamiento con ClO_2 a una concentración de 0.3 ppm con un tiempo de exposición de 5 minutos para la reducción de la microbiota externa asociada a las larvas.

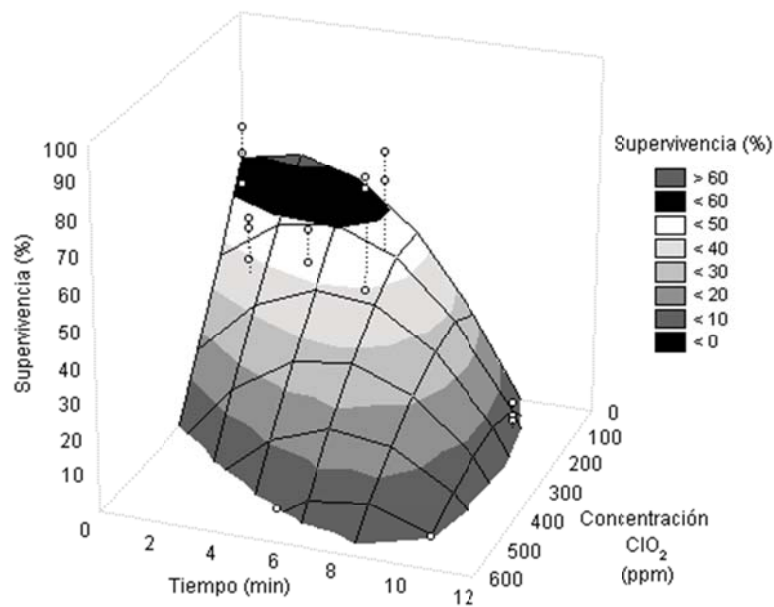


Figura 8. Supervivencia de larvas sometidas a cuatro concentraciones de ClO_2 (0.03, 0.15, 0.3 y 1.5 ppm) y cuatro tiempos de exposición (1, 3, 5 y 10 minutos). La superficie marca la tendencia general de los datos estimada con Statistica 7.

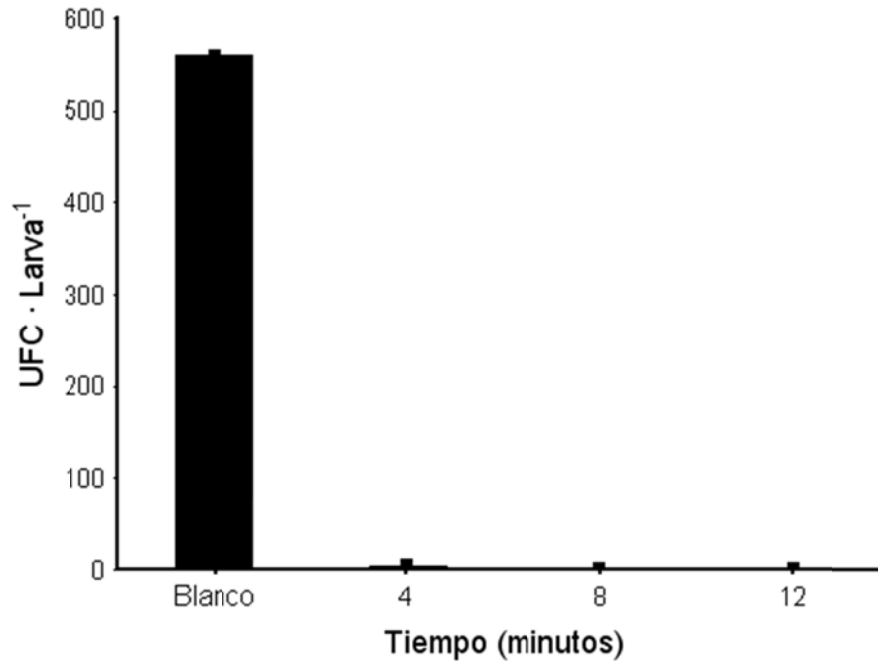


Figura 9. Reducción en la carga bacteriana externa asociada a las larvas con tres tiempos de exposición a una concentración de 0.3 ppm de ClO₂. Tiempo cero corresponde al control sin ClO₂.

Inducción de la vibriosis en larvas

Selección de la cepa patógena

Se realizaron seis infecciones experimentales con larvas de camarón, probando la efectividad de las cepas ATCC 14126, Lum1, Lum2 y EC11 correspondientes a *V. harveyi* y las cepas ATCC 17802 y PS-017 correspondientes a *V. parahaemolyticus* en la recreación de la vibriosis (Figura 11). Para cada cepa bacteriana, se observó que la supervivencia de las larvas varió en las tres primeras infecciones experimentales (Figura 11) y los organismos no manifestaron signos de vibriosis.

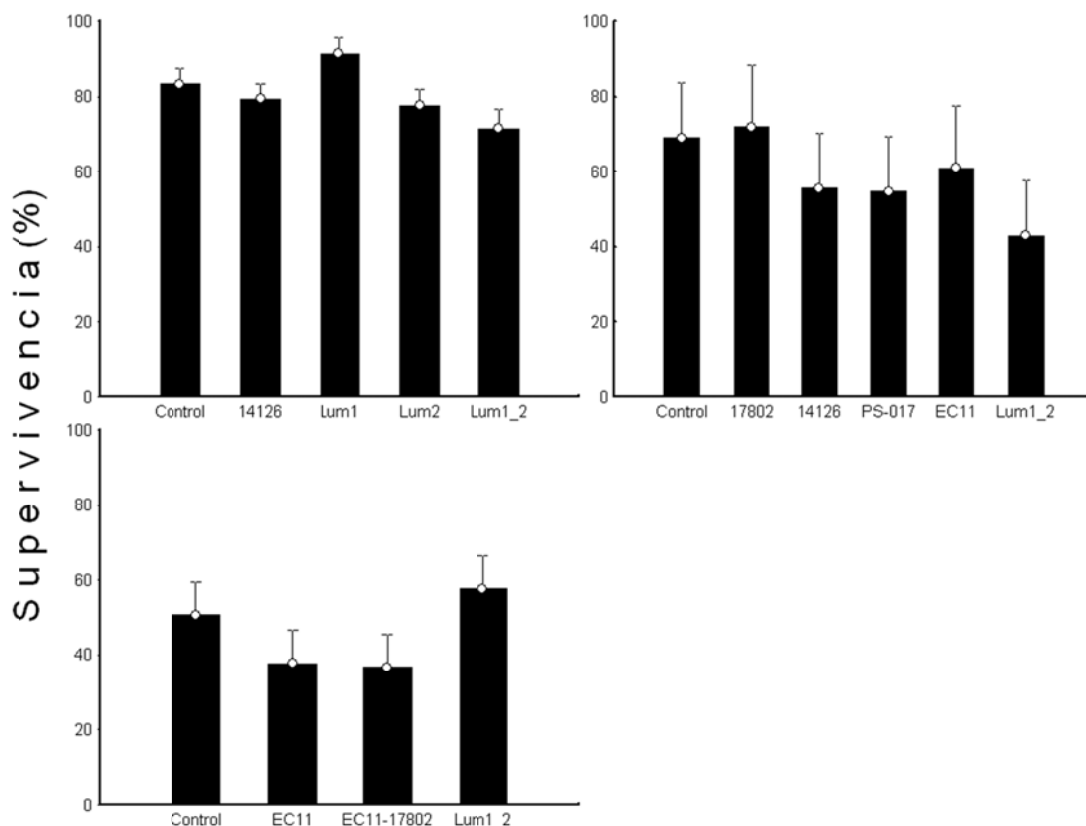


Figura 10. Supervivencia de larvas resultado de las infecciones experimentales realizadas con cepas patógenas de *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*. Los puntos representan la media \pm SD.

En la cuarta infección experimental se registró la supervivencia de larvas desinfectadas y no desinfectadas con 0.3 ppm de ClO_2 (Figura 12). En las larvas blanco (sin ClO_2) se presentó el 100 % de mortalidad debido a la presencia de protozoarios en las unidades experimentales. Con respecto a los tratamientos con bacterias la mortalidad fue menor que en el blanco a pesar de la presencia de protozoarios en las unidades. Además, sólo se observó excitación de los cromatóforos en las larvas como signo de vibriosis y no se observó un retraso en el estadio de desarrollo. En el caso de las larvas tratadas con ClO_2 no se presenta una diferencia significativa ($p > 0.05$) entre el blanco (63 %) y las larvas expuestas a las cepas EC11 (58 %), 14126 (42 %) y 17802 (45 %); mientras que la mezcla de las

cepas EC11 y 17802 presentó una reducción significativa cercana al 40 % con respecto al blanco ($p < 0.05$). Con respecto al estadio de desarrollo nuevamente no hubo un retraso (todas las larvas en zoea II) y se observó una mayor presencia de signos de vibriosis en las larvas tratadas con la cepa 17802, EC11 y la mezcla de estas. Dentro de los signos de vibriosis manifestados se tiene la presencia de puntos negros, poca actividad (nado escaso), tracto digestivo con alimento interrumpido, presencia de coloraciones rojizas debido a la excitación de los cromatóforos y deformaciones o ausencia de la primera y segunda antena, así como ausencia de espinas furcales (Figura 13).

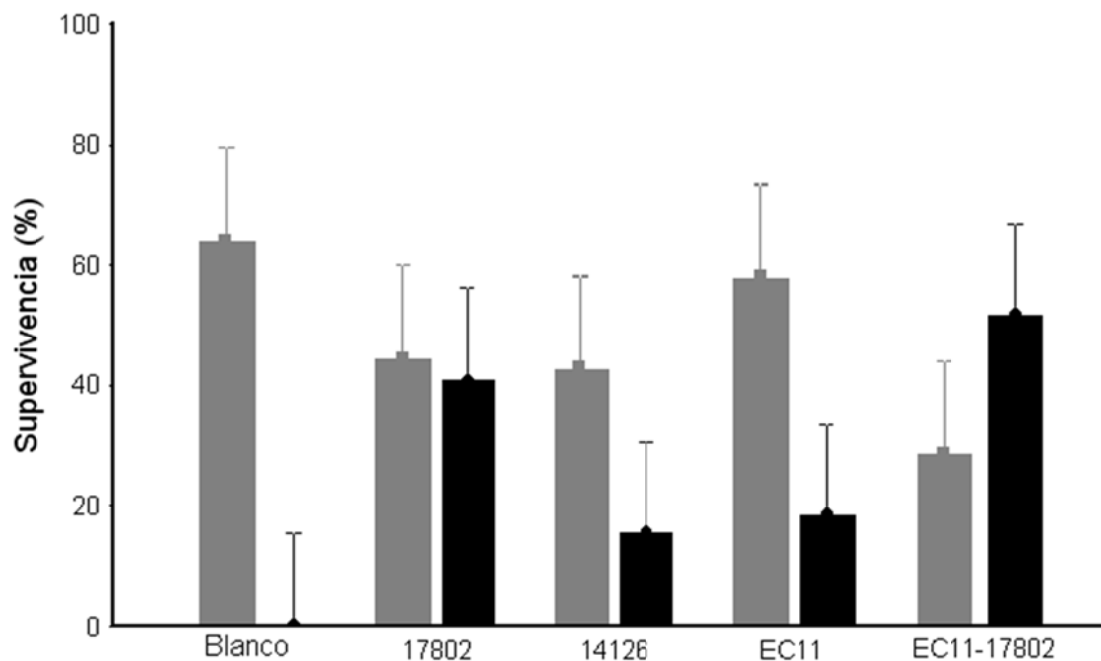


Figura 11. Supervivencia de larvas de camarón con () y sin () tratamiento de ClO_2 , expuestos a cepas potencialmente patógenas de *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*. Los puntos representan la media \pm SD.

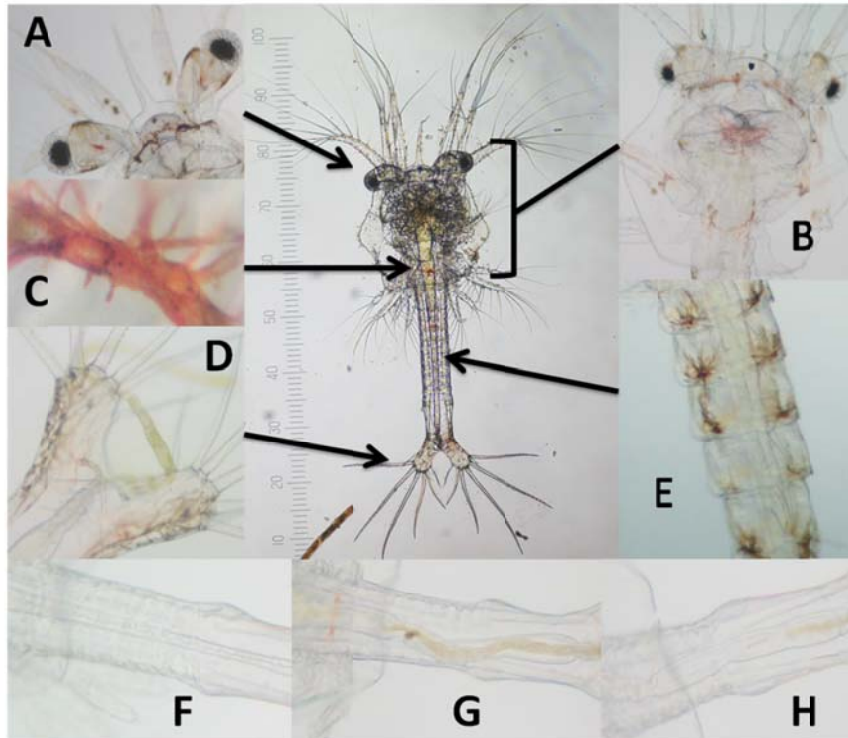


Figura 12. Principales signos de vibriosis observados en larvas zoea II. Coloraciones rojizas y presencia de puntos negros en ojos y apéndices superiores (A), región cefálica (B), inicio del tórax (C), lóbulos furcales (D) y segmentos del tórax y abdomen (E). Daños del tracto digestivo: Tracto digestivo colapsado (F), deforme (G) o sin alimento (H) (anorexia).

A partir de la cuarta infección experimental se observó un efecto similar en la supervivencia de las larvas expuestas a cada cepa bacteriana debido al empleo de ClO_2 . En las infecciones experimentales 5 y 6 se probó el efecto de las cepas 17802 y EC11 sobre las larvas de camarón para determinar cuál de ellas o su mezcla se emplearía para finalizar el modelo de infección experimental. De ello se obtuvo que la cepa 17802 en todos los casos genera un mayor daño sobre las larvas y la supervivencia fue diferente significativamente ($p < 0.05$) con un 10 % en la infección 5 y un 68 % en la infección 6 (figura 14 y 16 respectivamente). Además se observó la presencia de todos los signos de vibriosis anteriormente mostrados (Figura 13).

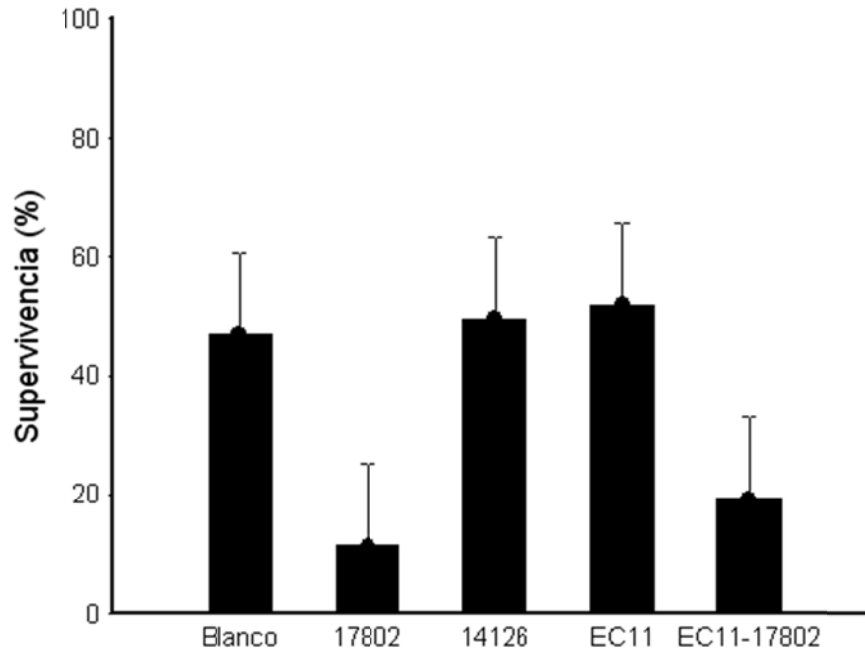


Figura 13. Supervivencia de larvas expuestas a las cepas 14126, EC11 (*V. harvey*) y 17802 (*V. parahaemolyticus*). Los puntos representan la media \pm SD.

Evaluación del efecto de la dosis de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 en la supervivencia de larvas.

En la figura 15 se observa que las dosis de $2 \cdot 10^5$, $6 \cdot 10^5$ y $1 \cdot 10^6$ no generaron diferencias significativas con respecto al blanco, a pesar de observarse una reducción en la supervivencia con las últimas dos dosis mencionadas. Las dosis de $1.5 \cdot 10^6$ y $2 \cdot 10^6$ UFC·mL⁻¹ si generaron diferencias significativas con las larvas blanco y la dosis menor ($p < 0.05$), además las larvas expuestas a estas dosis presentaron deformación de los apéndices superiores, tracto digestivo sin alimento y excitación de los cromatóforos en larvas. Cabe señalar que en la dosis de $2 \cdot 10^6$ UFC·mL⁻¹ los signos de vibriosis se presentaron en una mayor cantidad de individuos y en el caso de la excitación de cromatóforos al área y la coloración fue mayor que en la dosis anterior.

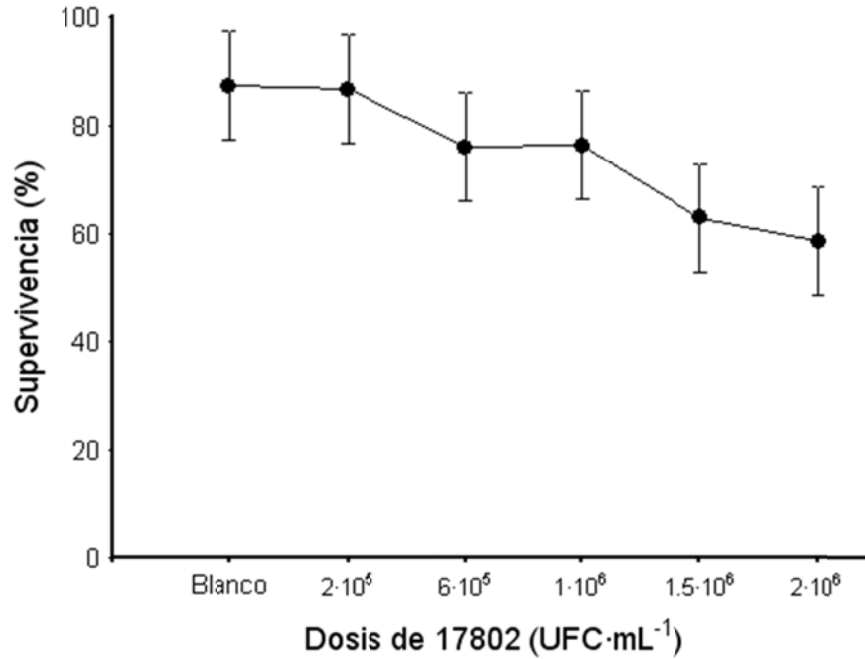


Figura 14. Supervivencia a las 96 h de larvas de camarón expuestas a cinco densidades de *V. parahaemolyticus* 17802. Los puntos representan la media \pm SD.

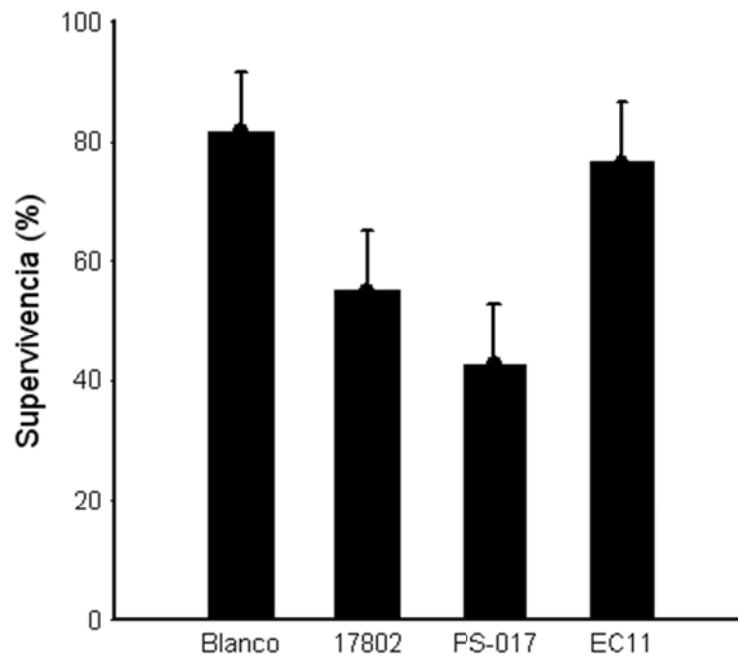


Figura 15. Supervivencia de larvas de camarón blanco a las 96 h post-infección con tres cepas de *Vibrio*. Los puntos representan la media \pm SD.

La infección experimental seis se llevó a cabo en las instalaciones de la empresa BIOGEMAR S.A., Ecuador. La cepa EC11 no generó mortalidades significativas con respecto a las larvas blanco (Figura 16). A diferencia de EC11, la cepa PS-017 si generó mortalidades significativas con respecto al blanco ocasionando la muerte del 60 % de los organismos y causando algunos signos de vibriosis en los sobrevivientes. La cepa 17802 nuevamente generó diferencias significativas con respecto al blanco llegando a una supervivencia del 55 %, lo cual fue similar a lo reportado con las larvas de la empresa Acuicultura Mahr S.A. de C.V., México. En ninguno de los casos se observó retraso en el estadio de desarrollo.

De los signos de vibriosis generados los que se presentaron con mayor frecuencia fueron la falta de alimento en tracto digestivo (disminución del apetito) y lesiones en diferentes regiones del cuerpo, principalmente cefalotórax y lóbulo furcal. Para EC11 el principal signo de vibriosis observado fue el tracto vacío, contraído o con presencia de alimento interrumpido por espacios vacíos (Figura 17). PS-017 a pesar de ser la cepa con mayor nivel de mortalidad de las larvas (43 %), sólo se observaron lesiones pequeñas en la región del lóbulo furcal y base ocular en el caso de zoea II (Figura 18). Todas las larvas presentaron alimento en todo el tracto digestivo y nado constante. Las larvas infectadas con la cepa 17802 fueron las que presentaron un mayor número de lesiones a lo largo del cuerpo, tracto digestivo sin alimento o de forma interrumpida, pérdida de espinas en la región posterior y en algunos casos presencia de puntos negros (Figura 19).

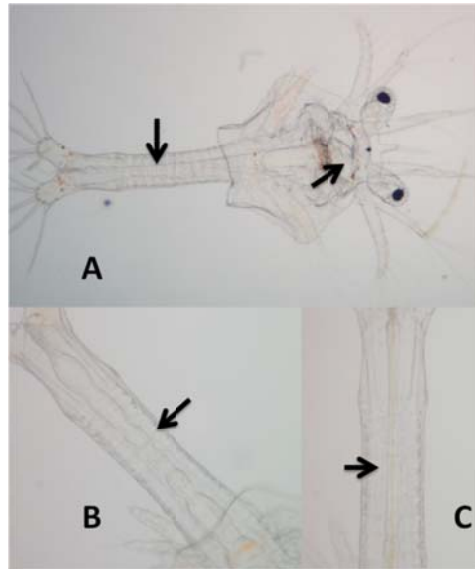


Figura 16. Larvas de camarón blanco infectadas con *Vibrio harveyi* cepa EC11. A) Larva zoea II sin alimento en el tracto y pocas coloraciones rojizas en cefalotórax (4x). B) Tracto digestivo sin alimento a 10x. C) Tracto digestivo colapsado con poco alimento (10x). Las flechas señalan los daños.

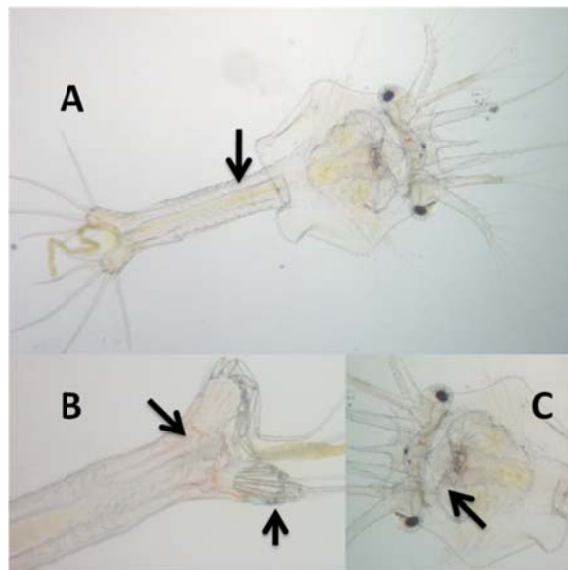


Figura 17. Larvas de camarón blanco infectadas con *Vibrio parahaemolyticus* cepa PS-017. A) Larva zoea II con alimento en el tracto y pocas coloraciones rojizas (4x). B) Coloraciones rojizas en la parte interna del lóbulo furcal y daño de las espinas caudales (10x). C) Pequeñas coloraciones en la base ocular (10x). Las flechas señalan los daños.

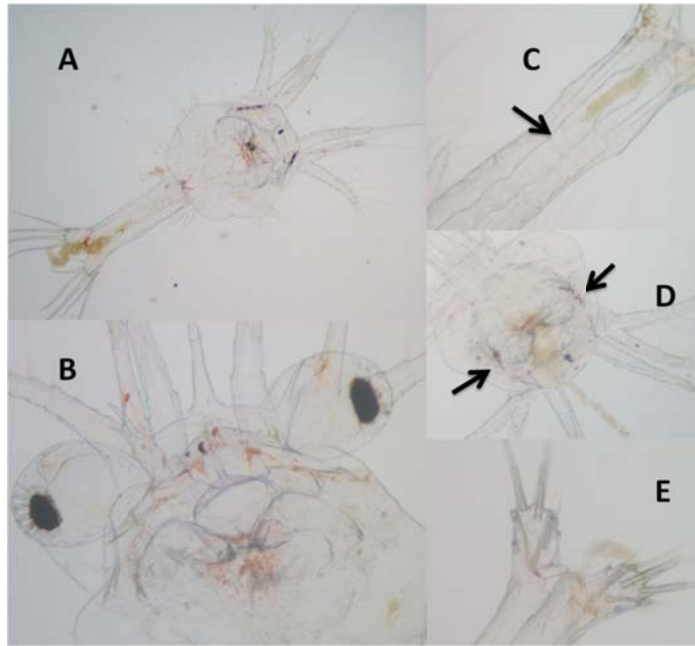


Figura 18. Larvas de camarón blanco infectadas con *Vibrio parahaemolyticus* cepa 17802. A) Larva zoea I con alimento interrumpido en el tracto y coloraciones rojizas en varias regiones del cuerpo (4x). B) Coloraciones rojizas en varios puntos del cefalotórax (10x). C) Tracto digestivo con alimento interrumpido (10x). D) Puntos negros en el cefalotórax. E) Pérdida de las espinas caudales (10x). Los puntos D y E fueron los menos comunes presentándose en tres y un caso respectivamente. Las flechas señalan los daños.

Cinética de la infección con *V. parahaemolyticus* 17802.

La cinética de infección con la cepa de *V. parahaemolyticus* 17802 sigue una tendencia exponencial representada por la ecuación $y=100.68 \cdot e^{-0.00855x}$. Las larvas expuestas a la bacteria 17802 a partir de las 48 h presentan una diferencia significativa en la supervivencia con respecto a las 0 h ($p<0.05$) (Figura 20). Sin embargo, la supervivencia de los organismos aún es alta (62 %) a diferencia de los organismos expuestos durante 96 h a la bacteria con supervivencia cercana a 55 %. Aunado a lo anterior, a pesar de que a las 48 h los organismos presentaron en su mayoría coloraciones rojizas y/o puntos negros en varias regiones del cuerpo estos no eran tan evidentes como a las 96 h, donde las larvas se encontraban sin alimento en el tracto y con coloraciones rojizas y/o puntos negros en la región del abdomen, cefalotórax, lóbulos furcales, apéndices anteriores y alimenticios, así como en la base de los ojos (Figura 21). Por tanto se decidió establecer el tiempo de 96 h como tiempo estándar para concluir cada infección experimental y fagoterapia, ya que a este tiempo fue posible observar de una forma mas contundente si existe un efecto positivo o negativo para cada caso.

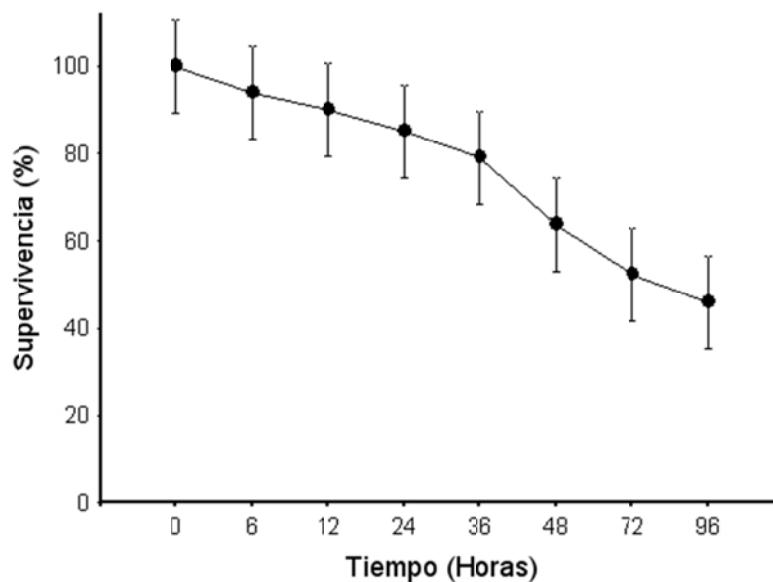


Figura 19. Cinética de infección con larvas de camarón blanco infectadas con *V. parahaemolyticus* cepa 17802 durante 96 h de exposición. Los puntos representan la media \pm SD.

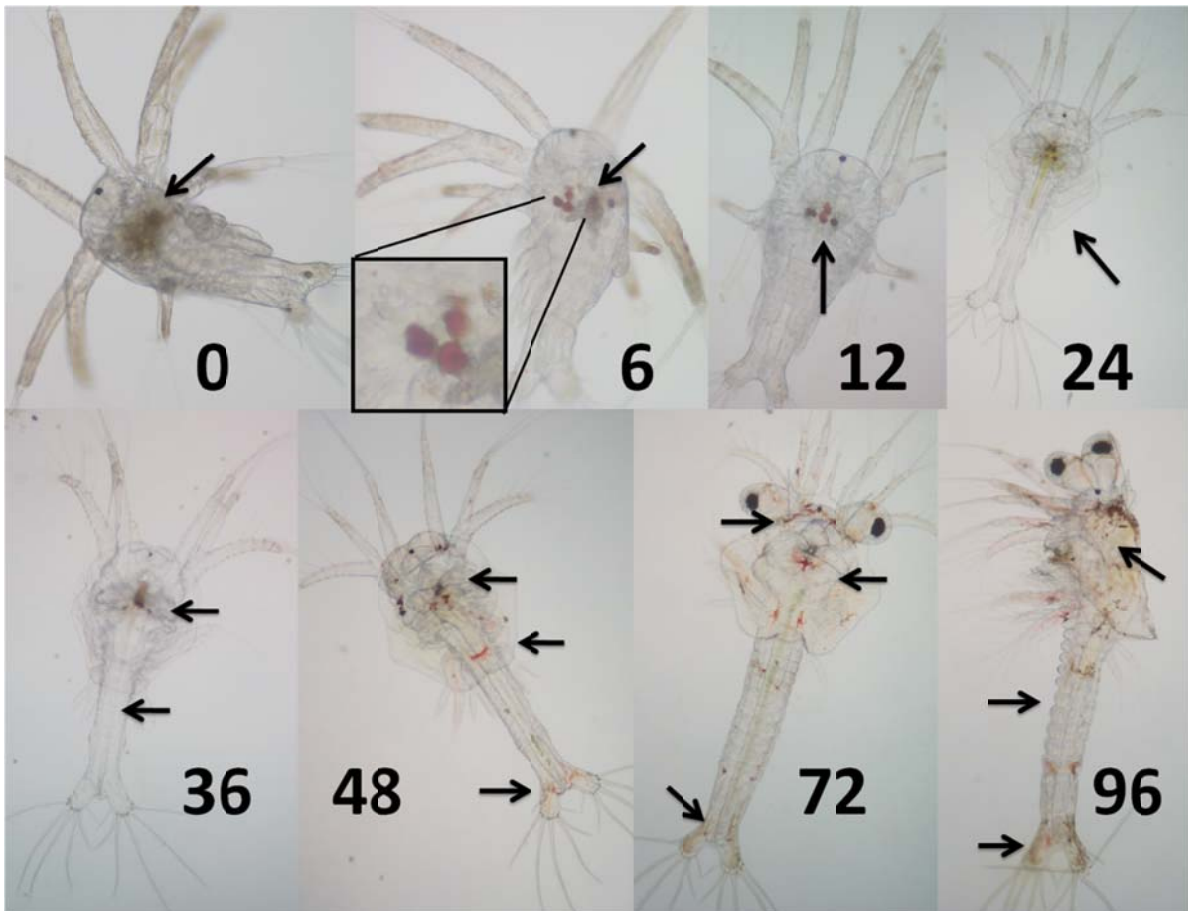


Figura 20. Larvas de camarón blanco infectadas a diferentes tiempos de exposición con la cepa *V. parahaemolyticus* cepa 17802. La flecha en la hora cero señala la presencia de glóbulos de aceite y no un daño por *Vibrio*. En las horas siguientes la presencia de signos de vibriosis en las larvas es progresiva, llegando a las 96 h donde el daño es máximo para los tiempos establecidos.

Fagoterapia

Evaluación del efecto del extracto crudo de los fagos vpms1 y A3S específicos para *V. parahaemolyticus* cepa 17802.

En todos los tratamientos las larvas alcanzaron el estadio Zoea II por lo cual se descarta un efecto adverso sobre su desarrollo. Las larvas blanco (Figura 22A) presentaron el tracto digestivo lleno de alimento, nado constante y ningún signo de daño (deformaciones o cambios de coloración). Las larvas infectadas con *V. parahaemolyticus* presentaron excitación de los cromatóforos y pérdida de apéndices, como se observa en la figura 22B. Las larvas tratadas con los extractos de fagos vpms1 y A3S (Figura 22C y 22D, respectivamente) presentaron una mayor actividad y presencia de alimento en tracto y en pocos casos se observó la ausencia de espinas en apéndices superiores y secciones del tracto digestivo sin alimento.

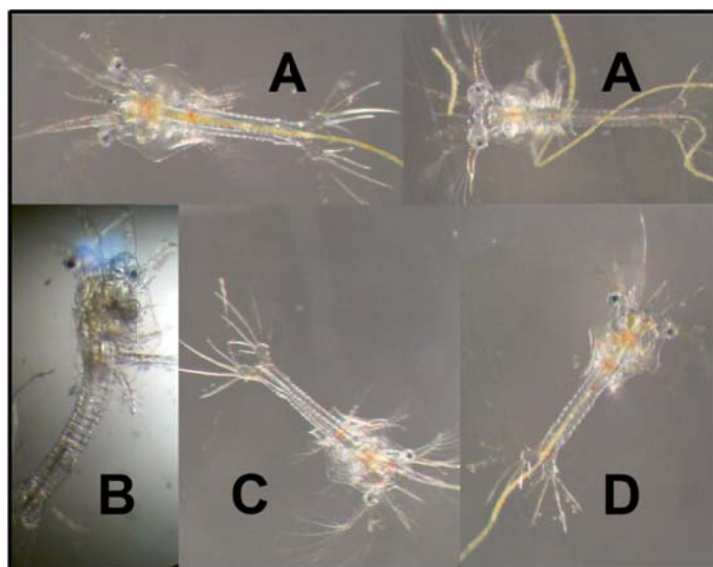


Figura 21. Larvas de camarón blanco sometidas a fagoterapia con los fagos vpms1 y A3S. A) Larva no infectada con *V. parahaemolyticus* 17802; B) Larva infectada con *V. parahaemolyticus* cepa 17802; C) Larva tratada con el fago vpms1; D) Larva tratada con el fago A3S.

Se encontraron diferencias significativas en la supervivencia de los diferentes tratamientos: en los controles sin infectar la supervivencia fue de 87 % mientras que las larvas infectadas con *V. parahaemolyticus* la supervivencia fue de 59 %. Las larvas infectadas con *V. parahaemolyticus* y tratadas con los fagos, no presentaron diferencias significativas respecto al blanco ($P>0.05$) la supervivencia fue de 77% con el fago vpms1 y 80% con el fago A3S (Figura 23).

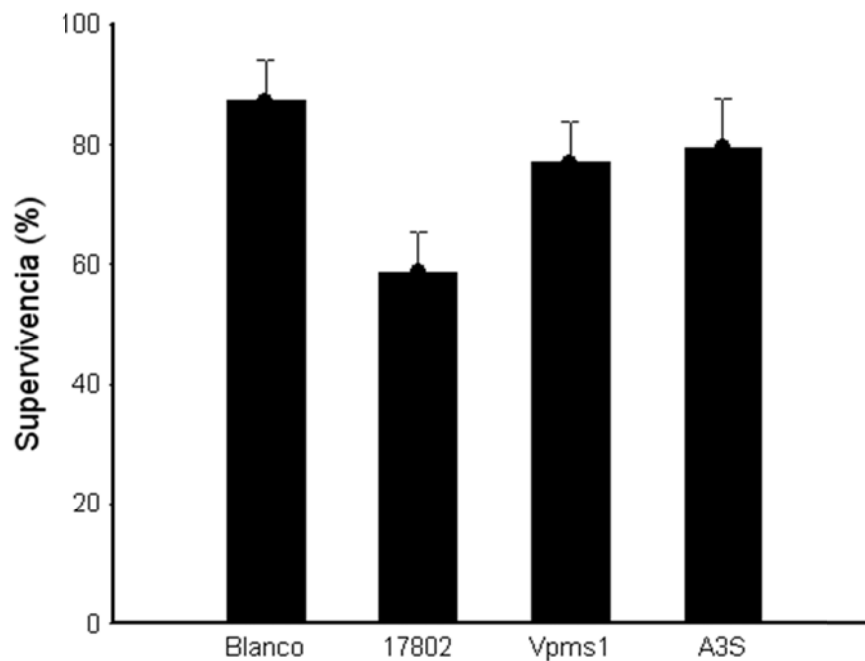


Figura 22. Supervivencia de larvas de camarón blanco infectadas con *V. parahaemolyticus* 17802 y tratadas con los fagos vpms1 y A3S. Los puntos representan la media \pm SD.

Dosis efectiva de los fagos A3S y vpms1

Las dosis de fagos correspondientes a 400 y 800 μ L para A3S y 800 μ L para vpms1 generaron mortalidades del 100 % a las 24 y 8 h post – infección, respectivamente (Figura 24). Con respecto a las dosis restantes estas presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a las larvas infectadas con la cepa 17802. Sin embargo, estas dosis también presentaron diferencias significativas con las larvas blanco ($p < 0.05$) donde la supervivencia fue del 59 %. Esta diferencia se pudo deber a factores ajenos al tratamiento, donde el bajo valor de la supervivencia en las larvas blanco, con respecto a otros experimentos, puede representar una menor calidad de las larvas.

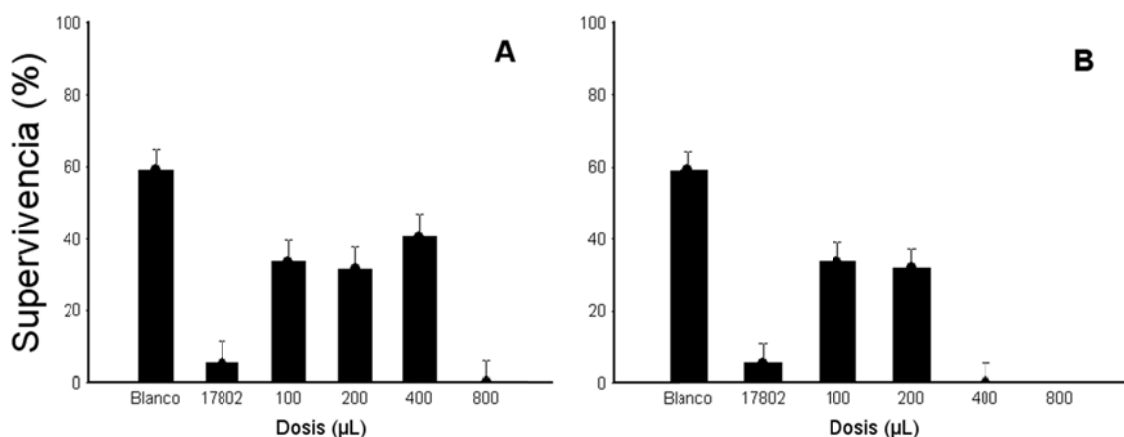


Figura 23. Fagos vpms1 (A) y A3S (B) empleados como terapia con dosis de 100, 200, 400 y 800 L de extracto crudo en larvas infectadas con *V. parahaemolyticus* 17802 durante 96 h. Los puntos representan la media \pm SD.

Con respecto a los daños presentados en las larvas, los organismos blanco en su mayoría fueron organismos sanos o sin daños aparentes, con alimento en tracto, fototáctiles y con nado presente (Figura 25A). Las larvas infectadas con la cepa 17802 nuevamente presentaron varios signos de daños a lo largo del cuerpo, siendo

los principales la excitación de cromatóforos (coloraciones rojizas), presencia interrumpida de alimento en tracto y presencia de puntos rojos-negros como se observa en la figura 28B. Las condiciones de las larvas expuestas a la fagoterapia no fueron diferentes entre dosis y fagos. Las larvas en su mayoría presentaron pocos daños en el cuerpo, encontrándose localizados en la región de los lóbulos furcales y base ocular (Figura 25C-G). En todos los tratamientos el estadio de desarrollo predominante fue zoea II (90 %) con poca presencia de zoea III, por lo que se descarta un retraso en el estadio de desarrollo.

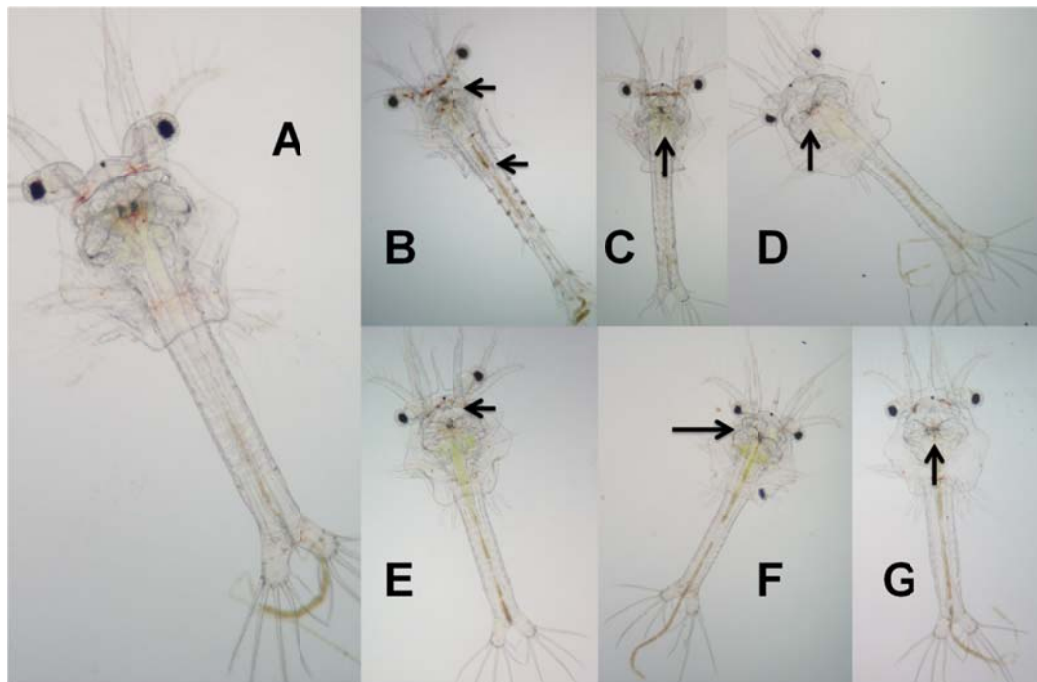


Figura 24. Larvas de camarón blanco sometidas a terapia de fagos contra *V. parahaemolyticus* cepa 17802 a las 96 h. A) Larva blanco; B) Larva infectada con la ceoa 17802; C) Larva tratada con 100 μ L de extracto crudo del fago A3S; D) Larva tratada con 200 μ L de extracto crudo del fago A3S; E) Larva tratada con 100 μ L de extracto crudo del fago vpms1; F) Larva tratada con 200 μ L de extracto crudo del fago vpms1; G) Larva tratada con 400 μ L de extracto crudo del fago vpms1.

Efecto del extracto crudo del fago vpms1 sobre larvas de camarón

No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las larvas blanco y las expuestas a las dosis de 100 y 300 μL (Figura 26), llegando todas las larvas al estadio zoea II. En las larvas blanco se observó tracto digestivo lleno y presencia de heces fecales en el organismo y contenedor. Todas las larvas expuestas a dosis de 100 y 300 μL de extracto crudo presentaron tracto digestivo lleno de alimento y nado constante, y sólo en menos del 5 % de los organismos se presentó excitación de cromatóforos en la región de los lóbulos fúrcales. Con respecto a las larvas expuestas a dosis de 600 y 1200 μL de extracto crudo estas murieron en las primeras 48 h, por lo cuál al término del experimento no se encontraron organismos íntegros para examinar.

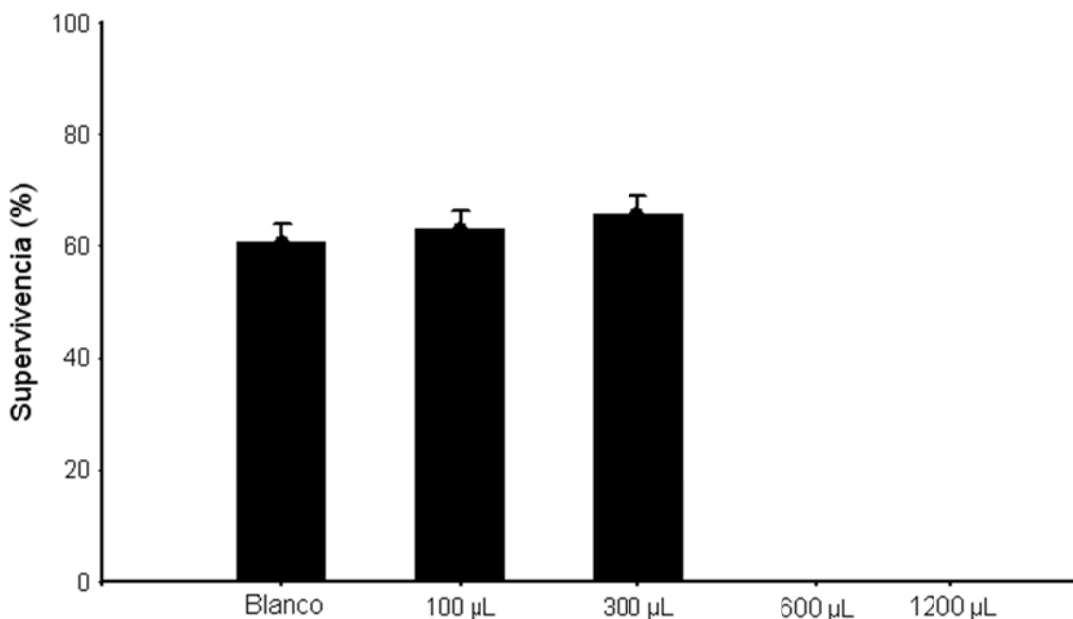


Figura 25. Supervivencia de larvas de camarón blanco expuestas a diferentes dosis de extracto crudo del fago vpms1. Los puntos representan la media \pm SD.

Tiempo de aplicación

La supervivencia en todos los tiempos de aplicación fue mayor al 63 % (Figura 26). Las larvas expuestas solamente a la bacteria presentaron diferencias significativas con todos los tratamientos tiempo y blanco, lo cual resalta el efecto benéfico de los fagos. Sin embargo, sólo los tiempos 0, 6 y 12 no presentaron diferencias significativas en la supervivencia con respecto a las larvas blanco ($p < 0.05$).

Los organismos blanco no presentaron ningún daño, además presentaron tracto digestivo lleno de alimento y presencia de heces. La mayoría de las larvas tratadas con fagos presentaron tracto digestivo con alimento y formación de heces, sin embargo en algunos organismos se observó excitación de cromatóforos, tracto con alimento interrumpido y deformaciones en espinas de antenas y lóbulos furcales. El porcentaje de organismos con signos de vibriosis fue aumentando conforme se atrasó la aplicación de los fagos, pero estos organismos nunca representaron más del 20 % del porcentaje vivo. La mayoría de los organismos infectados sólo con la cepa 17802 presentaron tracto digestivo con alimento interrumpido, cromatóforos excitados y en algunos casos deformaciones de espinas en antenas y lóbulos furcales. En todos los tratamientos el estadio de desarrollo fue zoea II lo cual descarta un retraso en el estadio de desarrollo.

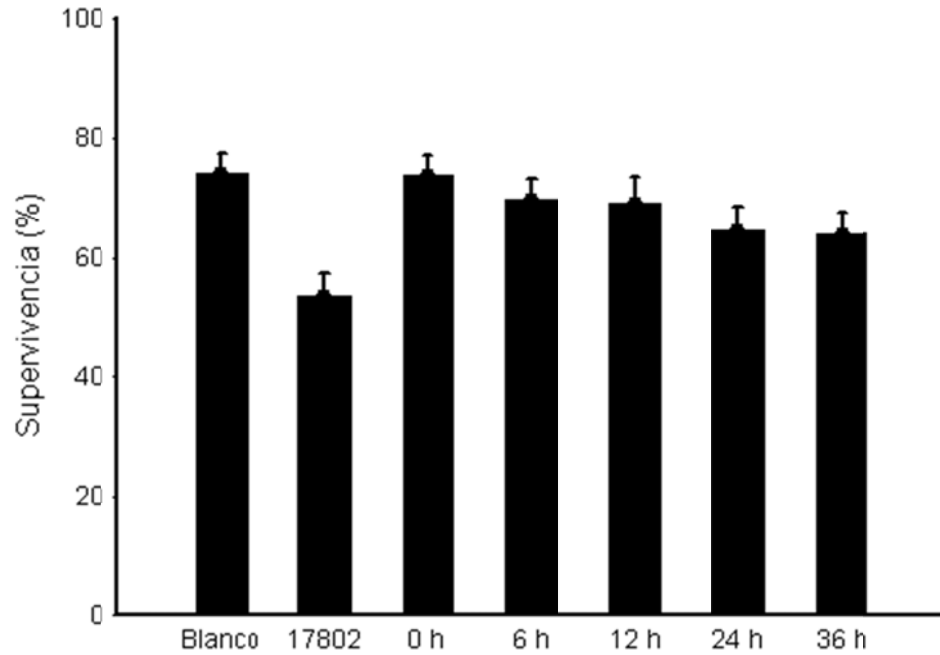


Figura 26. Supervivencia de larvas zoea expuestas durante 96 h a *V. parahaemolyticus* 17802 y tratadas a diferentes horas con suspensión del fago vpms1. Los puntos representan la media \pm SD.

VIII. DISCUSIÓN

Estandarización de las condiciones de cultivo de larvas de camarón blanco.

Para evaluar la efectividad de un método de control de patógenos, como la fagoterapia, es necesario contar con modelos de infección experimental estandarizados y reproducibles donde se controlen factores como temperatura, salinidad, microorganismos exógenos, alimento, entre otros; los cuales podrían interferir de forma directa o indirecta con la efectividad del tratamiento. En el presente trabajo se realizó la estandarización de un modelo de infección experimental el cual sirvió como base para la evaluación de la fagoterapia. Considerando la posible interferencia de algunos factores, en este modelo se evaluó la fuente de agua, densidad de organismos, tipo de alimento y reducción de la carga bacteriana en microalga y larvas.

La fuente de agua y la densidad de organismos fueron los primeros factores evaluados. Con respecto a la calidad del agua, se ha reportado que esta afecta la reproducción, crecimiento y supervivencia de los organismos acuáticos, pero el criterio para una calidad de agua óptima varía con el tipo de organismo y esta establecida por niveles de seguridad que delimitan los intervalos donde no se presentan efectos adversos en el crecimiento y la supervivencia (Chien, 1992). En este estudio se encontró que los organismos no lograron sobrevivir en agua de mar natural estéril (AMNe), debido a posibles variaciones en la calidad del agua como: fluctuación de la salinidad debida a mareas o corrientes y presencia de agentes infecciosos o compuestos tóxicos para los nauplios como el ión amonio y nitrito (Jayasankar y Muthu, 1983a, 1983b; Chien, 1992). Sin embargo, el uso agua de mar natural esterilizada ha sido adecuado para el mantenimiento de nauplios (Simões *et al.*, 2002^a), por lo cual sería necesario una evaluación posterior de la fuente de AMN y determinar la causa de la mortalidad y en dado caso si es adecuada para el mantenimiento de larvas de camarón. Para los posteriores experimentos de esta tesis se decidió utilizar el agua de mar artificial estéril (AM Ae) para el mantenimiento

de larvas ya que se presentó una alta supervivencia y, además, esta fuente presentó una composición conocida y constante con respecto al lote lo cual aseguró la reproducibilidad del modelo.

En estudios previos se ha reportado que la densidad es un factor limitante en el cultivo de camarón, considerando que densidades menores a 50 nauplios·mL⁻¹ son adecuadas para el mantenimiento de los organismos. En la mayoría de los trabajos con condiciones de laboratorio las densidades de nauplios de camarón para pruebas de reto se encuentra dentro de un intervalo de 10 a 20 nauplios·100 mL⁻¹ (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999; Álvarez *et al.*, 2004; Racotta *et al.*, 2004; Meyer-Willerer, 2005; Piña *et al.*, 2005, 2006). El principal problema de estas densidades es que cada organismo representa entre el 5 y 10 % de la población y, considerando la mortalidad natural de los organismos, ello puede dificultar o enmascarar el efecto de un tratamiento. En este estudio no se encontró ningún efecto debido a la densidad, sin embargo, se optó por el empleo de la densidad más alta considerando que un mayor número de organismos por muestra disminuye el porcentaje representado por individuo a 1%, logrando disminuir el porcentaje representado por la mortalidad natural de los organismos y así obtener una mejor apreciación de los tratamientos durante las pruebas de reto con bacterias y fagos.

En ambos casos, se encontró una mortalidad de todos los organismos a las 48 h debido a la falta de alimento, por lo que el siguiente factor a evaluar fue el tipo de alimento (inerte o vivo) para zoeas de camarón blanco. Con respecto a esto, existe un gran interés en la nutrición y la alimentación de *L. vannamei* por parte de científicos, acuacultores y productores de alimentos, con el objetivo de generar un alimento inerte que sustituya completamente al alimento vivo (principalmente microalga y *Artemia*) (Sangha *et al.*, 2000; Cuzon *et al.*, 2004). Sin embargo, en estudios previos se han reportado bajos rendimientos con alimentos inertes, ya que en la mayoría de los casos se obtiene menor porcentaje de supervivencia, menor crecimiento, retraso en el estadio de desarrollo y proliferación de microorganismos nocivos (protozoarios, bacterias, entre otros) debido a la acumulación de materia

orgánica en el fondo de los frascos o acuarios (Sangha *et al.*, 2000; Cuzon *et al.*, 2004; Meyer-Willerer, 2005).

En este trabajo ninguno de los alimentos microparticulados probados logró funcionar como dieta única de larvas zoea de camarón blanco. La principal razón de esto radica en que para los filtradores exclusivos como Zoea I-II, la tasa de encuentro con el alimento potencial es generalmente un evento al azar que depende de la concentración del mismo (Simões *et al.*, 2002a) y, en los experimentos de esta tesis, no se utilizó un sistema de aireación que mantuviera en suspensión a las partículas, generando una alta precipitación y la adhesión de las mismas a las larvas, lo cual limitó la disponibilidad del alimento y provocó las altas mortalidades. En consecuencia los alimentos inertes no fueron incluidos durante las pruebas de reto con larvas de camarón y se optó por la evaluación de levadura de panificación como dieta única en la alimentación de larvas de camarón blanco, esto debido a la presencia de una microbiota bacteriana asociada al cultivo de microalga.

La levadura de panificación ha sido evaluada anteriormente como dieta base de nauplios de *Artemia* y juveniles de almeja *Mercenaria mercenaria*, encontrando en ambos casos un pobre crecimiento y supervivencia. Esto se asocia con la baja digestibilidad de las células debido a la compleja y gruesa envoltura celular que poseen, la cual obstaculiza su uso directo como fuente de alimento en acuicultura (Coutteau *et al.*, 1990; 1994). Por las dificultades que representa el uso de las células íntegras, varios estudios se enfocan en el uso de sus paredes como suplementos alimenticios. Tal es el caso de Chotikachinda *et al.* (2008) quienes reportan un crecimiento ligeramente mayor pero no significativo de las larvas alimentadas con el suplemento de paredes. Sin embargo, se reportó un efecto protector por parte de los manano-oligosacáridos (MOS) y glucanos contenidos en paredes celulares de levaduras inactivas. Los MOS están asociados con células granulares, teniendo la habilidad de unirse a la manosa y desencadenar los mecanismos de activación de defensa celular y humoral de los crustáceos en respuesta a la exposición a patógenos. Con respecto a esto, se ha reportado que larvas de *Artemia* alimentadas con pequeñas cantidades de levadura y/o glucanos en la dieta mostraron ser

resistentes a los efectos negativos de las cepas patógenas de *Vibrio proteolyticus* y *V. campbelli* (Marques *et al.*, 2006a; Rojas-García *et al.*, 2008). Debido a la poca supervivencia observada en este estudio y a los antecedentes de estimulación al sistema inmune de crustáceos por parte de los componentes de la levadura, se descartó el uso de levadura de panificación como alimento único en las dietas de las larvas de camarón.

A pesar del esfuerzo invertido no se pudo sustituir el uso de la microalga *Chaetoceros calcitrans* como dieta única de larvas de camarón. Las diatomeas del género *Chaetoceros* son unas de las más comunmente empleadas en la alimentación de los primeros estadios larvarios de organismos de cultivo, ya que tienen buenas propiedades nutricionales (Brown, 2002). En pruebas de laboratorio se han reportado las más altas supervivencias (>65 %), las mayores longitudes y el mayor índice de desarrollo (mysis I) en larvas de *Penaeus monodon*, *Litopenaeus stylirostris* y *L. vannamei* alimentadas con las diatomeas *Chaetoceros muelleri* y *C. calcitrans* con una dosis cercana a $1 \cdot 10^5$ cel·mL⁻¹ (D'Souza *et al.*, 2000; Godínez *et al.*, 2005; Piña *et al.*, 2006). Además se ha observado que estas diatomeas ayudan a la rápida transición de zoea II a zoea III. Naranjo *et al.* (1999) reportan en los tratamientos donde *C. gracilis* no fue utilizada se observó un retraso en la velocidad de metamorfosis y diferencias significativas ($p < 0.05$) en crecimiento a partir de zoea II. Kuban *et al.* (1985) mostraron datos similares, donde las larvas alimentadas con una combinación de las diatomeas *S. costatum* y *C. gracilis* completaron su metamorfosis más rápido que las larvas alimentadas con fitoflagelados. En el caso de la microalga *Chaetoceros calcitrans* cepa CHCAL-5 utilizada en la mayoría de los experimentos de esta tesis, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la supervivencia de las larvas alimentadas con diferentes dosis, pero si se observó un mayor grado de desarrollo (mysis I) en las larvas alimentadas con la dosis más alta. Esto está relacionado con la alta densidad de organismos utilizada en los experimentos, por lo que se decidió alimentar a los organismos con dosis diarias de $1 \cdot 10^5$ cel·mL⁻¹.

Bajo las condiciones previamente establecidas de fuente de agua, densidad y tipo de alimento se realizaron tres infecciones experimentales, pero en todos los casos se observó un efecto directo de la microbiota asociada a larvas y/o microalgas en la recreación de la vibriosis, por lo que se decidió trabajar en primera instancia con la purificación de la cepa CHCAL-5 de *Chaetoceros calcitrans*. Con respecto a esto, Bruckner *et al.* (2008) mencionan que algunas microalgas, entre ellas las diatomeas, requieren estar en asociación con bacterias para crecer y aunque con ello se esperaría una disminución de la calidad, el cultivo de la cepa CHCAL-5 no tuvo ninguna complicación al reducir la carga bacteriana asociada. La importancia de obtener un cultivo de algas libre de bacterias o gnotobiótico es reducir el riesgo de introducir patógenos o un agente antagónico que comprometa la reproducibilidad de los experimentos (Borowitzka, 1997). Con respecto al proceso de purificación, se realizó el aislamiento de la microalga a través de siembra por estría cruzada en agar f/2, sin embargo, como se esperaba esto no fue posible ya que la microalga sólo creció asociada a colonias de bacterias. Debido a que no se logró la purificación a través de siembras en agar f/2, se emplearon los antibióticos eritromicina, ampicilina y cloranfenicol usando como referencia las dosis reportadas por Campa-Códova *et al.* (2006) con la microalga *C. gracilis*. En este trabajo se encontró que los antibióticos eritromicina y cloranfenicol inhiben el crecimiento de *C. calcitrans* cepa CHCAL-5 a las mismas dosis utilizadas para la microalga *C. gracilis* (Campa-Códova *et al.*, 2006), sin embargo, se logró el crecimiento de CHCAL-5 con el antibiótico ampicilina en todas las dosis. El cultivo de la microalga *C. calcitrans* CHCAL-5 se consideró gnotobiótico, ya que sólo presentó una cepa bacteriana (no identificada) en todas las ocasiones en que se sembró una muestra del cultivo en AM. Esta cepa de bacteria no generó ningún resultado positivo durante pruebas de antagonismo en contra de las cepas de *Vibrio harveyi* y *V. parahaemolyticus* utilizadas en las infecciones experimentales, por lo cual no se consideró que el cultivo de la microalga *C. calcitrans* tenga un efecto negativo en la recreación de la vibriosis experimental y fue utilizado como fuente de alimento para las larvas de camarón.

Los experimentos correspondientes a fagoterapia fueron llevados a cabo durante una estancia de investigación en Ecuador, y en dicha estancia se observó que el

cultivo de CHCAL-5 no creció adecuadamente en el Laboratorio de Microalgas (BIOGEMAR, Ecuador) por lo que se evaluó la efectividad de las cepas *T. weissflogii* y *C. muelleri* en la alimentación de larvas zoea proporcionadas por BIOGEMAR, S.A. En la mayoría de los trabajos se reporta una diferencia significativa en la supervivencia de organismos alimentados con diferentes microalgas (Kumlu, 1998; D'Souza y Loneragan, 1999; D'Souza *et al.* 2000), encontrando en algunos casos que la combinación de microalgas promueven el rápido desarrollo a mysis I y una alta supervivencia. En este trabajo no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia de las larvas con las tres microalgas alcanzando una supervivencia mayor al 80 %, presencia de alimento en el tracto digestivo y formación de heces en todos los tratamientos. Sin embargo, se utilizó la microalga *T. weissflogii* para la alimentación de larvas de camarón blanco en los experimentos realizados en Ecuador sin que ello afectara el resultado de las pruebas de infección experimental y fagoterapia.

Como último punto en la estandarización de las condiciones de cultivo se trabajó con la con la reducción de la carga bacteriana asociada a los nauplios de camarón. Existen trabajos donde se emplean antibióticos y glutaraldehído en la obtención de larvas de bacalao y camarón axénicos (Simões *et al.*, 2002a; Forberg *et al.*, 2011), y aunque se lograron obtener organismos axénicos, el empleo de estos métodos no fue considerado ya que Marques *et al.* (2006b) mencionan que cada vez que se utilizan antibióticos para la desinfección de organismos se debe asegurar su completa eliminación, y en la estandarización del modelo de infección de esta tesis la presencia de residuos podría evitar la infección por parte de *Vibrio* o disminuir su efecto patógeno. Además el uso continuo de antibióticos conlleva a la selección de cepas resistentes (Defoirdt *et al.*, 2007), las cuales podrían comprometer la reproducibilidad de las pruebas. En este trabajo se probó la efectividad del desinfectante dióxido de cloro (ClO₂) para la obtención de nauplios axénicos. El ClO₂ es un desinfectante usado en el tratamiento de agua en Europa después de 1850, en la inactivación de hongos, bacterias y virus, y en productos de consumo humano (Benarde *et al.*, 1965; Berg *et al.*, 1982; Noss & Olivieri, 1985; Roberts & Reymond, 1994; Kim *et al.*, 1999; Andrews *et al.*, 2002). A pesar de que su efectividad como

desinfectante ha sido documentada en agua, vegetales y alimentos de origen marino, sólo se encontró un trabajo donde es utilizado con organismos vivos. Puente *et al.* (1992) encontraron que una concentración de 0.047 ppm de ClO₂ no tuvo efectos nocivos en nauplios y adultos de *Artemia*, pero si inhibió el crecimiento de *V. parahaemolyticus*. Debido a la susceptibilidad de los organismos, estos autores no pudieron utilizar concentraciones mayores a 0.285 ppm en las cuales observaron una inhibición significativa de la población bacteriana. En este trabajo se encontró que los nauplios de camarón mostraron una tolerancia mayor al ClO₂ con respecto a los nauplios de *Artemia* al presentar una alta supervivencia hasta una concentración de 0.3 ppm con un tiempo de exposición máximo de 5 min. Además con estos mismos parámetros se encontró una reducción promedio del 99.6 % de la carga bacteriana asociada a los nauplios, siendo este valor muy cercano al valor de 0.285 ppm reportado por Puente *et al* (1992), por lo cual el ClO₂ fue utilizado como desinfectante de los nauplios de camarón, evitando con ello la incorporación de bacterias exógenas que afecten la recreación de la vibriosis.

Se encontró que las mejores condiciones para el mantenimiento de larvas de camarón son: empleo de unidades experimentales estériles con 100 mL de AMAe con una densidad de 100 organismos. Las larvas deben ser previamente desinfectadas con dióxido de cloro (ClO₂) a una concentración de 0.3 ppm durante 5 min y alimentadas con el cultivo gnotobiótico de la microalga *Chaetoceros calcitrans* cepa CHCAL-5 utilizando dosis diarias de $1 \cdot 10^5$ cel·mL⁻¹. Utilizando estas condiciones se realizaron las infecciones experimentales y la evaluación de la fagoterapia, en las cuales los resultados fueron reproducibles y no se presentó ningún problema relacionado con las bacterias exógenas.

Infecciones experimentales

Se ha observado que *P. vannamei* puede tener una diversa población de bacterias dentro de sus tejidos incluyendo fermentadores de sucrosa en el tracto intestinal, pero en los animales enfermos esta situación es diferente ya que predominan una o dos especies de bacteria (Gómez-Gil *et al.*, 1998). Usando este criterio como base, las infecciones se realizaron usando sólo una cepa de *Vibrio* para lograr recrear la vibriosis en las larvas. Sin embargo, en las tres primeras infecciones experimentales se encontraron inconsistencias en el efecto de las cepas de *Vibrio* probadas lo cual aparentemente fue asociado a la microbiota presente en los nauplios y alimento. Lavilla-Pitogo *et al.* (1998) encontraron que la población de *V. harveyi* disminuye de forma efectiva en cultivos mixtos de *C. calcitrans* y *S. costatum* influenciado principalmente por la microbiota asociada a las diatomeas más que las propias microalgas o sus productos metabólicos, lo cual fue demostrado al mantenerse una alta población bacteriana en los filtrados de diatomeas libres de células. Con respecto a la microbiota asociada a los nauplios Abraham y Palaniappan (2004) reportaron la ausencia de bacterias luminiscentes en los huevos de *Penaeus monodon* debido a una adaptación simbiótica con bacterias antagónicas las cuales crecen en la superficie de los huevos, se alimentan de los nutrientes disueltos en el agua y protegen a los huevos de bacterias patógenas. Como se mencionó anteriormente, se logró la reducción de la carga bacteriana asociada a los nauplios a través del uso del desinfectante ClO_2 y con ello la interferencia observada en las primeras infecciones experimentales.

Una estrategia clave para estudiar las interacciones hospedero-microbiota es definir el funcionamiento del hospedero en ausencia de todos los microorganismos (libre de bacterias o condiciones gnotobióticas) y con ellos evaluar los efectos de una o varias poblaciones definidas de microorganismos o ciertos compuestos (Gordon & Pesti, 1971). Por lo anterior, en la cuarta infección experimental se utilizaron larvas sin desinfectar y desinfectadas con ClO_2 . En el primer caso se observó la presencia de protozoarios y una mortalidad del 100 % de las larvas en el tratamiento blanco, lo cual fue similar a lo reportado por Meyer-Willener (2005) quienes obtuvieron una

pobre supervivencia causada por protozoarios provenientes de una filtración ineficiente del agua marina y que proliferaron por la acumulación de alimento artificial no aprovechado. En las larvas desinfectadas con ClO_2 no se encontraron protozoarios y se logró una supervivencia mayor del 60 % en el blanco. Aunque no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia del blanco con respecto a las tratadas con *Vibrio* debido a la variabilidad de todo el grupo de datos, se logró demostrar el efecto negativo que puede presentar la microbiota sobre la estandarización y reproducibilidad del modelo de infección experimental propuesto en este documento.

En el caso de los criterios de selección de patógenos, se observó que en la mayoría de los trabajos donde se realizan infecciones experimentales, ya sea para catalogar el efecto de cepas potencialmente patógenas o que utilizan patógenos como control dentro de pruebas con bacterias antagónicas o compuestos antimicrobianos, la mortalidad es utilizada como el principal criterio de evaluación (Roque *et al.*, 1998; Immanuel *et al.*, 2004; Aguirre-Guzmán *et al.*, 2005; Karunasagar *et al.*, 2005; Balcazar *et al.*, 2007; Isnansetyo *et al.*, 2009; Buglione *et al.*, 2010). Otro criterio utilizado es la presencia de los signos de vibriosis. En el caso de larvas infectadas con *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* y *V. penicida* los signos reportados son: cuerpo opaco, necrosis, letargia, deformaciones del cuerpo y pérdida de apetito (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990; Aguirre-Guzmán *et al.*, 2001; 2010). A pesar de hacerse mención de cuales son dichos signos, no se encontró en la literatura ninguna imagen donde se haga referencia al daño y a la posición en las larvas, presentándose sólo cortes histológicos donde se pueden apreciar los daños en los tejidos, tales como melanosis, granulomas, infiltración hemocítica, degeneración vacuolar, necrosis, atrofia tubular (Robertson *et al.*, 1998; Labrie *et al.*, 2003; Aguirre-Guzmán *et al.*, 2010). En el presente trabajo, se realizó el registro de los principales signos de vibriosis manifestados en todos los casos (Figura 13) y para cada cepa de *Vibrio* (Figuras 17-20), los cuales fueron utilizados junto con la supervivencia, en la selección de la cepa patógena utilizada en la evaluación de la fagoterapia como tratamiento de vibriosis.

En las infecciones experimentales 5 y 6 las larvas expuestas a las dos cepas de *V. harveyi* no generaron mortalidades significativas con respecto al blanco, a diferencia de lo reportado por Lavilla-Pitogo *et al.* (1990) donde las larvas zoea presentaron una mortalidad del 74 % a las 48 h de exposición con presencia de puntos opacos en la región torácica y paquetes densos de bacterias en el tracto y la hemocele. Aguirre-Guzmán *et al.* (2001) también encontraron que *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* causan mortalidades de nauplio a poslarva, siendo los estadios nauplio y zoea los más susceptibles. Existen numerosos trabajos donde se menciona el efecto patógeno de *V. harveyi* sobre larvas, juveniles y adultos de diversas especies de camarón, sin embargo Vandenberghe *et al.* (1999) encontraron que las infecciones por *V. harveyi* son las más importantes durante los estadios poslarva hasta adulto, pero no durante los estadios tempranos. Una posible explicación a ello es dada por Kautsky *et al.* (2000) quienes reportaron que las fluctuaciones en las condiciones ambientales (oxígeno, temperatura, salinidad) tienen un efecto significativo en la virulencia de *V. harveyi*, siendo la salinidad más importante que la temperatura. Otro posible factor es la ausencia de bacteriófagos lisogénicos, los cuales confieren la virulencia a *V. harveyi* y otras especies (Ruangpan *et al.*, 1999; Oakey & Owens, 2000; Austin *et al.*, 2003; Munro *et al.*, 2003).

Las cepas de *V. parahaemolyticus* 17802 y PS-017 generaron mortalidades significativas ($p < 0.05$) en las pruebas de reto. La patogenicidad de la cepa PS-017 ya había sido reportada por Balcazar *et al.* (2007) quienes la utilizaron para recrear la vibriosis en juveniles de camarón blanco a una dosis de 10^6 UFC·mL⁻¹, encontrando presencia de mortalidad a partir del tercer día de exposición y una mortalidad acumulada del 33 % a los 14 días. A pesar de mostrar un mayor efecto patógeno la cepa PS-017 fue descartada dentro de este modelo, ya que a la fecha no se cuentan con fagos líticos específicos para ella los cuales serían utilizados en la siguiente etapa de evaluación de la fagoterapia. En la literatura existen más cepas de *V. parahaemolyticus* con las cuales se ha recreado la vibriosis, tal es el caso de la cepa denominada HL57. Labrie *et al.* (2003) y Aguirre-Guzmán *et al.* (2010) utilizaron esta cepa para infectar juveniles de camarón blanco, llegando a una mortalidad acumulada del 15 % y 7.5 % respectivamente, siendo ambas significativamente

diferentes con respecto al blanco. En el caso de 17802 la cepa fue aislada de un evento de envenenamiento en Shirasu, Japón y no se encontró ningún trabajo donde se evalúe su efecto en larvas de *Litopenaeus vannamei*, por lo cual este es el primer reporte donde se registra su virulencia.

Con respecto a la dosis se ha observado que valores entre 10^3 y 10^7 UFC·mL⁻¹ de *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* recrean la vibriosis en camarones peneidos (Robertson *et al.*, 1998; Aguirre-Guzmán *et al.*, 2001; Labrie *et al.*, 2003; Balcázar *et al.*, 2007; Aguirre-Guzmán *et al.*, 2010), pero con las dosis más altas se generan mortalidades cercanas al 50 % y el efecto en las larvas es más crónico y se mantiene por más tiempo con respecto a dosis menores (Robertson *et al.*, 1998; Aguirre-Guzmán *et al.*, 2001). En este estudio, las dos densidades más altas de la cepa 17802 fueron las únicas donde se presentó una mortalidad significativa en larvas de camarón, pero se decidió utilizar la dosis de $2 \cdot 10^6$ UFC·mL⁻¹ debido a que presenta una mayor mortalidad y más organismos presentaron signos de vibriosis. En el caso de la cinética de infección no se encontraron reportes del efecto de una bacteria durante intervalos de tiempo como se realizó en esta tesis, ya que en la mayoría de los trabajos donde se hace un seguimiento diario de los organismos sólo se registra la mortalidad observada hasta llegar a un tiempo final (Roque *et al.*, 1998; Roque *et al.*, 2000). Robertson *et al.* (1998) realizaron infecciones de larvas de *Penaeus vannamei* con *V. harveyi* durante dos horas de exposición. Ellos evaluaron diariamente la presencia de bioluminiscencia, cambios en el comportamiento y en los patrones de alimentación, diferencias en el estadio de desarrollo y mortalidad. Estos autores encontraron que a las 240 h con una dosis de 10^7 UFC·mL⁻¹ se presentó un retraso en el estadio de desarrollo, menos movilidad, bioluminiscencia, mortalidad del 49 % de los organismos y una mayor presencia de signos de vibriosis. Por su parte Aguirre-Guzmán *et al.* (2001) realizaron la infección con cepas de *Vibrio* sobre diferentes estadios de desarrollo de *Litopenaeus vannamei*, tomando cada estadio después de la metamorfosis y exponiéndolos sólo durante 30 min a cada cepa. El registro de la supervivencia y signos de vibriosis lo realizaron a las 48 h post-exposición encontrando que con dosis mayores de 10^5 UFC·mL⁻¹ de *V. parahaemolyticus* se genera mortalidad significativa y presencia de signos de

vibriosis en las larvas. En esta tesis todas las larvas fueron expuestas a la bacteria desde el inicio del experimento y la supervivencia de las larvas, signos de vibriosis y estadio de desarrollo se registraron a las 96 h, donde se observó una mayor mortalidad y presencia e intensidad de los signos de vibriosis en los organismos. Considerando lo anterior, se utilizaron como criterios para la recreación de vibriosis el uso de la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* cepa 17802 a una dosis de $2 \cdot 10^6$ UFC·mL⁻¹ durante 96 h de exposición.

Además, los resultados sugieren que existen diferencias en la patogenicidad de las cepas de *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*, lo cual dependió no sólo de la especie y cepa de bacteria, sino también de la dosis y tiempo de exposición como fue sugerido por otros autores (Roque *et al.*, 2000; Saulnier *et al.*, 2000; Aguirre-Guzmán *et al.*, 2001; 2010).

Con respecto al modelo de infección Gómez-Gil *et al.* (1998) encontraron que debido a la ausencia de un modelo experimental fiable para reproducir la vibriosis en laboratorio, no es posible determinar si la vibriosis ocurre como resultado de la multiplicación de una bacteria presente en los tejidos o por una invasión de bacterias externas presentes en el ambiente circundante. Además, con estos modelos se puede evaluar la virulencia de vibrios asociados con mortalidades, tratamientos profilácticos y curativos, y estudiar factores dentro del hospedero que influyen la expresión de la virulencia bacteriana (Saulnier *et al.*, 2000). Aunado a lo anterior la mayoría de los estudios se enfocan al aislamiento, caracterización e identificación de las cepas bacterianas presentes en tejidos y agua de cultivo en el tiempo de la infección (Soto-Rodríguez *et al.*, 2006), sin considerar que el agente causal pudo no ser aislado o su efecto patógeno no fue expresado debido a la interferencia de otros microorganismos, alimento o factores fisicoquímicos dentro de los sistemas experimentales. Por lo anterior, se ha iniciado un esfuerzo en el desarrollo de un modelo de infección experimental consistente y reproducible para larvas de camarón. Sin embargo, los estudios de infección con camarón han tenido un éxito limitado, principalmente por la variabilidad intrínseca y la falta de reproducibilidad (Gómez-Gil *et al.*, 1998; Saulnier *et al.*, 2000; Soto-Rodríguez *et al.*, 2006). Roque *et al.* (1998)

proponen un modelo experimental para la recreación de vibriosis usando poslarvas 6-7 a través del método de inmersión a una dosis de 10^5 UFC·mL⁻¹. Este modelo presenta puntos que comprometen la reproducibilidad del mismo, dentro de los que podemos mencionar: A) Las altas mortalidades sólo se logran cuando los organismos son dañados con pequeñas incisiones en la cutícula y músculo, y B) Se reportó la presencia de bacterias (aisladas en agar TCBS) dentro de los sistemas de cultivo, por lo que no se sabe si el agente causal de la mortalidad fue la bacteria adicionada por los autores o una de las bacterias presentes en el sistema de cultivo.

Por lo anterior, en el presente trabajo se estandarizó un modelo de infección experimental el cual presenta varias ventajas con respecto a los modelos previamente propuestos, dentro de los que podemos señalar: A) El control de la composición del agua de mar artificial. B) La densidad de organismos es cinco veces mayor con respecto a la densidad más utilizada en pruebas de reto. C) Las unidades experimentales son de fácil manejo, además pueden ser esterilizadas lo que determina la eliminación de las bacterias presentes en el contenedor y el agua antes y después de los experimentos. D) La carga bacteriana en el alimento y larvas fue reducida a un nivel en el cual no generó interferencia en las infecciones experimentales. E) Por último, los resultados con larvas de Acuicultura Mahr S.A. de C.V., México y BIOGEMAR S.A., Ecuador fueron muy similares entre sí y se logró reproducir la vibriosis con *V. parahaemolyticus* cepa 17802 en todas las ocasiones sin la necesidad de ajustar ninguna de las condiciones, lo cual fue un punto a favor para el uso de este modelo de infección con diferentes lotes de nauplios de *Litopenaeus vannamei*.

Algunas de las técnicas usadas para recrear la vibriosis son inmersión o exposición directa, inyección intramuscular, bioencapsulación en alimento y daños superficiales (Roque *et al.*, 1998; 2000; Saulnier *et al.*, 2000), dentro de las cuales la infección por inmersión, utilizada en esta tesis, es una de las mejores opciones ya que asemeja las condiciones naturales donde el camarón es expuesto a la bacteria (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2010). Además Simões *et al.* (2002a) mencionan que es muy factible la ingestión accidental de bacterias por parte de zoeas, ya sea adheridas a

las partículas de alimento o libres en la columna de agua (“oral drinking”). Sin embargo, estas bacterias pueden ser eliminadas por las heces, mientras que la nueva colonización del epitelio absorbente del tronco del intestino medio se logra gracias a la entrada continua de agua a través del ano.

El único factor que no se pudo controlar dentro del modelo fue la calidad del nauplio, la cual es dependiente de los reproductores. Palacios *et al.*, 1999 reportaron que en algunas de sus pruebas se presentaron altas mortalidades en el tratamiento blanco lo cual fue atribuido a una baja calidad del nauplio. Ellos mencionaron que la calidad de los nauplios disminuye cuando estos provienen de hembras con múltiples desoves o enfermas. Con respecto a esto, se observó que la supervivencia de las larvas blanco en los diferentes experimentos no fue constante encontrándose principalmente un intervalo de supervivencia de 60 y 80 %, tanto para las larvas de Acuacultura Mahr S.A. de C.V. y BIOGEMAR S.A., sin que ello afectará el comportamiento de las cepas patógenas y la efectividad de la fagoterapia. Sin embargo, es recomendable la elaboración de un protocolo que permita conocer la calidad de los nauplios, permitiendo con ello el uso de larvas con niveles de calidad similares.

Fagoterapia

A pesar de que los bacteriófagos fueron descubiertos hace más de 80 años, su uso en el control de enfermedades bacterianas en camaronicultura ha sido poco explorado (Karunasagar *et al.*, 2005; 2007; Vinod *et al.*, 2006). Debido a lo anterior se realizó una evaluación de los fagos disponibles en el laboratorio específicos para cepas de *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*. En el caso de los fagos denominados F8 y F12 estos no fueron usados debido a que no se logró recrear la infección con ninguna de las cepas disponibles de *V. harveyi*. A pesar de lo anterior se demostró el efecto lítico que presentan ambos fagos, por lo que no se descarta su uso posterior en el tratamiento de vibriosis (*v. gr.* Para prevenir síndrome de Zoea II). Con respecto al ciclo de replicación de los fagos vpms1 y A3S, en la figura 5 se observó una disminución en la absorbancia del cultivo de la cepa 17802 mediante la adición de fagos, lo cual se interpreta como una disminución de la densidad de la bacteria debido a la lisis generada al final del ciclo de replicación lítico de los fagos. Baross *et al.* (1978) evaluaron la incidencia de bacteriofagos específicos para *V. parahaemolyticus* y otros vibrios encontrando una alta cantidad de fagos virulentos o líticos en muestras de ostras. También se han reportado aislamientos de fagos líticos en sistemas de cultivo de camarón (Chrisolite *et al.*, 2008; Makarov, 2008; 2010) y en algunos casos se ha evaluado su potencial como biocontrol de patógenos bacterianos en acuicultura (Karunasagar *et al.*, 2005; Vinod *et al.*, 2006). Considerando lo anterior el aislamiento y cultivo de fagos marinos ha mostrado ser obicuo en el agua de mar (Alagappan *et al.*, 2010), sin embargo es necesario evaluar el potencial de estos fagos en diferentes condiciones durante infecciones experimentales y en condiciones de cultivo.

En la primera evaluación, el extracto crudo de los fagos A3S y vpms1 generó una disminución significativa de la mortalidad ($p < 0.05$) y una disminución en la intensidad y cantidad de signos de vibriosis. Antes de hablar del efecto benéfico de los fagos, es necesario mencionar el valor de la multiplicidad de infección (MOI), el cual se refiere al número de fagos por cada célula bacteriana (Abedon, 2009). Este valor es utilizado como criterio para definir entre una terapia pasiva, donde la dosis inicial de

fagos genera una infección masiva de las bacterias eliminándolas en una infección primaria, y una terapia activa, en la cual la mayoría de las bacterias son eliminadas por una infección secundaria después de una extensa producción y transmisión de fagos (Payne & Jansen, 2000). En el presente trabajo el valor de MOI <1 en la mayoría de los casos y sólo el extracto usado en el tiempo de aplicación presentó una alta titulación de fagos alcanzando una MOI de 2.38. Sin embargo, de acuerdo con los criterios reportados por Abedon (2009) un valor de MOI igual o mayor a 10 es considerado como una terapia pasiva, por lo que todas las pruebas de fagoterapia realizadas en el presente trabajo se consideraron como terapia activa. Considerando lo anterior en el presente estudio se observó que valores pequeños de fagos son suficientes para la prevención de la vibriosis durante condiciones experimentales, lo cual a nivel comercial podrá disminuir los costos relacionados con el tratamiento de brotes infecciosos.

En la prueba con dosis de fagos se encontró algo interesante: los extractos del fago A3S generaron mortalidades del 100% a partir de dosis de 400 μL ($5.84 \cdot 10^6$ UFP $\cdot\text{mL}^{-1}$) y en el caso de vpms1 a partir de dosis de 800 μL ($1.34 \cdot 10^8$ UFP $\cdot\text{mL}^{-1}$). Calendar (2006) menciona que es necesaria la realización de pruebas previas para evaluar los efectos adversos asociados con preparaciones de fagos debido a la presencia de endo y exotoxinas liberadas durante el crecimiento normal de las bacterias y por la lisis. Por lo que se evaluó el efecto de la suspensión del fago vpms1 sobre larvas no expuestas a la bacteria. En esta ocasión solamente se utilizó el fago vpms1 ya que las larvas presentaron una mayor tolerancia a este extracto con una dosis máxima de 400 μL . Las larvas presentaron nuevamente una mortalidad a dosis altas (>600 μL) lo cual es posiblemente asociado a toxinas presentes en los extractos crudos. Existen numerosos trabajos donde se evalúa la presencia de genes que codifican hemolisinas directas termoestables (TDH), hemolisinas relacionadas con TDH (TRH) y hemolisinas termolábiles (TLH) en varias cepas de *V. parahaemolyticus*, los cuales se relacionan con potenciales cepas patógenas para humanos (Alam *et al.*, 2003; Gopal *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2005; Fuenzalida *et al.*, 2007; Su & Liu, 2007). En el caso de organismos acuáticos, Cheng *et al.* (2008) utilizan un extracto crudo que contiene los productos extracelulares de la cepa 6, el

cual licúa la mayor parte del tejido de poslarvas de abulón a las 6 h y en algunos casos el cuerpo completo. Considerando estos problemas, se encuentran muchos trabajos acerca de la efectividad antibacteriana y terapéutica de los fagos, sin embargo hay pocos trabajos acerca de la ingeniería en la producción y procesos posteriores de purificación de fagos (Dorval-Courchesne *et al.*, 2009). En esta tesis no se determinó cual o cuales factores relacionados con el extracto crudo generaron la mortalidad en los organismos a dosis altas, por lo cual sólo se decidió utilizar la menor dosis posible y aumentar el número de UFP por mililitro para evitar estos inconvenientes.

Como prueba final en la aplicación de la fagoterapia se evaluó el efecto del tiempo de aplicación sobre larvas expuestas a la cepa 17802. Se observaron diferencias significativas en la supervivencia cuando se adicionaron fagos a las 24 y 36 h post-infección, sin embargo es importante señalar que en todos los tiempos la supervivencia fue mayor al 63 % y diferente significativamente de aquellas expuestas solamente a la bacteria a las 96 h ($p < 0.05$), encontrándose un efecto protector y correctivo en la aplicación de fagos. Bull *et al.* (2002) encuentran que el posponer el tratamiento de fagos por 8 horas aumenta sustancialmente la tasa de mortalidad de ratones en relación con el tratamiento inmediato. A pesar de encontrar un resultado opuesto, no se pueden hacer comparaciones directas entre este trabajo y otros publicados para organismos terrestres ya que se presentan diferencias en las condiciones ambientales, la virulencia y patogenicidad de las cepas. En el caso de acuicultura se encontraron pocos trabajos donde realicen esta evaluación, siendo los más sobresalientes los realizados por Nakai *et al.* (1999) y Park *et al.* (2000). En ambos trabajos se reportó un efecto protector por parte de los fagos con un tiempo máximo de aplicación post-infección de 24 h sobre los peces *Seliora quinqueradiata* y *Plecoglossus altivelis* respectivamente, siendo este resultado muy similar a lo postulado en esta tesis.

Finalmente se encontró un efecto benéfico de la fagoterapia sobre infecciones experimentales por *V. parahaemolyticus*. Este resultado refuerza lo propuesto por diversos autores (Park *et al.*, 2000; Karunasagar *et al.*, 2005; 2007; Vinod *et al.*,

2006; Chrioslite *et al.*, 2008; Alagappan *et al.*, 2010), quienes mencionan que la terapia de fagos es una solución aplicable y segura para el control de vibriosis en estanques de camarón, ya que los bacteriófagos son aislados a partir de bacterias en los propios sistemas de cultivo, su empleo requiere de una sola aplicación y pueden ser usados como tratamiento profiláctico al inhibir el crecimiento de bacterias en la columna de agua y no generar la selección de cepas resistentes.

IX. CONCLUSIONES

- Las condiciones de manejo implementadas en el presente trabajo son adecuadas para mantener larvas de camarón blanco desde nauplio V hasta mysis I. Las mejores supervivencias se obtuvieron en unidades experimentales estériles con 100 mL de AMAe y una densidad de 100 larvas, desinfección de las larvas con con dióxido de cloro (ClO₂) a una concentración de 0.3 ppm durante 5 min y una alimentación basada en dosis diarias $1 \cdot 10^5$ cel·mL⁻¹ de un cultivo gnotobiótico de la microalga *Chaetoceros calcitrans* cepa CHCAL-5.
- La cepa ATCC 17802 *Vibrio parahaemolyticus* es un buen modelo para el estudio de la vibriosis en larvas de camarón blanco, ya que a una dosis de $2 \cdot 10^6$ UFC·mL⁻¹ genera mortalidades significativas con respecto a los controles, e induce signos evidentes de vibriosis y los resultados son reproducibles.
- El uso de fagos es efectivo como tratamiento preventivo de la vibriosis causada por *V. parahaemolyticus* en larvas de camarón blanco; su aplicación temprana reduce la mortalidad de forma significativa y disminuye la presencia de signos de vibriosis incluso con dosis bajas (MOI<0.04).
- La aplicación de fagos es efectiva como medida de control de la vibriosis en larvas de camaròn, ya que detiene la mortalidad y dismiye de la expresión de los signos de la enfermedad en organismos a las 12 horas post infección.

X. RECOMENDACIONES

Realizar un protocolo para una evaluación de la calidad del lote de larvas, ya que en algunas ocasiones la calidad del lote fue baja presentándose la muerte de todos los organismos en el periodo de aclimatización.

Se recomienda la búsqueda de un alimento microparticulado o vivo el cual pueda ser fácil de axenizar, con el objetivo de eliminar todo tipo de interferencia relacionada con la microbiota presente en el alimento.

Realizar una evaluación de la susceptibilidad de larvas expuestas a diferentes cepas de *Vibrio* a través de la modificación de parámetros como salinidad, temperatura, oxígeno y pH, debido a que se ha reportado que el desarrollo de un brote infeccioso puede estar relacionado al estrés generado por cambios en los parámetros físico-químicos.

En experimentos posteriores se puede emplear la bacteria *Vibrio harveyi*, sin embargo se debe considerar que la infección depende de la susceptibilidad del hospedero y que no todas las cepas de una misma especie tienen la capacidad de generar una infección; siendo la virulencia de *V. harveyi* asociada a la presencia de fagos lisogénicos.

Generar una suspensión de fagos con una densidad mayor a $1 \cdot 10^9$ UFP·mL⁻¹ para evaluar el efecto de una terapia pasiva adicionando una cantidad mínima de la suspensión de fagos, evitándo con ello los posibles daños generados por los productos de las bacterias. Otra alternativa a esto es la concentración de fagos a través de métodos como filtración o Cloruro de Cesio, donde además se elimina el medio de cultivo y los productos liberados durante la lisis.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abedon, S.T. 2009. Kinetics of Phage-Mediated Biocontrol of Bacteria. Foodborne Pathogens and Disease, 6(7): 807-815.
- Abraham, T.J. & R. Palaniappan. 2004. Distribution of luminous bacteria in semi-intensive penaeid shrimp hatcheries of Tamil Nadu, India. Aquaculture, 232:81-90.
- Ackermann, H.W. 2003. Bacteriophage observations and evolution. Res. Microbiol., 154:245-251.
- Aguirre-Guzmán, G. & F. Ascencio-Valle. 2000. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. Recent research developments in microbiology, 4:333-348.
- Aguirre-Guzmán, G., F. Ascencio & D. Saulnier. 2005. Pathogenicity of *Vibrio penaeicida* for white shrimp *Litopenaeus vannamei*: a cysteine protease-like exotoxin as a virulence factor. Dis. Aquat. Org., 67:201-207.
- Aguirre-Guzmán, G., H. Mejía-Ruíz & F. Ascencio. 2004. A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. Aquac. Res., 35:1395-1404.
- Aguirre-Guzmán, G., J.G. Sánchez-Martínez, R. Pérez-Castañeda, A. Palacios-Monzón, T. Trujillo-Rodríguez & N.I. de la Cruz-Hernández. 2010. Pathogenicity and infection route of *Vibrio parahaemolyticus* in american white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. J. World Aquac. Soc., 41(3): 464-470.
- Aguirre-Guzmán, G., R. Vázquez-Juárez & F. Ascencio. 2001. Differences in the Susceptibility of American White Shrimp Larval Substages (*Litopenaeus vannamei*) to Four *Vibrio* Species. J. Invertebr. Pathol., 78:215-219.

- Alagappan, K.M., D. Deivasigamani, S.T. Somasundaram & S. Kumaran. 2010. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and its specific phages from shrimp ponds in east coast of India. Curr. Microbiol., 61(4):235-240.
- Alam, M.J., S. Miyoshi & S. Shinoda. 2003. Studies on pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* during a warm weather season in the Seto Inland Sea, Japan. Environ. Microbiol., 5(8): 706-710.
- Alday-Sanz, V., I. Karunasagar & I. Karunasagar. 2007. Compositions comprising lytic enzymes of bacteriophages for treating bacterial infections. WIPO Patent Application WO2007128348.
- Alday-Sanz, V., I. Karunasagar & B. Van-Delsen. 2006. Phage lysins tested against Vibrios. Global Aquaculture Advocate, 85-86.
- Álvarez, A.L., I.S. Racotta, O. Arjona & E. Palacios. 2004. Salinity stress test as a predictor of survival during growout in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture., 237:237-249.
- Andrews, L.S., A.M. Key, R.L. Martin, R. Grodner & D.L. Park. 2002. Chlorine dioxide wash of shrimp and crawfish an alternative to aqueous chlorine. Food Microbiol., 19:261-267.
- Austin, B., A.C. Pride & G.A. Rhodie. 2003. Association of a bacteriophage with virulence in *Vibrio harveyi*. J. Fish Dis., 26:55–58.
- Balcázar, J.L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell & J.L. Múzquiz. 2006. The role of probiotics in aquaculture. Veterinary Microbiology., 114: 173-186.
- Balcazar, J.L. & T. Rojas-Luna. 2007. Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Curr. Microbiol., 55:409–412

- Baross, J.A., J. Liston & R.Y. Morita. 1978. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophages and other *Vibrio* bacteriophages in marine samples. Appl. Environ. Microbiol., 36(3): 492-499.
- Benarde, M.A., B.M. Israel, V.P. Olivieri & M.L. Granstrom. 1965. Efficiency of chlorine dioxide as a bactericide. Appl. Microbiol., 13:776-780.
- Berg, J.D., A. Matin & P.V. Roberts. 1982. Effect of antecedent growth conditions on sensitivity of *Escherichia coli* to chlorine dioxide. Appl. Environ. Microbiol., 44(4): 814-819.
- Biswas, B., S. Adhya, P. Washart, B. Paul, A.N. Trostel, B. Powell, R. Carlton & C.R. Merrill. 2002. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. Infect. Immunol., 70: 204–210.
- Borowitzka, M.A. 1997. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. J. Appl. Phycol., 9: 393–401.
- Brown, M.R. 2002. Nutritional value of microalgae for aquaculture, 281-292. En: Cruz-Suárez, L.E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.G. Gaxiola-Cortés & N. Simoes (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México, 592 p.
- Bruckner, C. G., R. Bahulikar, M. Rahalkar, B. Schink & P. G. Kroth. 2008. Bacteria associated with benthic diatoms from Lake Constance: phylogeny and influences on diatom growth and secretion of extracellular polymeric substances. Appl. Environ. Microbiol., 74:7740-7749
- Brüssow, H. & E. Kutter. 2005. Phage ecology, 129–163. En: Kutter, E., A. Sulakvelidze (eds). Bacteriophages: biology and applications. CRC Press, Boca Raton, FL, 510 p.

- Buglione, C.C., F.D. Nascimento-Vieira, J.L. Pedreira-Mouriño, F.S. Pedrotti, A. Jatoba & M. Laterça-Martins. 2010. Experimental infection with different bacterial strains in larvae and juvenile *Litopenaeus vannamei* reared in Santa Catarina State, Brazil. Acta Scientiarum, Biological Sciences, 32(3): 291-296.
- Bull, J.J., B.R. Levin, T. DeRouin, N. Walker & C.A. Bloch. 2002. Dynamics of success and failure in phage and antibiotic therapy in experimental infections. BMC Microbiol., 2(35):1-10.
- Cabello, F.C. 2004. Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal. Revista Médica de Chile., 132:1001-1006.
- Calendar, R. 2006. The bacteriophages. 2nd edition. Oxford University Press, EUA, 746 p.
- Campa-Córdova, A.I., A. Luna-González, F. Ascencio, E. Cortés-Jacinto & C.J. Cáceres-Martinez. 2006. Effects of chloramphenicol, erythromycin, and furazolidone on growth of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros gracilis*. Aquaculture, 260: 145–150.
- Carmona-Pérez, R. 2010. Evaluación de una mezcla de bacterias y alimento inerte como alternativa para el cultivo de *Artemia*. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. México. 103 p.
- Carlton, R.M. 1999. Phage Therapy: Past History and Future Prospects. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 47:267–274.
- Carlton, R.M., W.H. Noordman, B. Biswas, E.D. de Meester & M.J. Loessner. 2005. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 43:301–312.

- Cheng, L., J. Huang, C. Shi, K.D. Thompson, B. Mackey & J. Cai. 2008. *Vibrio parahaemolyticus* associated with mass mortality of postlarval abalone, *Haliotis diversicolor supertexta* (L.), in Sanya, China. J. World Aquac. Soc., 39(6): 746-757.
- Chien, Y.H. 1992. Water quality requirements and management for marine shrimp culture, 144–156. En: Wyban, J. (Ed.), Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA. 289 p.
- Chotikachinda, R., W. Lapjatupon, S. Chaisilapasung, D. Sangsue & C. Tantikitti. 2008. Effect of inactive yeast cell wall on growth performance, survival rate and immune parameters in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Songklanakarin J. Sci. Technol., 30(6):687-692.
- Chrisolite, B., S. Thiyagarajan, S.V. Alavandi, E.C. Abhilash, N. Kalaimani, K.K. Vijayan & T.C. Santiago. 2008. Distribution of luminescent *Vibrio harveyi* and their bacteriophages in a commercial shrimp hatchery in South India. Aquaculture, 275: 13-19.
- Chythanya, R., I. Karunasagar & I. Karunasagar. 2002. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. Aquaculture, 208: 1–10.
- Colwell, R.R. 2006. A global and historical perspective of the genus *Vibrio*, 3-11. En: Thompson, F.L., B. Austin & J Swings (Eds.) The biology of vibrios. ASM Press, Washington, 423 p.
- Coutteau P., N.H. Hadley, J.J. Manzi & P. Sorgeloos. 1994. Effect of algal ration and substitution of algae by manipulated yeast diets on the growth of juvenile *Mercenaria mercenaria*. Aquaculture, 120:135-150.
- Coutteau P., P. Lavens & P. Sorgeloos. 1990. Baker's yeast as a potential substitute for live algae aquaculture diets: *Artemia* as a case study. J. World Aquac. Soc., 21(1):1-9.

- Cuzon, G., A. Lawrence, G. Gaxiola, C. Rosas & J. Guillaume. 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. Aquaculture, 235: 513-551.
- Defoirdt, T., N. Boon, P. Sorgeloos, W. Verstraete & P. Bossier. 2007. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. Trends Biotechnol., 25:472–479.
- Donlan, R.M. 2009. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. Trends in microbiology. 17(2): 66-72.
- Dorval-Courchesne, N.M., A. Parisien & C.Q. Lan. 2009. Production and application of bacteriophage and bacteriophage-encoded lysins. Recent Patents on Biotechnology, 3(1): 1-9.
- D'Souza F.M.L., D. Lecossois, M.P. Heasman, J.A. Diemar, C.J. Jackson & R.C. Pendrey. 2000. Evaluation of centrifuged microalgae concentrates as diets for *Penaeus monodon* Fabricius larvae. Aquacult. Res., 31:661–670.
- D'Souza F.M.L. & N.R. Loneragan. 1999. Effects of monospecific and mixed-algae diets on survival, development and fatty acid composition of penaeid prawn (*Penaeus* spp.) larvae. Marine Biology, 133:621–633.
- FAO. 2010. *The State of the Worlds Fisheries and Aquaculture 2010*. Rome. FAO. 197 p.
- Flegel, T.W. 2006. The special danger of viral pathogens in shrimp translocated for aquaculture. Sci. Asia., 32: 215-221.
- Forberg, T., A. Arukwe & O. Vadstein. 2011. A protocol and cultivation system for gnotobiotic Atlantic cod larvae (*Gadus morhua* L.) as a tool to study host microbe interactions. Aquaculture, 315: 222-227.
- Fruciano, D.E. 2007. Phage as an antimicrobial agent: d'Herelle's heretical theories and their role in the decline of phage prophylaxis in the West. J. Infect. Dis., 18(1):19-26.

- Fuenzalida, L., L. Armijo, B. Zabala, C. Hernández, M.L. Rioseco, C. Riquelme & R.T. Espejo. 2007. *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated during investigation of the summer 2006 seafood related diarrhea outbreaks in two regions of Chile. Int. J. Food Microbiol., 117: 270-275.
- García, E. & R. López. 2002. Los bacteriófagos y sus productos génicos como agentes antimicrobianos. Rev. Esp. Quimioterap. 15(4), 306-312.
- Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture, 180: 147-165.
- Godínez, D.E., A.H. Díaz & M.C. Gallo. 2005. Índice de desarrollo y supervivencia de larvas del camarón azul *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1871), alimentadas con diferentes concentraciones de *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen). Rev. Col. Cienc. Pec., 18(1):27-33.
- Gómez-Gil, B., A. Roque & FA Guerra. 2001. Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto del uso de antimicrobianos, 316-346. En: Páez-Osuna F. (ed.), Camaronicultura y Medio Ambiente. UNAM. 452.
- Gómez-Gil, B., L. Tron-Mayén, A. Roque, J.F. Turnbull, V. Inglis & A.L. Guerra-Flores. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 163: 1-9.
- Gopal, S., S. Otta, S. Kumar, I. Karunasagar, M. Nishibuchi & I. Karunasagar. 2005. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. Int J Food Microbiol., 102: 151–159.
- Gordon, H.A. & L. Pesti. 1971. The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships. Bacteriological Reviews, 35(4): 390-429.
- Hanlon, G.W. 2007. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. International Journal of Antimicrobial Agents, 30: 118-128.

- Harris, L.J. & L. Owens. 1999. Production of exotoxins by two luminous *Vibrio harveyi* strains known to be primary pathogens of *Penaeus monodon* larvae. Dis. Aquat. Org., 38: 11-22.
- Hermoso, J.A., J.L. García & P. García. 2007. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. Curr Opin Microbiol., 10:1–12.
- Holmström, K., S. Gräslund, A. Wahlström, S. Pongshompoo, B.E. Bengtsson & N. Kautsky. 2003. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. Int. J. Food Sci. Technol., 38:255–266.
- Immanuel, G., V.C. Vincybai, V. Sivaram, A. Palavesam & M.P. Marian. 2004. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. Aquaculture, 236: 53-65.
- Isnansetyo, A., I. Istiqomah, M.S. Shofihar, R.K. Hernawan & T.J. Widada. 2009. A potential bacterial biocontrol agent, strain S2V2 against pathogenic marine *Vibrio* in aquaculture. World J. Microbiol. Biotechnol., 25:1103–1113.
- Jayasankar, P. & M.S. Muthu. 1983a. Toxicity of ammonia to the larvae of *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. Indian J. Fish., 30(1):1-12.
- Jayasankar, P. & M.S. Muthu. 1983b. Toxicity of nitrite to the larvae of *Penaeus indicus*. Indian J. Fish., 30(2):231-240.
- Karunasagar, I., R. Pai, G.R. Malathi & I. Karunasagar. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture, 128:203–209.
- Karunasagar, I., M. Shivu, S.K. Girisha, G. Krohne & I. Karunasagar. 2007. Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. Aquaculture. 268:288-292.

- Karunasagar, I., M. Vinod, B. Kennedy, A. Vijay, A. Deepanjali, K. Umesh & I. Karunasagar. 2005. Biocontrol of bacterial pathogens in aquaculture with emphasis on phage therapy, 535-542. En: Walker P, R Lester, MG Bondad-Reantaso (Eds). Diseases in Asian Aquaculture V, Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philipinas, 633 p.
- Kautsky, N., P. Rönnbäck, M. Tedengren & M. Troell. 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. Aquaculture, 191: 145-161.
- Kim, S., B. Schuler, A. Terekhov, J. Auer, L.J. Mauer, L. Perry, N. Walker & C.A. Bloch. 2009. A bioluminescence-based assay for enumeration of lytic bacteriophage. J. Microbiol. Methods, 79:18-22.
- Kropinski, A.M. 2006. Phage Therapy – Everything old is new again. Can J Infect Dis Med Microbiol., 17(5):297-306.
- Kuban, F.D., A.L. Lawrence & J. Wilkenfeld. 1985. Survival, metamorphosis and growth of larvae from four penaeid species fed six food combinations. Aquaculture, 47:151–162.
- Kumlu, M. 1998. Larval growth and survival of *Penaeus indicus* (Decapoda: Penaeidae) On Live Feeds. Tr. J. of Biology, 22: 235-245.
- Kutter, E. & A. Sulakvelidze. 2005. Bacteriophages: biology and applications. CRC Press, Boca Raton, FL, 510 p.
- Labrie, L., A. Roque, B. Gomez-Gil & J.F. Turnbull. 2003. Effect of methyl parathion on the susceptibility of shrimp *Litopenaeus vannamei* to experimental vibriosis. Dis. Aquat. Org., 57: 265-270.
- Lavilla-Pitogo, C.R., L.J. Albright & M.G. Paner. 1998. Will microbial manipulation sustain the ecological balance in shrimp (*Penaeus monodon*) hatcheries?, 185-192. En Flegel TW (ed) Advances in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, 296 p.

- Lavilla-Pitogo, C.R., M.C.L. Baticados, E.R. Cruz-Lacierda & L.D. de la Peña. 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. Aquaculture, 91: 1-13.
- Lightner, D.V. 1996. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, USA, 305 p.
- Madigan, M.T, J.M. Martinko & J. Parker. 1999. Brock. Biología de los Microorganismos. Prentice Hall, España, 1064 p.
- Makarov, R. 2008. Aislamiento y caracterización de vibriofagos de muestras de almeja chocolata *Megapitaria squalida* y camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de licenciatura. UABCS. México. 79 p.
- Makarov, R. 2011. Vibriofagos en el cultivo larvario del camarón y su relación con la incidencia y virulencia de vibrio. Tesis de maestría. CICIMAR-IPN. México. 160 p.
- Martin, G.G., N. Rubin & E. Swanson. 2004. *Vibrio parahaemolyticus* and *V. harveyi* cause detachment of the epithelium from the midgut trunk of the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*. Dis. Aquat. Org., 60, 21-29.
- Marques, A., J. Dhont, P. Sorgeloos & P. Bossier. 2006. Immunostimulatory nature of β -glucans and baker's yeast in gnotobiotic *Artemia* challenge tests. Fish Shellfish Immunol., 20: 682-692.
- Marques, A., F. Ollevier, W. Verstraete, P. Sorgeloos & P. Bossier. 2006. Gnotobiotically grown aquatic animals: opportunities to investigate host-microbe interactions. J. Appl. Microbiol., 100: 903-918.
- Matsuzaki, S., M. Rashel, J. Uchiyama, S. Sakurai, T. Ujihara, M. Kuroda, M. Ikeuchi, T. Tani, M. Fujieda, H. Wakiguchi & S. Imai. 2005. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. J Infect Chemother., 11:211-219.

- Meyer-Willerer, A.O. 2005. Survival of white shrimp larvae grown in different containers and fed natural or artificial diets. Avances en investigación agropecuaria. 9(1):1-8.
- Morales-Covarrubias, M.S. 2008. Enfermedades bacterianas, 119-136. En: Morales, V. & J. Cuéllar-Anjel (eds.). Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá, 270 p.
- Morrison, S. & D.J. Rainnie. 2004. Bacteriophage therapy: an alternative to antibiotic therapy in aquaculture?. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. 2532: 1-23.
- Munro, J., J. Oakey, E. Bromage & L. Owens. 2003. Experimental bacteriophage-mediated virulence in strains of *Vibrio harveyi*. Dis. Aquatic Org., 54: 187-194.
- Nakai, T., R. Sugimoto, K.H. Park, S. Matsuoka, K. Mori, T. Nishioka & K. Maruyama. 1999. Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. Dis. Aquat. Org., 37: 33-41.
- Naranjo J., Porchas A., Robles M., Magallón F., Valdéz J., Villarreal H., 1999. Sobrevivencia, metamorfosis y crecimiento de larvas del camarón *Penaeus californiensis* (Decapoda: Penaeidae) alimentadas con diferentes microalgas. Rev. Biol. Trop., 47, 917- 922.
- Noss, C.I. & V.P. Olivieri. 1985. Disinfecting capabilities of oxychlorine compounds. Appl. Environ. Microbiol., 50(5): 1162-1164.
- Oakey, H.J. & L. Owens. 2000. A new bacteriophage, VHML, isolated from a toxin-producing strain of *Vibrio harveyi* in tropical Australia. J. Appl. Microbiol., 89: 702-709.
- Palacios, E., C.I. Perez-Rostro, J.L. Ramirez, A.M. Ibarra & I.S. Racotta. 1999. Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival and growth. Aquaculture, 171:309-321.

- Park, S.C., I. Shimamura, M. Fukunaga, K. Mori & T. Nakai. 2000. Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. Appl. Environ. Microbiol., 66: 1416–1422.
- Park, S.C. & T. Nakai. 2003. Bacteriophages control of *Pseudomonas plecoglossicida* infection in ayu *Plecoglossus altivelis*. Dis. Aquat. Org., 53: 33–39.
- Payne, R.J.H. & V.A.A. Jansen. 2000. Phage therapy: The peculiar kinetics of self-replicating pharmaceuticals. Clin. Pharmacol. Ther., 68: 225-30.
- Piña, P., M. Nieves, L. Ramos-Brito, C.O. Chavira-Ortega & D. Voltolina. 2005. Survival, growth and feeding efficiency of *Litopenaeus vannamei* protozoa larvae fed different rations of the diatom *Chaetoceros muelleri*. Aquaculture, 249: 431-437.
- Piña, P., D. Voltolina, M. Nieves & M. Robles. 2006. Survival, development and growth of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* protozoa larvae, fed with monoalgal and mixed diets. Aquaculture, 253:523-530.
- Prayitno, S.B. & J.W. Latchford. 1995. Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio* – effect of salinity and pH on infectiosity. Aquaculture, 132:105–112.
- Puente, M.E., F. Vega-Villasante, G. Holguin & Y. Bashan. 1992. Susceptibility of the brine shrimp *Artemia* and its pathogen *Vibrio parahaemolyticus* to chlorine dioxide in contaminated seawater. J. Appl. Bacteriol., 73 (6): 465-471.
- Quiróz-Guzman, E. 2005. Aislamiento de bacterias y fagos para el control biológico de *Vibrio* spp. durante la eclosión de *Artemia*. Tesis de maestría. CICIMAR-IPN. México. 88 p.
- Racotta, I.S., E. Palacios, R. Hernández-Herrera, A. Bonilla, C.I. Pérez-Rostro & J.L. Ramírez. 2004. Criteria for assessing larval and postlarval quality of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931). Aquaculture, 233:181-195.

- Roberts, R.G. & S.T. Reymond. 1994. Chlorine dioxide for reduction of postharvest pathogen inoculum during handling of tree fruits. Appl. Environ. Microbiol., 60(8): 2864-2868.
- Robertson, P.A.W., J. Calderon, L. Carrera, J.R. Stark, M. Zherdmant, B. Austin. 1998. Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. Dis. Aquat. Org., 32: 151-155.
- Rohwer, F., D. Prangishvili & D. Lindell. 2009. Roles of viruses in the environment. Environ. Microbiol., 11(11) 2771-2774.
- Rojas-García, C.R., A.F.M. Hasanuzzaman, P. Sorgeloos & P. Bossier. 2008. Cell wall deficient *Saccharomyces cerevisiae* strains as microbial diet for *Artemia* larvae: Protective effects against vibriosis and participation of phenoloxidase. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 360: 1–8.
- Roque, A., A. Mazari & B. Gómez-Gil. 2000. Infección oral experimental de poslarvas de *Litopenaeus vannamei* a través de bioencapsulación de *Vibrio parahaemolyticus* en *Artemia franciscana*. Ciencias Marinas, 26(1):65-77.
- Roque, A., J.F. Turnbull, G. Escalante, B. Gomez-Gil & M.V. Alday-Sanz. 1998. Development of a bath challenge for the marine shrimp *Penaeus vannamei* Boone, 1931. Aquaculture, 169: 283-290.
- Ruangpan, L., Y. Danayadol, S. Direkbusarakom, S. Siurairatana & T.W. Flegel. 1999. Lethal toxicity of *Vibrio harveyi* to cultivated *Penaeus monodon* induced by a bacteriophage. Dis. Aquat. Org., 35: 195-201.
- Sangha, R.S., A.C. Puello-Cruz, M.C. Chavez-Sanchez & D.A. Jones. 2003. Survival and growth of *Litopenaeus vannamei* (Boone) larvae fed a single dose of live algae and artificial diets with supplements. Aquaculture Res., 31: 683-689.
- Santiago, M.L., A. Espinoza & M.C. Bermúdez. 2009. Uso de antibióticos en la camaronicultura. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 40(3):22-32.

- Saulnier, D., P. Haffner, C. Goarant, P. Levy & D. Ansquer. 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. Aquaculture, 191:133–144.
- Scholz, U., G. Garcia-Diaz, D. Ricque, L.E. Cruz-Suarez, F. Vargas-Albores & J. Latchford. 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. Aquaculture, 176:271-283.
- Simões, N., D.A. Jones, S.A. Soto-Rodríguez, A. Roque & B. Gómez-Gil. 2002a. Las bacterias en el inicio de la alimentación exógena en larvas de camarones peneidos: Efectos de la calidad del agua, tasas de ingestión y rutas de colonización del tracto digestivo, 243-276. En: Cruz-Suárez, L.E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.G. Gaxiola-Cortés & N. Simoes. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México, 592 p.
- Simões, N., A. Roque & B. Gómez-Gil. 2002b. *Litopenaeus vannamei* nauplii and protozoa morphology and its relation with potential routes of initial bacterial colonization of the digestive tract. Panorama Acuícola. 8(1): 36-40.
- Skurnik, M., M. Pajunen & S. Kiljunen. 2007. Biotechnological challenges of phage therapy. Biotechnol. Lett., 29:995-1003.
- Somboonwiwat, K., P. Supungul, V. Rimphanitchayakit, T. Aoki, I. Hirono & A. Tassanakajon. 2006. Differentially expressed genes in hemocytes of *Vibrio harveyi*-challenged shrimp *Penaeus monodon*. J. Biochem. Mol. Biol. 39: 26-36.
- Soto-Rodríguez, S.A., N. Simões, A. Roque & B. Gómez-Gil. 2006. Pathogenicity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminescent vibrios. Aquaculture, 258:109-115.

- Su, Y.C. & C. Liu. 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. Food Microbiol., 24: 549-558.
- Sudheesh, P.S. & H.S. Xu. 2001. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases. Aquaculture, 196: 37-46.
- Sulakvelidze, A., Z. Alavidze & J.G. Morris. 2001. Bacteriophage Therapy, Minireview. Antimicrob. Agents and Chemother., 45(3): 649–659.
- Sung, H.H., S.F. Hsu, C.K. Chen, Y.Y. Ting & W.L. Chao. 2001. Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. Aquaculture, 192:101-110.
- Sung, H.H., H.C. Li, F.M. Tsai, Y.Y. Ting & W.L. Chan. 1999. Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 236:261-271.
- Suttle, C.A. 2007. Marine viruses — major players in the global ecosystem. Nature Rev. Microbiol., 5: 801-812.
- Thakur, A.B., R.B. Vaidya & S.A. Suryawanshi. 2003. Pathogenicity and antibiotic susceptibility of *Vibrio* species isolated from moribund shrimps. Indian J. Mar. Sci., 32(1): 71-75.
- Thompson, J.R. & M.F. Polz. 2006. Dynamics of *Vibrio* populations and their role in environmental nutrient cycling, 190-203. En: Thompson, J.R., B. Austin & J. Swings (Eds.). The biology of Vibrios. ASM Press. Washington, DC. 423 p.
- Valenzuela-Espinoza, E., V. Gendrop-Funes, R. Pérez-Castañeda & J.G. Wilburn-González. 1999. Supervivencia de larvas de *Litopenaeus vannamei* (Boone) alimentadas con *Chaetoceros muelleri* producido con fertilizantes agrícolas. Ciencias Marinas. 25(3):423-437.

- Vandenberghe, J., F.L. Thompson, B. Gómez-Gil & J. Swings. 2003. Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. Aquaculture, 219: 9-20.
- Vázquez, J.A., M.P. González & M.A. Murado. 2005. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. Aquaculture, 245: 149-161.
- Vinod, M.G., M.M. Shivu, K.R. Umesha, B.C. Rajeeva, G. Krohne, I. Karunasagar & I. Karunasagar. 2006. Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments. Aquaculture, 255:117–124.
- Wang, Y.B. 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 269: 259-264.
- Wang, Y.B., J.R. Li & J. Lin. 2008. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. Aquaculture, 281: 1-4.
- Weinbauer, M.G. 2004. Ecology of prokaryotic viruses. FEMS Microbiol. Rev., 28:127-181.
- Won, K.M. & S.I. Park. 2008. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to cultured marine fishes in Korea. Aquaculture, 285: 8–13.
- Xie, Z.Y., C.Q. Hu, C. Chen, L.P. Zhang & C.H. Ren. 2005. Investigation of seven *Vibrio* virulence genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* strains from the coastal mariculture systems in Guangdong, China. Lett. Appl. Microbiol., 41: 202-207.
- Yano, Y., M. Satomi & H. Oikawa. 2006. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. Int J Food Microbiol., 111: 6–11.

XII. ANEXOS

Tabla VI. Valores de multiplicidad de infección.

Experimento	Bacteria (UFC·ml ⁻¹)	Dosis de fago (μL)	Fago (UFP·mL ⁻¹)	MOI
Extracto de vpms1	2·10 ⁸	100	7.6·10 ⁶	0.038
Extracto de A3S	2·10 ⁸	100	3.7·10 ⁶	0.0158
Dosis A3S	2·10 ⁸	100	1.46·10 ⁶	0.0073
	2·10 ⁸	200	2.92·10 ⁶	0.0146
	2·10 ⁸	300	4.38·10 ⁶	0.0219
	2·10 ⁸	400	5.84·10 ⁶	0.0292
	2·10 ⁸	600	8.72·10 ⁶	0.0438
	2·10 ⁸	800	1.16·10 ⁷	0.0584
Dosis vpms1	2·10 ⁸	100	1.68·10 ⁷	0.084
	2·10 ⁸	200	3.36·10 ⁷	0.168
	2·10 ⁸	300	5.04·10 ⁷	0.252
	2·10 ⁸	400	6.72·10 ⁷	0.336
	2·10 ⁸	600	1·10 ⁸	0.504
	2·10 ⁸	800	1.34·10 ⁸	0.672
	2·10 ⁸	1200	2·10 ⁸	1
Tiempo de aplicación	2·10 ⁸	100	4.76·10 ⁸	2.38

Tabla VII. Valores estadísticos de ANOVA y Kruskal-Wallis.

Experimento	Normalidad	Homocedasticidad	Valor del estadístico	Valor de p	Página
Cinética de F8	NA	NA	NA	NA	
Cinética de F12	NA	NA	NA	NA	
Cinética de <i>V. parahaemolyticus</i>	NA	NA	NA	NA	
Cinética de A3S y vpms1	NA	NA	NA	NA	
Fuente de agua	NA	NA	NA	NA	
Densidad de larvas	NA	NA	H(2, N=9)=1.16	0.558*	
Alimento 1ra (Microalga-Royal Caviar)	NA	NA	H(2, N=9)=0.44	0.800*	
Alimento 2da (Nestum, Royal Caviar)	NA	NA	NA	NA	
Alimento 3ra (Nestum, Royal Caviar, Harinas)	NA	NA	NA	NA	
Alimento 4ta (Nestum, Royal Caviar, Harinas)	NA	NA	NA	NA	
Alimento 5ta (Levadura comercial)	NA	NA	NA	NA	

Alimento 6ta (Microalgas)	p>0.20	p=0.424	F(2,6)=2.832	0.136
Supervivencia de larvas alimentadas con <i>C. calcitrans</i>	NA	NA	NA	NA
Curva de tolerancia ClO ₂	p>0.20	p=0.298	F(6,14)=8.053	0.00044
Carga bacteriana	NA	NA	NA	NA
infección experimental 1	p>0.20	p=0.586	F(4,9)=13.764	0.00079
infección experimental 2	p>0.20	p=0.169	F(5,22)=2.075	0.33
infección experimental 3	p>0.20	p=0.556	F(3,8)=7.082	0.012
infección experimental 4	p>0.20	p=0.102	F(4,20)=10.003	0.0013
Infección experimental 5	p>0.20	p=0.428	F(4,10)=9.456	0.00198
Infección experimental 6	p>0.20	p=0.079	F(3,8)=13.865	0.00155
Efecto dosis ATCC 17802	p>0.20	p=0.702	F(5,12)=6.689	0.0033
Cinética de infección ATCC 17802	p>0.20	p=0.129	F(7,16)=15.785	0.0001
Fagoterapia (A3S y vpms1)	p>0.20	p=0.769	F(3,7)=17.766	0.0011

Dosis efectiva vpms1	p>0.20	p=0.413	F(5,12)=62.318	0.0000
Dosis efectiva A3S	NA	NA	NA	0.0073*
Efecto de la suspensión de vpms1	p>0.20	p=0.395	F(2,6)=3.38	0.10397
Tiempo de aplicación	p>0.20	p=0.088	F(6,13)=17.036	0.00002

NA: Análisis no aplicado

* Valor de prueba Kruskal-Wallis (datos sin normalidad y/u homocedasticidad)