



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



CONTROL DE *Vibrio parahaemolyticus* Y *Vibrio harveyi* DURANTE LA PRODUCCIÓN DE NAUPLIOS DE *Artemia franciscana* MEDIANTE UN CONSORCIO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS Y FAGOS

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

**PRESENTA**

EDUARDO QUIROZ GUZMÁN

La Paz, B. C. S., Junio del 2013



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARIA 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 20 del mes de Mayo del 2013 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:

"CONTROL DE *Vibrio parahaemolyticus* Y *Vibrio harveyi* DURANTE LA PRODUCCIÓN DE NAUPLIOS DE *Artemia franciscana* MEDIANTE UN CONSORCIO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS Y FAGOS"

Presentada por el alumno:

QUIROZ

Apellido paterno

GUZMÁN

materno

EDUARDO

nombre(s)

Con registro: 


B	0	9	1	4	1	7
---	---	---	---	---	---	---

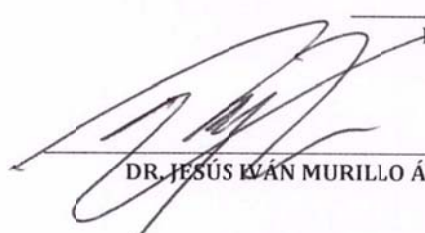
Aspirante de:


DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

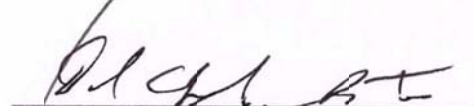
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

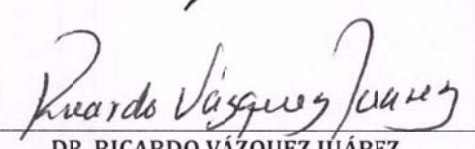
LA COMISION REVISORA  
Director(a) de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ

  
\_\_\_\_\_  
DR. JESÚS IVÁN MURILLO ÁLVAREZ

  
\_\_\_\_\_  
DR. VÍCTOR HUGO CRUZ ESCALONA

  
\_\_\_\_\_  
DR. DAVID ALFARO SIQUEIROS BELTRONES

  
\_\_\_\_\_  
DR. RICARDO VÁZQUEZ JUÁREZ

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
\_\_\_\_\_  
DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ





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

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 28 del mes Mayo del año 2013  
el (la) que suscribe MC. EDUARDO QUIROZ GUZMÁN alumno(a) del  
Programa de DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS  
con número de registro B091417 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:

"CONTRO DEL *Vibrio parahaemolyticus* Y *Vibrio harveyi* DURANTE LA PRODUCCIÓN DE NAUPLIOS  
DE *Artemia franciscana* MEDIANTE UN CONSORCIO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS Y FAGOS"

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: equirczg@ipn.mx - sdiaz@ipn.mx

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

MC. EDUARDO QUIROZ GUZMÁN

nombre y firma

**El presente trabajo fue desarrollado en el laboratorio de Microbiología Marina y Biología Molecular del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del IPN con el financiamiento de los proyectos:**

**“Evaluación de la fagoterapia como alternativa al uso convencional de antibióticos, para el control de *Vibrio* en acuicultura”, Proyecto CONACyT clave 85033.**

**“Desarrollo de un modelo integral para el control biológico de enfermedades en el cultivo larvario de camarón” SIP 20100865**

## **DEDICATORIA**

### **A MI GRAN BENDICIÓN Y DICHA, MIS HIJOS, JONATHAN Y GENARO**

*Les pido perdón por robarles parte de su tiempo y perderme todos esos momentos en los que hicieron un travesura y no estuve presente además de esas cosas maravillosas que sólo ustedes me han tratado de dar, sólo quiero que sepan que son lo más valioso en mi vida.*

### **A MI AMADA ESPOSA, DIANA**

*Por ser la mejor amiga, confidente y apoyo a lo largo de todo este tiempo, pero sobre todo por tu paciencia, ya que, aún siendo diferentes, con amor y respeto hemos logrado caminar por un mismo camino. TQM. Gracias por ser mi pilar durante esta nueva meta.*

### **A MIS PADRES**

*Que han sido y serán siempre el ejemplo que aún me guía y por estar siempre a mi lado en las buenas y en las malas*

### **A MIS HERMANOS Y CUÑADA**

*Adrian, Cristian y Rossana e hijas, porque siempre están a mi lado siendo parte de mi pasado, presente y futuro*

### **A MIS SUEGROS**

*María Elena y Diego, quienes siempre han estado al pendiente de mis hijos y esposa durante todo este tiempo, en verdad, no tengo palabras para agradecerles este gran apoyo*

*A mi gran familia y amigos, muchas gracias por todo...*

## AGRADECIMIENTOS

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

Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN), por las instalaciones proporcionadas para el desarrollo del presente trabajo. En especial al Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular por facilitar los espacios y materiales requeridos.

A mi director de tesis Dr. Sergio F. Martínez Díaz por su guía. En verdad no tengo palabras para agradecerte tu pasión, compromiso, calidad y sobre todo tu gran amistad como persona en verdad has sido un gran mentor y eso nunca lo olvidare, muchas gracias por ser un excelente director.

A mi comisión revisora Dr. Ricardo Vázquez Juárez, Dr. David Alfaro Siqueiros Beltrones, Dr. Jesús Iván Murillo Álvarez, Dr. Gustavo Hernández Carmona, Dr. Víctor Hugo Cruz Escalona, por sus atinados comentarios y excelente disposición por ayudar a mejorar este trabajo.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio Román, Lina, Cynthia, Ismael Sonia (La jefa), Francisco, Claudia, Noemí, Barbara, por todas esas celebraciones que no dejaron nada más que unos kilitos de más pero a que buenas fueron, pero, sobre todo por esos gratos momentos que compartimos juntos.

A la granja de camarón Acuicultura Mhar por proporcionar los quistes de *Artemia* para realizar las pruebas.

## ÍNDICE

Lista de tablas .....	VII
Lista de figuras .....	VIII
Abreviaturas y Símbolos.....	XII
Glosario .....	XIV
Resumen .....	XVI
Abstract .....	XVII
1.Introducción general.....	1
2. Antecedentes .....	8
3. Justificación.....	13
4. Objetivo general .....	15
4.1 Objetivo específico .....	15
5 Hipótesis.....	15
Capítulo I. DESARROLLO DE UN MODELO DE INFECCIÓN Y COLONIZACIÓN DURANTE LA PRODUCCIÓN DE NAUPLIOS DE <i>Artemia franciscana</i> COMO PLATAFORMA PARA ANALIZAR MEDIDAS DE CONTROL BIOLÓGICO	
Resumen.....	16
1. Introducción.....	17
2. . Material y métodos .....	19
2.1 Patógenos .....	19
2.2 Obtención de quistes y nauplios axénicos.....	19
2.3 Proliferación en agua de <i>Artemia franciscana</i> y caldo marino.....	20
2.4 Infección experimental.....	21
2.5 Evaluación de la colonización con microscopia electrónica de barrido SEM.....	21

2.6 Capacidad de colonización.....	22
2.7 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio harveyi</i> sobre la eclosión .....	22
2.8 Infección experimental con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio harveyi</i> en nauplios de <i>Artemia franciscana</i> .....	23
3. Resultados .....	24
3.1 Crecimiento de vibrios en el agua de eclosión de <i>Artemia franciscana</i> Caldo Marino y agua de mar artificial .....	24
3.2 Colonización de <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>V. harveyi</i> en quistes de <i>Artemia franciscana</i> .....	26
3.3 Efecto de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio harveyi</i> sobre la eclosión y supervivencia temprana de <i>Artemia franciscana</i> .....	29
3.4 Efecto de <i>V. harveyi</i> y <i>V. parahaemolyticus</i> en la supervivencia de nauplios de <i>Artemia franciscana</i> .....	32
4. Discusión.....	34
Capítulo II. SELECCIÓN DE UN CONSORCIO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS PARA EL CONTROL DE <i>Vibrio</i> spp. DURANTE LA PRODUCCIÓN DE NAUPLIOS DE <i>Artemia franciscana</i>	
Resumen.....	38
1. Introducción.....	39
2. Material y métodos .....	41
2.1 Diagrama de procedimientos.....	41
2.2 Probióticos.....	42
2.3 Producción de sustancias antagónicas .....	42
2.4 Actividad homolítica de cepas probióticas.....	43
2.5 Pruebas bioquímicas.....	43



2.6 Exotoxinas (ECP's) en nauplios durante la producción de nauplios de <i>Artemia franciscana</i> .....	43
2.7 Colonización de quistes de <i>Artemia franciscana</i> .....	44
2.8 Evaluación <i>in vivo</i> durante la incubación de quistes de <i>Artemia franciscana</i> ...	44
2.9 Efecto de los probióticos en nauplios de <i>Artemia franciscana</i> .....	44
2.10 Reducción de <i>Vibrio</i> durante la eclosión de <i>Artemia franciscana</i> .....	45
2.11 Bacterias probióticas durante pruebas de reto con en nauplios de <i>Artemia</i> .....	45
3. Resultados .....	46
3.1 Producción de sustancias antagónicas .....	46
3.2 Actividad hemolítica de cepas probióticas .....	46
3.3 Pruebas bioquímicas .....	47
3.4 Producción de exotoxinas (ECP's) y su efecto durante la producción de nauplios de <i>Artemia franciscana</i> .....	48
3.5 Colonización de quistes de <i>Artemia franciscana</i> .....	50
3.6 Crecimiento de probióticos en el agua de eclosión de <i>Artemia franciscana</i> .....	52
3.7 Efecto de probióticos en la eclosión .....	55
3.8 Tiempo de eclosión .....	56
3.9 Reducción de <i>Vibrio</i> sp. durante la eclosión de <i>Artemia franciscana</i> .....	57
3.10 Probióticos en pruebas de reto con <i>Vibrio</i> sp. durante la eclosión .....	59
3.11 Bacterias probióticas durante pruebas de reto con en nauplios de <i>Artemia franciscana</i> .....	61
4. Discusión.....	63
Capítulo III. DESARROLLO DE UNA MEZCLA DE VIBRIÓFAGOS PARA EL CONTROL DE <i>Vibrio</i> spp. DURANTE LA PRODUCCIÓN DE NAUPLIOS DE <i>Artemia franciscana</i>	

Resumen.....	67
1. Introducción.....	68
2. Material y métodos .....	70
2.1 Bacteriófagos .....	70
2.2 Bacterias .....	70
2.3. Selección de vibriófagos.....	71
2.4 Actividad lítica .....	71
2.5 Efecto de fagos sobre bacterias resistentes.....	71
2.6 Cinética de lisis en agua de eclosión de <i>Artemia franciscana</i> y Caldo Marino .	72
2.7 Efecto de los fagos, en pruebas de reto con <i>V. harveyi</i> y <i>V. parahaemolyticus</i> durante la eclosión de quistes de <i>Artemia franciscana</i> .....	72
2.8 Pruebas de reto con <i>V. harveyi</i> y <i>V. parahaemolyticus</i> en nauplios inoculados con fagos.....	73
2.9 Efecto de la mezcla fagos, en pruebas de reto con <i>V. harveyi</i> y <i>V. parahaemolyticus</i> durante la eclosión de quistes de <i>Artemia franciscana</i> .....	73
4. Resultados .....	74
4.1 Actividad lítica .....	74
4.2 Efecto de fagos sobre bacterias resistentes.....	74
4.3 Cinética de lisis en agua de eclosión de <i>Artemia franciscana</i> y caldo marino..	77
4.4 Efecto de los fagos, en pruebas de reto con <i>V. harveyi</i> y <i>V. parahaemolyticus</i> durante la eclosión de quistes de <i>Artemia franciscana</i> .....	80
4.5 Pruebas de reto con <i>V. harveyi</i> y <i>V. parahaemolyticus</i> en nauplios inoculados con fagos.....	82
4.6 Efecto de la mezcla fagos, en pruebas de reto con <i>V. harveyi</i> y <i>V. parahaemolyticus</i> durante la eclosión de quistes de <i>Artemia franciscana</i> .....	86

4.7 Pruebas de reto con <i>V. harveyi</i> y <i>V. parahaemolyticus</i> en nauplios inoculados con la mezcla de fagos.....	88
5. Discusión.....	91
Capítulo IV. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE UN CONSORCIO DE CEPAS PROBIÓTICAS Y VIBRIÓFAGOS PARA EL CONTROL DE <i>Vibrio parahaemolyticus</i> Y <i>Vibrio harveyi</i> DURANTE LA PRODUCCIÓN DE NAUPLIOS DE <i>Artemia franciscana</i> .	
Resumen.....	94
1. Introducción.....	95
2. Material y Métodos .....	97
2.1. Bacterias probióticas .....	97
2.2. Vibriófagos .....	97
2.3. Efecto de la mezcla en pruebas de reto durante la eclosión de quistes de <i>Artemia franciscana</i> .....	97
2.4 Efecto de la mezcla en pruebas de reto en nauplios de <i>Artemia franciscana</i> ..	98
3. Resultados .....	99
3.1. Efecto de la mezcla en pruebas de reto durante la eclosión de quistes de <i>Artemia franciscana</i> .....	99
3.2. Efecto de la mezcla en pruebas de reto en nauplios de <i>Artemia franciscana</i>	104
4. Discusión.....	107
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN FINAL Y CONCLUSIONES	
Discusión.....	109
Conclusiones.....	116
Recomendaciones.....	117
Referencias bibliográficas .....	118

Apéndices.....	141
Apéndice 1. Colonización de cepas probióticas en quistes de <i>Artemia</i> .....	141
Apéndice 2. Efecto de probióticos en la eclosión .....	143
Apéndice 3. Crecimiento de probióticos en el agua de eclosión de <i>Artemia franciscana</i> .....	145

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Cálculo de parámetros de crecimiento de <i>V. parahaemolyticus</i> (cepas PS-017y 17802) y <i>V. harveyi</i> (cepas EC11y 14126) .....	<b>25</b>
<b>Tabla 2.</b> Efecto de diferentes dosis de <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>V. harveyi</i> durante la eclosión de <i>Artemia franciscana</i> .....	<b>30</b>
<b>Tabla 3.</b> Prueba de hemólisis de las cepas presuntivas de <i>Bacillus</i> , <i>Lactobacillus</i> y <i>Lactococcus</i> .....	<b>47</b>
<b>Tabla 4.</b> Caracterización morfológica y bioquímica de las cepas antagónicas aisladas.....	<b>48</b>
<b>Tabla 5.</b> Estimación de parámetros de crecimiento de cepas probióticas y mezcla de estas.....	<b>53</b>
<b>Tabla 6a.</b> Características generales de las bacterias con resistencia a los fagos de <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>V. harveyi</i> .....	<b>75</b>
<b>Tabla 6b.</b> Efecto lítico de los vibriófagos sobre bacterias resistentes de <i>V. parahaemolyticus</i> – Primer aislamiento.....	<b>76</b>
<b>Tabla 6c.</b> Efecto de los vibriófagos sobre bacterias resistentes de <i>V. parahaemolyticus</i> – Segundo aislamiento.....	<b>76</b>
<b>Tabla 7a.</b> Efecto de los vibriófagos sobre bacterias resistentes de <i>V. harveyi</i> – Segundo aislamiento.....	<b>77</b>
<b>Tabla 7b.</b> Efecto de los vibriófagos sobre bacterias resistentes de <i>V. harveyi</i> – Segundo aislamiento.....	<b>77</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Crecimiento de <i>V. parahaemolyticus</i> PS-017, cepa17802 y <i>V. harveyi</i> cepa EC11 y cepa 14126 en agua de eclosión de <i>Artemia franciscana</i> y en Agua de Eclosión de Artemia, Caldo Marino y Agua de Mar Artificial .....	<b>24</b>
<b>Figura 2</b> Colonización de quistes de <i>Artemia franciscana</i> por bacterias patógenas en 2 h de la infección experimental observadas en microscopia electrónica de barrido (SEM).....	<b>27</b>
<b>Figura 3</b> Colonización de quistes de <i>Artemia franciscana</i> expuestos a diferentes dosis con <i>V. harveyi</i> y <i>V. parahaemolyticus</i> .....	<b>28</b>
<b>Figura 4</b> Efecto de eclosión y posteclosión de nauplios de <i>Artemia franciscana</i> durante la infección experimental con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio harveyi</i> ....	<b>32</b>
<b>Figura 5</b> Probabilidad de infección en nauplios de <i>Artemia franciscana</i> con <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio harveyi</i> .....	<b>33</b>
<b>Figura 6</b> Diagrama de flujo probióticos.....	<b>41</b>
<b>Figura 7</b> Efecto <i>in vitro</i> de las bacterias probióticas sobre <i>V. harveyi</i> y <i>V. parahaemolyticus</i> .....	<b>46</b>
<b>Figura 8</b> Efecto de los productos extracelulares sobre la eclosión de <i>Artemia franciscana</i> .....	<b>49</b>
<b>Figura 9</b> Colonización de quistes y nauplios de <i>Artemia franciscana</i> .....	<b>51</b>
<b>Figura 10</b> Colonización de quistes de <i>Artemia franciscana</i> expuestos a diferentes dosis .....	<b>51</b>
<b>Figura 11</b> Porcentaje de eclosión y supervivencia de quistes infectados con la mezcla de cepas probióticas .....	<b>55</b>
<b>Figura 12</b> Tiempo de eclosión .....	<b>56</b>

<b>Figura 13 (a)</b> Efecto de cepas probióticas y la mezcla sobre la colonización de PS-017 durante la eclosión .....	<b>57</b>
<b>Figura 13 (b)</b> Efecto de cepas probióticas y la mezcla sobre la Colonización de ATCC 17802 .....	<b>58</b>
<b>Figura 14 (a)</b> Efecto de cepas probióticas y la mezcla sobre la proliferación de PS-017 durante la eclosión de <i>Artemia franciscana</i> .....	<b>58</b>
<b>Figura 14 (b)</b> Efecto de cepas probióticas y la mezcla sobre la proliferación de 17802 durante la eclosión de <i>Artemia franciscana</i> .....	<b>59</b>
<b>Figura 15</b> Porcentaje de Eclosión y Supervivencia de nauplios de <i>Artemia franciscana</i> infectados .....	<b>60</b>
<b>Figura 16</b> Porcentaje de Eclosión y Supervivencia de nauplios de <i>Artemia franciscana</i> infectados experimentalmente .....	<b>61</b>
<b>Figura 17</b> Supervivencia de nauplios tratados con mezcla de probióticos .....	<b>62</b>
<b>Figura 18.</b> Placa de lisis de vibriófagos .....	<b>74</b>
<b>Figura 19.</b> Cinética de lisis de los vibriófagos A3S, VPMS1 y Aie .....	<b>79</b>
<b>Figura 20.</b> Cinética de lisis de los vibriófagos F8 y F12 .....	<b>80</b>
<b>Figura 21.</b> Porcentaje de eclosión durante la producción de <i>Artemia franciscana</i> en prueba de reto con vibriófagos .....	<b>81</b>
<b>Figura 22.</b> Porcentaje de eclosión durante la producción de <i>Artemia franciscana</i> en prueba de reto con vibriófagos .....	<b>82</b>
<b>Figura 23</b> Porcentaje de supervivencia de nauplios de <i>Artemia franciscana</i> infectados con <i>V. parahaemolyticus</i> 17802.....	<b>83</b>
<b>Figura 24.</b> Porcentaje de supervivencia de nauplios de <i>Artemia franciscana</i> infectados con <i>V. parahaemolyticus</i> 17802.....	<b>84</b>
<b>Figura 25.</b> Porcentaje de supervivencia de nauplios de <i>Artemia franciscana</i> infectados con <i>V. parahaemolyticus</i> 17802.....	<b>85</b>

<b>Figura 26.</b> Porcentaje de supervivencia de nauplios de <i>Artemia franciscana</i> infectados con <i>V. harveyi</i> .....	<b>86</b>
<b>Figura 27.</b> Porcentaje de eclosión de quistes infectados experimentalmente con <i>V. parahaemolyticus</i> .....	<b>87</b>
<b>Figura 28.</b> Porcentaje de eclosión de quistes infectados experimentalmente con <i>V. harveyi</i> .....	<b>88</b>
<b>Figura 29.</b> Efecto de las mezclas de fagos en la supervivencia de nauplios de <i>Artemia franciscana</i> infectados experimentalmente con <i>V. parahaemolyticus</i> .....	<b>89</b>
<b>Figura 30.</b> Efecto de la mezcla de fagos en la supervivencia de nauplios de <i>Artemia franciscana</i> infectados experimentalmente con <i>V. harveyi</i> .....	<b>90</b>
<b>Figura 31.</b> Porcentaje de supervivencia post-eclosión de nauplios de <i>Artemia franciscana</i> tratados con la mezcla de cepas probióticas y vibriófagos .....	<b>100</b>
<b>Figura 32.</b> Porcentaje de supervivencia post-eclosión de nauplios de <i>Artemia franciscana</i> tratados con la mezcla de cepas probióticas y vibriófagos .....	<b>101</b>
<b>Figura 33.</b> Tiempo de eclosión de quistes inoculados con diferentes dosis .....	<b>102</b>
<b>Figura 34.</b> Tiempo de eclosión de quistes inoculados con diferentes dosis .....	<b>103</b>
<b>Figura 35.</b> Efecto de las diferentes dosis de la mezcla de cepas probióticas y vibriófagos en la supervivencia de nauplios de <i>Artemia franciscana</i> .....	<b>105</b>
<b>Figura 36.</b> Efecto de las diferentes dosis de la mezcla de cepas probióticas y vibriófagos en la supervivencia de nauplios de <i>Artemia franciscana</i> .....	<b>106</b>
<b>Figura 37.</b> Colonización de quistes de <i>Artemia franciscana</i> expuestos a diferentes dosis con <i>Bacillus subtilis</i> .....	<b>141</b>
<b>Figura 38.</b> Colonización de quistes de <i>Artemia franciscana</i> expuestos a diferentes dosis con <i>Lactococcus</i> .....	<b>141</b>
<b>Figura 39.</b> Colonización de quistes de <i>Artemia franciscana</i> expuestos a diferentes dosis con <i>Lactobacillus</i> .....	<b>142</b>



<b>Figura 40.</b> Porcentaje de eclosión y supervivencia de quistes infectados <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Lactobacillus</i> .....	<b>143</b>
<b>Figura 41.</b> Porcentaje de eclosión y supervivencia de quistes infectados <i>lactococcus</i> .....	<b>144</b>
<b>Figura 42.</b> Crecimiento de cepas probióticas en Agua de Eclosión de <i>Artemia franciscana</i> y Caldo Marino .....	<b>145</b>
<b>Figura 43.</b> Crecimiento de cepas probióticas en Agua de Eclosión de <i>Artemia franciscana</i> y Caldo Marino .....	<b>146</b>
<b>Figura 44.</b> Crecimiento de cepas probióticas en Agua de Eclosión de <i>Artemia franciscana</i> y Caldo Marino .....	<b>147</b>

## ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

<b>μL</b>	Microlitros
<b>AM</b>	Agar Marino
<b>AMA</b>	Agua de Mar Artificial
<b>D.O</b>	Densidad Óptica
<b>ECP´s</b>	Productos extracelulares
<b>h</b>	Horas
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias
<b>NaCl</b>	Cloruro de Sodio
<b>g/l</b>	Gramos por Litro
<b>TCBS</b>	Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa
<b>AEA</b>	Agua de Eclosión de Artemia
<b>CM</b>	Caldo Marino
<b>lux</b>	Unidad derivada del Sistema Internacional de Unidades para la iluminancia o nivel de iluminación
<b>SED</b>	Detector de Electrones Secundarios

<b>MT</b>	Mortalidad Total
<b>MQ</b>	Numero de Quistes no eclosionados
<b>MDE</b>	Muerte durante la Eclosión
<b>MPE</b>	Muerte después de la eclosión
<b>K</b>	Promedio de tasa de crecimiento
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection

## GLOSARIO

**Amortiguador de cacodilatos:** Sustancia empleada como parte del método de fijación en microscopía electrónica (Echandi y Hernández, 1998)

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

**Biofilms:** Comunidad microbiana sésil, caracterizada por células adheridas a un sustrato o unas con otras, encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas han producido (Donlan, 2002)

**Control biológico:** Método que consiste en el uso de organismos vivos para controlar las poblaciones de otro organismo

**Efecto antagónico:** Cuando un microorganismo interfiere con el crecimiento de otro

**Exclusión competitiva:** Incapacidad de una población de microorganismos para establecerse en un ambiente particular, debido a la presencia de otra población microbiana

**Fagoterapia:** Terapia que consiste en el uso de bacteriófagos para tratar enfermedades causadas por bacterias

**Gnotobiótico:** Término usado para describir la condición en la cual todas las formas de vida son conocidas (Coates, 1975).

**Microbiota:** Ecosistema microbiano complejo y dinámico que coloniza el tracto digestivo y que beneficia la salud del organismo mediante la promoción de suministro de nutrientes previniendo la colonización de agentes infecciosos (Delzenney & Cani, 2008).

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

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

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

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

**Probiótico:** Microorganismos que, al ser ingeridos, causan beneficios superiores a los derivados de su aportación nutricional como alimento y que, pueden prevenir algunas enfermedades con base en el principio de exclusión competitiva o por ser fuentes de sustancias inmunoestimulantes (Coeuret et al., 2004).

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

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

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

## RESUMEN

*Vibrio* spp. se encuentra comúnmente asociado a los quistes de *Artemia* sp., donde prolifera durante la eclosión y coloniza la superficie de los nauplios convirtiéndose en un riesgo sanitario para los organismos que se alimentan de *Artemia* sp. Las estrategias para reducir su cantidad incluyen el uso de desinfectantes químicos y la aplicación de calor, lo que produce consecuencias negativas en el ambiente o en la calidad de la *Artemia* sp. como alimento. En el presente estudio se evaluó el uso de un consorcio de probióticos y diferentes vibriofagos como control biológico durante la producción de *Artemia franciscana*. Las bacterias probióticas y los fagos fueron seleccionados de cepas previamente aisladas, su efecto se evaluó usando un modelo gnotobiótico de quistes de *Artemia franciscana* infectadas con *Vibrio parahaemolyticus* (cepas PS017 y ATCC 17802) y *Vibrio harveyi* (cepas EC11 y ATCC 14126). La aplicación de probióticos redujo el tiempo de eclosión de 12 a 6 h, los nuevos nauplios eclosionados fueron rápidamente colonizados por bacterias probióticas y durante la prueba de reto inhibieron completamente la proliferación de *Vibrio* sp. Similarmente, la mezcla de vibriofagos inhibió la proliferación de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio harveyi* durante la producción de *Artemia franciscana* además de prevenir la infección y mortalidad. La combinación de probióticos y fagos resultó en un efecto complementario y sinérgico donde las dosis para reproducir el efecto benéfico fueron reducidas significativamente. De acuerdo a los resultados obtenidos, es posible utilizar estos procedimientos como estrategia para producir *Artemia* sp. libre de vibrios, lo que resulta útil para prevenir enfermedades en sistemas de producción de acuicultura.

**Palabras clave:** *Vibrio*, Probiótico, Vibriofago, quistes de *Artemia*, control biológico

## **ABSTRACT**

*Vibrio* sp. are commonly associated to brine shrimp cysts, proliferates during hatching and colonizes the nauplii surfaces, becoming a sanitary risk for the organisms that feed brine shrimp. Strategies to reduce their number include the use of chemical disinfectants and the application of heat, which produce negative consequences on environment or on the quality of brine shrimp as food. The present study evaluated the use of a probiotic consortium and different vibriophages as biological control during the brine shrimp production. The probiotic bacteria and phages were selected from previously isolated strains and their effect was evaluated using a gnotobiotic model of brine shrimp cyst infected with *Vibrio parahaemolyticus* (strains PS017 and ATCC 17802) and *Vibrio harveyi* (strains EC11 and ATCC 14126). When the probiotics were applied during hatching, they reduced the time to hatch from 12 to 6 h, the new hatched nauplii were rapidly colonized by probiotic bacteria and during the challenge test they completely inhibited the proliferation of *Vibrio* sp. Similarly, the mix of vibriophages inhibited the proliferation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* during brine shrimp nauplii production and prevent the infection and mortality. The combination of probiotic and phage approaches results in a complementary and synergic effect where the dosages to reproduce the beneficial effect was significantly reduced. According to the results obtained, it is possible to use these procedures as a strategy to produce populations of *Vibrio* –free artemia nauplii, which is useful to prevent diseases in aquaculture production systems.

**Keywords:** *Vibrio*, Probiotic, Vibriophage, brine shrimp cyst, Biological control

## 1. Introducción general

En acuicultura la obtención de semilla suele ser el primer obstáculo para lograr la producción comercial de una especie, y en particular ello depende de la disponibilidad de alimentos adecuados en tipo y calidad para los primeros estadios larvarios (Holt & Sun 1991). Los nauplios de *Artemia* sp. son uno de los alimentos vivos más ampliamente utilizados en acuicultura marina para la producción de semilla de peces y crustáceos (Persoone, *et al.*, 1980; Vinatea, 1995; Lavens & Sorgeloos, 2000; Bransdena *et al.*, 2004; Godinez *et al.*, 2004; Haga *et al.*, 2006; Monroig *et al.*, 2006). Su importancia radica en que es un crustáceo pequeño que tolera diversas condiciones de cultivo, está disponible comercialmente en forma de quistes y es de fácil manejo y digestión. Adicionalmente *Artemia* sp., es usada como vector de componentes importantes como nutrientes esenciales, pigmentos y compuestos profilácticos y terapéuticos (Leger *et al.*, 1987). Los nauplios de *Artemia* spp. tienen la talla apropiada para la alimentación de muchas especies de interés comercial y en algunos casos cubren por completo los requerimientos de los organismos cultivados (Crespo 1999).

El uso de nauplios de *Artemia* sp. también es comúnmente considerado un riesgo sanitario para la producción acuícola. Los quistes (usados para la producción de nauplios); regularmente contienen poblaciones de bacterias patógenas asociadas a su superficie que eventualmente llegan a los organismos cultivados y pueden provocar mortalidad. Para la producción de los nauplios, rutinariamente se aplica cloro a los quistes, en concentraciones que teóricamente son suficientes para lograr una desinfección completa (Sorgeloos, 1972; Austin & Allen, 1982; Dehasque *et al.*, 1991), sin embargo, durante la incubación y cosecha ocurre una rápida recolonización (D'Agostino 1980; Douillet, 1995; Griffith, 1995). La composición final de la microbiota de los nauplios de *Artemia* sp. es un reflejo directo de las bacterias en el agua de cultivo (Igarashi *et al.*, 1989); y en este último, algunos vibrios proliferan y colonizan abundantemente los nauplios (López-Torres & Lizárraga-Partida, 2001; Austin & Allen 1982; Dehasque *et al.*, 1991).



Comúnmente los cultivos de *Artemia* sp. contienen una proporción muy alta de *Vibrio* sp. la cual llega a conformar hasta el 90% de las bacterias cultivables asociadas al nauplio (Verdonck *et al.*, 1994) incluyendo especies como *Vibrio hispanicus*.; *V. harveyi*; *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* (Gomez-Gil *et al.*, 2004). Algunos autores han sugerido que las condiciones durante la incubación y los compuestos liberados por los quistes favorecen la proliferación de vibrios ya que en los quistes antes de ser incubados, la proporción de vibrios es regularmente baja (<2%) (Austin & Allen, 1982; López-Torres & Lizárraga-Partida, 2001) o inexistente (Igarashi *et al.*, 1989).

### **1.1 Vibrios en acuicultura**

El género *Vibrio* sp. comprende bacterias Gram-negativas autóctonas de los ambientes acuáticos. Algunas de las especies de *Vibrio* sp. suelen ser abundantes en ambientes marinos, estuarinos y de agua dulce, ya que son organismos capaces de tolerar la variación de factores ambientales como la temperatura, la salinidad (Drake *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2010, 2012) Las bacterias de este género han sido reportadas como la causa de serias infecciones y baja productividad en los sistemas de cultivo de todo el mundo. El efecto y severidad de las infecciones que producen dependen de la especie de *Vibrio* sp. y su abundancia (Lightner, 1996) y los rangos de mortalidad que ocasionan van de insignificantes hasta el 100% en prácticamente todos los estadios de las peces, crustáceos y moluscos cultivados.

Entre las especies que son reportadas con mayor frecuencia como causantes de mortalidad en organismo cultivados se encuentran *V. harveyi*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000; Gómez-Gil *et al.*, 2000; Gullian, 2001; Leyton & Riquelme, 2008) sin embargo no son patógenos obligados ya que estas especies se encuentran regularmente en los sistemas de cultivo en concentraciones de hasta  $10^5$  - $10^6$  UFC/mL (López-Torres *et al.*, 2001).

*V. parahemolyticus* y *V. harveyi* son consideradas un riesgo para la producción, pertenecen al grupo de bacterias que en conjunto es denominado vibrios luminiscentes por su capacidad de generar luminiscencia (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1998). A este grupo pertenecen ocho géneros *Allomonas*, *Beneckea*, *Enhydrobacter*, *Listonella*, *Lucibacterium*, *Photobacterium*, *Salinivibrio* y *Vibrio*; que causan pérdidas cuantiosas a los cultivos más importantes de peces y crustáceos y moluscos. Por otro lado, la incidencia de vibrios patógenos como *V. parahemolyticus* y *V. harveyi* en organismos de cultivo o extraídos del medio naturales un problema sanitario que ha propiciado numerosos estudios (Madigan *et al.*, 1999; Ronda *et al.*, 2003).

*V. harveyi* es considerada como el principal problema en la larvicultura de varios organismos acuáticos y en épocas recientes ha sido implicada en mortalidades de peces, crustáceos y moluscos. Por ejemplo, en la producción de camarón su presencia se asocia con el lento crecimiento en estanques de engorda y con mortalidades en camarones juveniles, especialmente en los primeros 45 días donde ocasiona una degeneración del hepatopáncreas, donde el tejido forma un agregado de células que pasan al intestino superior y causa daños severos en el aparato digestivo, ocasionando la pérdida del apetito y provoca cambios de comportamiento (Brock & Main, 1994; Ceballos *et al.*, 1996; Karanusagar *et al.*, 1994). Los factores de virulencia de *V. harveyi* incluyen la producción de enzimas que degradan la quitina (Suginta *et al.*, 2004) y algunas toxinas. Durante los eventos de vibriosis en la engorda de camarón los organismos afectados tienden a desplazarse cerca de los bordes del estanque con el cefalotórax en la superficie del agua, con la apariencia de nadar y flotar verticalmente (Kuo-Kau *et al.*, 1996).

*V. parahemolyticus* es otra especie a la que se le atribuye la capacidad de producir enfermedades y mortalidad en organismos silvestres y cultivados. (Paris, 2005; Zamora & Quiróz, 2005). Su hábitat natural son las aguas marinas costeras, especialmente en los estuarios, donde puede permanecer en la columna de agua, en el sedimento o adherido a las superficies de quitina de algunos organismos, principalmente crustáceos, sobre los que incrementa su concentración (Heitmann *et al.*, 2005; Zamora & Quiróz, 2005). Ha sido aislado durante procesos infecciosos de peces (Martínez-Díaz & Anguas-Vélez, 2002), crustáceos (Jayasree *et al.*, 2006) y

moluscos. Esta especie también se considera un problema de salud pública ya que puede causar gastroenteritis aguda en humanos (Paris, 2005) y es habitante frecuente de moluscos bivalvos filtradores (Hernández *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2006).

## **1.2 Control de patógenos en acuicultura**

La tecnología para la producción larvaria crea un medio ambiente altamente artificial, que promueve el crecimiento de bacterias y afecta negativamente a la selección bacteriana (Olafsen, 1993; Vadstein *et al.*, 1993a.). La combinación de altas densidades de larvas, restos de larvas muertas, altas cargas de materia orgánica debido a la adición de alimento vivo producido intensamente, estimula la selección y el crecimiento de bacterias oportunistas en tanques de larvas.

La aplicación profiláctica de antibióticos se usó por muchos años como una estrategia de control microbiano en la crianza de larvas (Gatesoupe, 1982, 1989). Sin embargo, el uso indiscriminado de estos productos causó diferentes problemas ambientales, afectando el metabolismo de las comunidades microbianas naturales y modificando los ciclos biogeoquímicos en el cuerpo de agua receptor (Holmström *et al.*, 2003); un problema adicional, posiblemente más preocupante, fue el desarrollo de cepas bacterianas resistentes a estos productos (Weston, 1996; Schwarz *et al.*, 2001). Tomando en cuenta que existen varios mecanismos mediante los cuales la resistencia puede ser transferida a otras células de la misma especie, y hasta a otras especies de bacterias, el uso de los antibióticos fue severamente restringido; dejando un vacío de mecanismos para el control bacteriano.

Durante los últimos años se han realizado muchas investigaciones dirigidas al desarrollo de técnicas alternativas para sustituir a los antibióticos y con ello lograr una disminución el impacto que estos productos están causando sobre el medio ambiente (Gatesoupe, 1999; Angulo, 2000).

Una estrategia que se considera viable para este propósito es la utilización de bacterias benéficas (probióticos), para prevenir el desarrollo de organismos patógenos. El uso de probióticos es una práctica originada al inicio del siglo pasado. Metchnikoff (1907) dio a conocer su teoría sobre el efecto benéfico de la modulación activa de la microflora del tracto intestinal sobre la longevidad y la salud humana, y se ha utilizado ampliamente especialmente en el área de la nutrición, tanto humana como animal (Fuller, 1992; Mulder *et al.*, 1997).

En años más recientes, el uso de estos productos se ha impulsado también para el cultivo de organismos acuáticos, tanto dulceacuícolas (Irianto & Austin, 2002; Irianto *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2006) como marinos (Dopazo *et al.*, 1988; Gatesoupe, 1999; Verschuere *et al.*, 2000; Bachère, 2003). Esta estrategia consiste en aprovechar la actividad de algunos microorganismos que tienen efectos positivos sobre los organismos en cultivo. De acuerdo a la literatura disponible sobre estos productos, esta alternativa parece ser una herramienta viable debido a que los probióticos pueden actuar directa o indirectamente sobre el crecimiento y el estado de salud de los organismos cultivados, porque favorecen con su metabolismo y la asimilación de los nutrientes presentes en los alimentos.

Los probióticos son capaces de colonizar directamente el tracto digestivo de sus hospederos, y con ello reducen la probabilidad de colonización y el desarrollo de otros microorganismos patógenos o potencialmente nocivos (Moriarty, 1997,1999; Berger, 2000; Newman, 2000; Benetti, 2001; Chamberlain, 2001). Las bacterias probióticas pueden tener un efecto positivo adicional en acuicultura, ya que pueden usar los nutrientes orgánicos e inorgánicos presentes en el agua y en el fondo de los estanques, lo que deriva en la modificación positiva de la calidad ambiental de los cultivos (Douillet, 2000; Dalmin *et al.*, 2002).

Una estrategia alternativa para el control de infecciones bacterianas que en los últimos años ha despertado el interés de la industria acuícola es la aplicación de bacteriófagos comúnmente conocida como terapia de fagos o fagoterapia (Nakai & Park 2002; Park & Nakai 2003; Skurnik *et al.* 2007). Los fagos son virus que específicamente reconocen e infectan células bacterianas y tienen la

capacidad de eliminar bacterias patógenas multiresistentes a los antibióticos y, al contrario de estos, logran un efecto muy específico ya que son selectivos a nivel de especie o cepa, por lo que no alteran la microbiota normal del organismo o del 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 liberación en un ecosistema puede ser visto como un proceso natural (Carlton *et al.*, 2005). Otra ventaja es que generalmente una dosis es suficiente para ejercer un efecto sobre las poblaciones de bacterias: ya que la dosis inicial se incrementa rápidamente como parte del ciclo normal de vida de los bacteriófagos, (Carlton *et al.*, 2005; Matsuzaki *et al.*, 2005; Alday-Sanz *et al.*, 2007; Hanlon, 2007).

En peces se ha demostrado que la aplicación de fagos por vía intraperitoneal o bien por vía oral es efectiva para controlar algunas infecciones (Nakai, 1999; Park, 2000). En la producción de invertebrados esta situación es diferente, pero se ha demostrado que la aplicación directa de fagos al agua de cultivo es una medida profiláctica muy efectiva (Vinod *et al.* 2006; Karunasagar *et al.*, 2007).

### **1.3 *Artemia* como vector de bacterias**

Como se mencionó previamente, los nauplios de *Artemia* sp. son un riesgo sanitario por la cantidad de bacterias patógenas que se asocian a su producción y consecuentemente a su microbiota. Por ello se han desarrollado diversas estrategias para reducir la carga microbiana de los nauplios, incluyendo la aplicación de desinfectantes y temperaturas elevadas. Desafortunadamente las medidas aplicadas son poco prácticas, no son completamente efectivas o reducen la calidad de los nauplios como alimento. Aunque a primera vista la cantidad de bacterias asociadas a los nauplios pareciera un problema menor, en la realidad se acepta que las mortalidades en los primeros estadios de desarrollo de los organismos cultivados son determinados por la mala calidad sanitaria de los nauplios de *Artemia* sp.

Entre los esfuerzos encaminados a modificar la composición de la carga bacteriana de los nauplios de *Artemia* sp.; se incluye la incubación de los nauplios en suspensiones de bacterias benéficas con el propósito de que las bacterias compitan con las bacterias o para que los nauplios actúen como bio-capsulas de bacterias benéficas. Este proceso denominado bio-encapsulación es efectivo por la capacidad de filtración de *Artemia* sp., y es efectiva también para incorporar ácidos grasos (Devresse *et al.*, 1990; Rondhane *et al.*, 1995), vitaminas (Merchie *et al.*, 1995), antibióticos (Chat *et al.*, 1996), sustancias inmunoestimulantes (Skjermo & Bergh, 2004), levaduras (Espinosa *et al.*, 2002; Patra & Mohamed, 2003) y bacterias (Gómez-Gil *et al.*, 1998; Gómez-Gil *et al.*, 2000; Makridis *et al.*, 2001). Bajo este punto de vista, es de considerable importancia la optimización de los métodos de eclosión para lograr la transferencia al medio de enriquecimiento o con bacterias para el control de patógenos oportunistas, al comienzo, del segundo estadio de metanauplio. En esta fase, los nauplios son capaces de ingerir partículas en función de la actividad de filtración no selectiva del segundo par de antenas, produciéndose así el enriquecimiento por bioencapsulación.

## **2. Antecedentes**

### **2.1.- Mecanismos de control biológico patógenos**

En ambientes acuáticos, aún es muy poco lo que se conoce en materia de prevención. Actualmente, con el aumento de la resistencia a los antibióticos, se busca modificar la microbiota presente en sistemas de acuicultura, con el fin de prevenir enfermedades y aumentar la producción. Por ello se han usado bacterias benéficas para la descomposición de materia orgánica, reducción de las concentraciones de nitrógeno y fósforo, mejorar el crecimiento de las algas, controlar amonio y nitrito, disminuir la incidencia de enfermedades y aumentar la supervivencia (Boyd & Massaut, 1999). Esta diversidad de usos, ha creado confusión en la definición original y en el uso del término control biológico, utilizándose en varias ocasiones, con referencia a bacterias o algas mejoradoras de la calidad de agua de cultivo, y dejando de lado el concepto inicial que engloba el control de la microbiota en el portador. De acuerdo con Karunasagar *et al.*, (1999) el término más apropiado para estos casos sería el de "bioremediadores", para referirse exclusivamente a las células microbianas que permanecen vivas dentro del portador y que son capaces de mejorar su salud por recuperación del equilibrio interno microbiano (Fuller, 1989; Gatesoupe, 1999 Gram *et al.*, 1999). *v. gr.* se han realizado algunos estudios en busca de alternativas en los que resalta la importancia de las bacterias como agentes de control biológico mediante actividad antagónica (Sugita *et al.*, 1996). Logrando una inhibición del crecimiento de cepas patógenas en los organismos (Westerdahl *et al.*, 1991).

### **2.2.- Control de patógenos mediante probióticos**

Varios estudios han demostrado que los probióticos reducen la incidencia de enfermedades y que las mezclas de varias cepas probióticas son más efectivas en el control de patógenos aumentando así la posibilidad de establecer una comunidad funcional (Sotomayor & Balcázar, 2003). Si bien, la aplicación de

microorganismos puede favorecer el crecimiento de los organismos cultivados, también se puede medir su efecto en la inhibición de cepas patógenas (Sotomayor & Balcázar 2003), o en la inmunoestimulación de los organismos cultivados, lo cual fortalece su tolerancia a enfermedades de diferente origen y naturaleza (Bogwald *et al.*, 1996; Gómez-Gil *et al.*, 2000).

De acuerdo con Balcázar *et al.* (2006) y Kesarcodi-Watson *et al.* (2008), los posibles mecanismos de acción de los probióticos que se han mencionado con mayor frecuencia para el control y la prevención de enfermedades pueden ser de diferente naturaleza:

1. Estimulación del sistema inmune innato del organismo hospedero.
2. Efecto alelopático, mediante el cual las bacterias probióticas antagonizan a los patógenos potenciales mediante la producción de compuestos inhibitorios del crecimiento similar al efecto antibiótico de algunas bacterias y hongos.
4. Exclusión competitiva, la cual puede ser causada por la competencia con los otros microorganismos presentes para asimilación de nutrientes o de los sustratos necesarios para la actividad de los enzimas (Fe, principalmente), o por el espacio (sitios de adhesión en el tracto digestivo) y/o oxígeno del ambiente acuático.

No obstante, las mezclas de probióticos del mercado presentan diversas funciones debido al tipo de mecanismo que fundamenta la efectividad de estos productos en gran parte desconocido

Por este motivo es necesario seleccionar con cuidado el producto que se desea utilizar, debido a que es esencial asegurarse que ninguno de los microorganismos presentes en la mezcla probiótica puede afectar a los organismos en cultivo, como fue el caso de una cepa supuestamente probiótica de *Bacillus subtilis* la cual fue suministrada en un cultivo de *Penaeus monodon* y causó una sintomatología similar a la del síndrome de la mancha blanca (Wang *et al.*, 2000).



### **2.3.- Los fagos como mecanismo de control biológico en acuicultura**

A partir del descubrimiento de los fagos por D' Herelle y Twort, los fagos fueron usados en muchas ocasiones con éxito, para el combate de diversas enfermedades infecciosas (Sulakvelidze *et al.*, 2001). En acuicultura, la fagoterapia es una alternativa que se ha explorado para combatir a las bacterias patógenas. Park *et al.* (2000), usaron fagos de la familia Myoviridae y Siphoviridae con fines terapéuticos y lograron una reducción de más del 40% en la mortalidad causada por *Pseudomonas plecogossicida* en peces. Adicionalmente, observaron que estos fagos son muy estables y resistentes a condiciones que facilitan la colonización. Karunasagar *et al.*, (2005), encontraron que la fagoterapia genera resultados más prometedores que los obtenidos con antibióticos para prevenir infecciones causadas por *V. harveyi*.

En *A. franciscana* se ha demostrado que es factible prevenir la mortalidad causada por *Vibrio* sp. mediante el uso de fagos (Martínez-Díaz & Hipólito-Morales 2013), sin embargo, por sus características, la fagoterapia podría también ser usada como un mecanismo útil para prevenir la contaminación por bacterias específicas durante la producción masiva de alimentos vivos.

### **2.4.- Control de la microbiota en *Artemia franciscana***

Los estudios sobre el control de bacterias oportunistas como *Vibrio* sp. en *Artemia* sp., han tenido como principales objetivos: **i)** controlar la composición de la microbiota, agregando bacterias antagónicas específicas al agua de cultivo y **ii)** valorar el cambio en la composición de la carga bacteriana de los organismos que, a su vez, servirán como alimento (Pavlos *et al.*, 2000). Verschuere *et al.* (2000) demostraron la aplicación de bacterias en los cultivos de *Artemia* sp., influye positivamente su crecimiento y supervivencia y trae beneficios sanitarios cuando se usa como alimento vivo para otras especies.

Orozco-Medina (2002), aisló bacterias de los géneros *Exiguobacterium mexicanum*. y *Microbacterium* sp. de quistes comerciales de *Artemia* sp., estas bacterias las utilizó como probiótico en combinación con la levadura de pan *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de *Artemia* sp., obteniendo supervivencias de entre 75% y 95%. Hipólito-Morales (2005) probó el efecto de *Exiguobacterium mexicanum* en combinación con harina de maíz para la producción de *Artemia* sp. y obtuvo porcentajes de supervivencia y desarrollo larval por arriba del 80%, con la mezcla de *E. mexicanum*, *Microbacterium* sp. y harina de maíz como fuente de carbono y obtuvo resultados similares en cuanto a supervivencia. Carmona-Pérez (2006) demostró que al utilizar *Exiguobacterium* sp. y *Bacillus subtilis* con una dieta inerte basada en una mezcla comercial de harinas, se pudo mejorar la supervivencia hasta 90% con *Exiguobacterium* sp. y el desarrollo larval con *B. subtilis*. Dhont & Lavens (1996), demostraron que el agregar bacterias antagónicas a bacterias patógenas durante los cultivos de *Artemia* sp., en su mayoría permitió tener una mejor tasa de crecimiento y supervivencia dentro de los cultivos axénicos, simultáneamente en un cultivo bajo condiciones no estériles. Douillet (1987), reportó que en estos tipos de cultivos, al igual que los axénicos, la tasa de supervivencia y desarrollo es similar, sin embargo, afirmó que el valor nutricional de *Artemia* sp. depende de la colonización espontánea de las bacterias tanto patógenas como antagónicas.

Gorospe & Nakamura (1996), demostraron que el uso de bacterias dentro de los cultivos contribuye muchas veces al incremento del valor nutritivo del alimento. Douillet & Langdon (1994), determinaron que el ingresar bacterias con efectos benéficos en el alimento a los sistemas de cultivo de crustáceos, moluscos y peces tiene el efecto de promover la supervivencia y/o crecimiento de éstos porque constituyen una fuente importante de antagonismo, dado que contienen los componentes bacteriostáticos o bactericidas sobre las bacterias patógenas oportunistas. Quiroz-Guzmán (2005) aisló bacterias antagónicas y vibriófagos de cultivos larvarios de camarón y de la Bahía y Ensenada de La Paz logrando obtener una supervivencia del 90% durante la producción de nauplios de *A. franciscana* encontrando una mejor tasa de eclosión y supervivencia post-eclosión,

concluyendo que los eventos que precedieron la condición del uso de bacterias antagónicas y vibriófagos durante y después de la eclosión de *Artemia* sp., apoyan las observaciones en relación a que las bacterias patógenas oportunistas pueden ser controladas, en especial las del género *Vibrio* sp., durante la producción de este alimento para los organismos en cultivo.

### 3. Justificación

El manejo sanitario del alimento vivo, es un factor muy importante para el desarrollo en la acuicultura en todo el mundo, (Sorgeloos, 1988). Particularmente *Artemia* sp. es el alimento vivo más utilizado para las formas larvarias de peces y crustáceos (López & Lizárraga, 2001). Sin embargo, su calidad sanitaria depende en gran parte de las características microbianas de los quistes (Sogerloos *et al.*, 2001) y de las condiciones durante la incubación.

Hasta hace unos años, los métodos comúnmente usados para el manejo de la microbiota indeseable incluían el uso de antibióticos. Lo que llevó a una serie de problemas derivados de su mala utilización, tales como, proliferación de la resistencia de las bacterias a los antibióticos. Por lo que, se hizo necesario explorar otras vías ambientalmente seguras para el control de las enfermedades, incluyendo cepas de bacterias benéficas que son inoculadas intencionalmente en los tanques de larvicultura (Verschuere *et al.*, 2000). Y aunque sus beneficios han sido ampliamente documentados, aún queda latente el riesgo de la proliferación de cepas virulentas ya que aún no se logra un control completo sobre los principales vectores de contaminación, particularmente de alimentos vivos como los nauplios de *Artemia* sp. En este sentido, la combinación de estrategias de control podría mejorar la efectividad de los resultados obtenidos. Por ejemplo, diversos autores han sugerido que el uso de los fagos es compatible con la aplicación de probióticos debido a la especificidad de los fagos, aparentemente la combinación de estas estrategias permitiría un control más efectivo de las bacterias indeseables, sin embargo hasta ahora esto no ha sido documentado.

De este modo la importancia del presente trabajo radica en que se propone una estrategia de control de bacterias asociadas a nauplios de *Artemia franciscana*, inicialmente como estrategia de descontaminación, pero también como una medida para combatir los efectos dañinos de bacterias patógenas. Se propone un modelo de control microbiano durante la producción de nauplios de nauplios de *A. franciscana* empleando una mezcla de un consorcio de cepas probióticas y vibriófagos lo cual permitirá tener un mecanismo de prevención sobre

las poblaciones de patógenos oportunistas presentes durante la eclosión, previniendo el ingreso de estos a los sistemas de larvicultivo y generar nauplios de *A. franciscana* que sean portadores de bacterias benéficas. Permitiendo tener así un modelo que permite prevenir el ingreso de los principales patógenos oportunistas y a su vez tener un control de estos en los sistemas de cultivo larvario.

El desarrollo del presente trabajo de tesis se dividió en cuatro etapas, las cuales se presentan a continuación en forma de capítulos: primeramente se implementó y estandarizó un nuevo modelo de infección o prueba de reto durante la eclosión de nauplios de *A. franciscana* (capítulo 1) el cual sirvió como plataforma para evaluar las medidas de control microbiano; posteriormente se seleccionó un consorcio de bacterias probióticas con capacidad de controlar a *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* (capítulo 2); posteriormente se seleccionó y evaluó una mezcla de vibriófagos líticos específicos contra *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* (capítulo 3) y finalmente se evaluó la combinación del consorcio de bacterias probióticas y vibriófagos durante la producción de nauplios de *A. franciscana* (capítulo 4).

#### **4. Objetivo General**

Evaluar el uso de un consorcio de bacterias probióticas y fagos como estrategia de control de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio harveyi* durante la producción de nauplios de *Artemia franciscana*.

##### **4.1. Objetivos específicos**

I. Desarrollar un modelo de infección y colonización durante la producción de nauplios de *A. franciscana* como plataforma para analizar medidas de control biológico

II. Desarrollar un consorcio de bacterias probióticas para el control de *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* durante la producción de nauplios de *A. franciscana*.

III. Desarrollar una mezcla de vibriófagos para el control de *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* durante la producción de nauplios de *A. franciscana*.

IV. Analizar el efecto sinérgico de la aplicación de una mezcla de un consorcio de cepas probióticas y vibriófagos durante la producción de nauplios de *A. franciscana*.

#### **5. Hipótesis**

Debido a la estrecha asociación de bacterias patógenas en la producción de nauplios de *A. franciscana*., es necesario evaluar alternativas ambientalmente seguras que permitan mejorar la calidad sanitaria de los nauplios producidos y reducir los eventuales daños que estas bacterias ejercen sobre el rendimiento de los quistes de *A. franciscana*. De acuerdo la eficacia previamente reportada para el uso de probióticos y fagos, se propone que el uso de una mezcla de un consorcio de cepas probióticas y vibriófagos mejorará la eficiencia en el control de patógenos durante la eclosión de *A. franciscana* lo que se verá reflejado en una reducción de *Vibrio* sp. durante la producción y en un incremento en la producción de nauplios de *A. franciscana*.

# Capítulo I

---

## **Desarrollo de un modelo de infección y colonización durante la producción de nauplios de *Artemia franciscana* como plataforma para analizar medidas de control biológico**

Este trabajo fue publicado en *Aquaculture* 2013 bajo el título:

Proliferación, colonización y virulencia de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio harveyi* durante la producción de quistes de *Artemia franciscana*

## Resumen

En este capítulo se desarrolló un modelo de infección experimental con *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio harveyi* para analizar los procesos de proliferación y colonización antes, durante o después de la eclosión de *Artemia franciscana*. Para ello, la producción de nauplios se realizó en condiciones axénicas y en presencia de dos cepas de *V. parahaemolyticus* (PS-017 y ATCC17802) y dos de *V. harveyi* (EC11 y ATCC 14126). Se encontró que los materiales nutritivos liberados durante la eclosión de quistes favorece el crecimiento de *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*, a tasas de crecimiento comparables con los registrados en medios bacteriológicos (entre 0,197 y 0,307 generaciones · h<sup>-1</sup>). De igual forma se encontraron evidencias de colonización en los quistes a partir de 2 h de estar en contacto con las bacterias, y pueden traspasar la barrera del corion y colonizar el embrión antes de la eclosión. En algunos casos, el rendimiento de *A. franciscana* se redujo al 10% en presencia de *Vibrio* sp.; esto como resultado de la mortalidad ocurrida en quistes, durante la eclosión y después de la eclosión. El efecto de cada cepa de *Vibrio* en los quistes de *A. franciscana* se correlacionó directamente con la virulencia registrada durante una prueba de reto estándar utilizando nauplios de *A. franciscana*, lo que indica que el proceso de incubación se puede utilizar como una alternativa para evaluar la virulencia de las diferentes cepas bacterianas silvestres.

**Palabras clave:** Quiste de *Artemia*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, vibriosis



## 1.- Introducción

*Vibrio parahaemolyticus* y *V. harveyi* son importantes patógenos oportunistas de ambientes acuáticos. Ambas son consideradas como el principal problema en el cultivo larvario de crustáceos. En la producción de camarón las pérdidas ocasionadas por vibriosis son elevadas no solo por la mortalidad que producen sino también por la reducción en el crecimiento de los organismos cultivados y por el deterioro de la calidad del producto (Lightner, 1988; Brocks & Lea Master, 1992; Mohny *et al.*, 1994). La vibriosis ocurre desde las fases tempranas de desarrollo del camarón donde producen procesos infecciosos agudos que pueden provocar una pérdida total de la producción (Verpraet *et al.*, 1992, Karunasagar *et al.*, 1994, Chythanya *et al.*, 2001).

Muchos autores coinciden en que *Artemia* sp. es uno de los principales vectores de patógenos para los cultivos; por ejemplo, se ha demostrado que los quistes son portadores de levaduras patógenas (Moore & Strom, 2003), vibrios patógenos (Olsen *et al.*, 2000, Austin & Allen 1982), así como de virus (Yun-Shiang *et al.*, 2002). El problema de la calidad sanitaria de *Artemia* sp. no es simple ya que los quistes portan algunas bacterias asociadas a su superficie, las cuales son adquiridas en los sitios de cosecha y puede modificarse por la temporada y los procesos asociados a ello (Straub & Dixon, 1993).

Muchas de las bacterias presentes en los quistes, proliferan durante la eclosión y enriquecimiento de *Artemia* sp. y algunas colonizan el nauplio cuando este eclosiona (Austin & Allen 1982, Hoj *et al.*, 2009). Austin & Allen (1982) no encontraron evidencia de una colonización íntima de los nauplios por bacterias por lo que sugieren que al eclosionar los nauplios se encuentran prácticamente libres de bacterias, y serán colonizadas unas horas posterior a la eclosión. La carga final de los nauplios es en parte impredecible porque depende entre otros factores del manejo (Hoj *et al.*, 2009) así como de la calidad del agua, la temporada y la presencia de biopelículas en los tanques de eclosión (Wietz *et al.*, 2009). En algunos casos, miembros del género *Vibrio* sp. pueden ser dominantes en la

comunidad bacteriana, lo que representa un riesgo de bioseguridad para cualquier cultivo.

Varios estudios han mostrado que *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* se presentan en los quistes (Austin & Allen 1982) o bien están durante la producción de *Artemia* sp. donde las superficies de los estanques (de Policloruro de vinilo PVC) sirven como un reservorio (Abraham & Palaniappan 2004). Sin embargo, aún no se ha documentado un efecto adverso sobre el rendimiento o la eclosión de *Artemia*. Estudios previos indican que *Vibrio* sp. provoca infecciones y mortalidad en nauplios y juveniles de *Artemia* (Rico-Mora & Voltolina ,1995; Soto-Rodríguez *et al.*, 2006; Haldar *et al.*, 2010). Durante los últimos años, la susceptibilidad de *Artemia* sp. a diferentes especies de *Vibrio* sp. ha sido ampliamente aprovechada como un modelo para estudiar el efecto de la microbiota (beneficiosa o patógena) de crustáceos, así como para estudiar mecanismos para control de estos patógenos bajo condiciones gnotobióticas.

## **2. Métodos**

### **2.1.- Patógenos**

Las bacterias patógenas PS-017 y EC11 empleadas en el presente estudio fueron aisladas durante brotes de vibriosis en cultivos larvarios de camarón de Ecuador (Balcázar & Rojas-Luna, 2007) e identificadas por secuenciación del gen 16S rRNA como *V. parahaemolyticus* (Acceso Gene Bank KC740491) y *V. harveyi* (Acceso Gene Bank KC740490) respectivamente. Siguiendo las condiciones descritas por Balcazar *et al.*, (2010). Además, se utilizaron dos cepas de referencia *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 y *V. harveyi* ATCC 14126. Todas las cepas fueron mantenidas a -80° C en glicerol al 50% y cultivadas en placas de agar marino, incubadas a 35° C y cosechadas a las 24 h. Para los experimentos, cada cepa se ajustó en agua de mar a una densidad óptica de 1 a 585 nm ( $DO_{585} = 1$ ) usando un espectrofotómetro (Spectroquant 1117, Merck Darmstadt, Germany) y el número de unidades formadoras de colonias (UFC) se determinó mediante diluciones decimales en tubos con NaCl al 2.5% en placas de agar marino.

### **2.2.- Obtención de quistes y nauplios axénicos**

Para llevar a cabo el estudio de axenización se utilizaron quistes comerciales de *Artemia franciscana* INVE<sup>®</sup>. Los quistes fueron hidratados en agua destilada estéril durante 60 minutos, posteriormente se desencapsularon en una solución de hipoclorito de sodio al 50% (60 g/L de cloro activo) durante 35 segundos y se enjuagaron abundantemente con agua destilada estéril; posteriormente se desinfectaron en una solución de cloruro de benzalconio 3% por 15 segundos para eliminar las bacterias asociadas al quiste y otra vez se enjuagaron con agua destilada estéril. Los quistes flotantes fueron eliminados debido a que no eclosionaron (Sorgeloos *et al.*, 1986). La obtención de quistes y nauplios axénicos fueron revisadas al final de cada experimento constatando la ausencia de bacterias mediante la transferencia de 20 µL de muestras de quistes homogenizados en solución fisiológica 2.5% NaCl a placas con agar marino y Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) las cuales se incubaron durante 24 h a

35°C. Al término de la incubación los tubos de cultivo contaminados no se consideraron para su posterior análisis y el experimento se repitió.

### **2.3.- Proliferación de *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* en agua de eclosión de *A. franciscana***

La capacidad de las cepas de prueba para crecer en el agua de eclosión de *A. franciscana* (AEA) se evaluó de la siguiente manera: los quistes desinfectados se eclosionaron, en un unidades experimentales con 100 mL de agua de mar natural estéril a una densidad de 0.23 gr por mL, con aireación continua (pasada por un filtro de 0.2 µm). Ya eclosionados (aproximadamente a las 18 horas), se extrajeron los nauplios de manera estéril recuperando el agua en tubos limpios y estériles a razón de 10mL por tubo. Posteriormente, de un cultivo de 24 h de cada uno de patógenos, se ajustaron a una D.O. de 1 a 585 nm agregando a cada unidad 100µL de la suspensión e incubándolos a 30°C con agitación continua en un Tube shaker (Labquake, Barnstead-Thermolyne). Cada cepa se evaluó por triplicado y como control las cepas se pusieron a crecer en tubos con Caldo Marino (CM) y Agua de Mar Artificial (AMA) en las mismas condiciones. El crecimiento de las bacterias fue registrado cada hora como el incremento en absorbancia a 585 nm. Los parámetros de crecimiento en cada medio y para cada cepa se calcularon ajustándolos a los modelos logístico  $y = a \cdot (1 + \exp(b - cx))^{-1}$  y de tasa de crecimiento  $K$ , el cual indica el tiempo en el que la población alcanza su duplicación y se obtuvieron de la siguiente manera:

$$K = \frac{\log X_t - \log X_0}{0.301 (t)}$$

Donde  $K$  es la tasa de crecimiento,  $\log X_t$  es el logaritmo base 10 de la densidad óptica del cultivo bacteriano al tiempo “X” de crecimiento exponencial de la población y  $\log X_0$  es el logaritmo base 10 de la densidad óptica del cultivo bacteriano al tiempo “0” o inicial.

## **2.4.- Infección experimental**

Como se describió previamente quistes libres de bacterias fueron eclosionados en tubos con 10 mL de agua de mar natural estéril a una densidad de 30 quistes por tubo. Cultivos de 24 h de las cuatro cepas (ATCC14126, EC11, ATCC17802 y PS-017) se ajustaron a una densidad óptica de 1 a 585 nm en tubos con agua de mar estéril. Por triplicado se agregaron 20, 100, 300, 600 y 1000  $\mu\text{L}$  de las suspensiones de bacterias a diferentes tubos con los quistes de *A. franciscana* y se mantuvieron en movimiento en un Tube shaker a 28°C con luz continua de 1500 lux. A las 24 h los quistes y nauplios fueron cosechados y enjuagados con agua de mar estéril. El número de bacterias se evaluó mediante técnicas microbiológicas estándar. Brevemente, los quistes y nauplios fueron resuspendidos en 3 mL de agua de mar estéril homogeneizados mediante un disruptor de tejidos (Biospec Products), a partir del homogeneizado se hicieron diluciones decimales en agua de mar estéril y las diluciones fueron sembradas en placas de Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBSMerk KGaA). La carga bacteriana fue expresada en unidades formadoras de colonias UFC por quiste-nauplio.

## **2.5.- Evaluación microscópica de la colonización (SEM)**

Como se describió previamente quistes axénicos fueron eclosionados en agua de mar estéril a una densidad de 3 quistes por mL e inoculados con  $6 \times 10^8$  bacterias/mL cada una de las cepas de patógenos. Estas fueron recolectadas cada hora en condiciones estériles y fijadas con glutaraldehído al 5% directamente en el agua de mar estéril por 4 h a 4°C, finalizado el tiempo cada muestra fue transferida en un gradiente de alcohol etílico comenzando de 30, 50, 70 y 100 % amortiguador de cacodilatos durante 30 m en cada uno, se sometieron a deshidratación total en un sistema de secado a punto crítico (Samdri-PVT-3B). Cada muestra se colocó en porta muestras de aluminio con una cinta de doble cara; finalmente se recubrieron con iones de paladio durante 35 s/2 veces en un evaporador de metal (Sputter Coater, Denton Vacuum Desk II). Las muestras recubiertas fueron observadas al

microscopio electrónico de barrido (S-3000N, Hitachi High-Technologies), con detector de electrones secundarios (SED).

## **2.6.- Capacidad de colonización**

Como se describió previamente quistes libres de bacterias fueron eclosionados en tubos de vidrio con 10 mL de agua de mar natural estéril a una densidad de 30 quistes por tubo. Cultivos de 24 h de las cuatro cepas (PS-017, ATCC17802, EC11 y ATCC14126) se ajustaron a una densidad óptica de 1 a 585 nm en tubos con agua de mar estéril. Por triplicado se agregaron 1, 10, 100 y 1000  $\mu$ L de las suspensiones de bacterias a diferentes tubos con los quistes de *A. franciscana* y se mantuvieron en movimiento en un Tube shaker a 28°C con luz continua de 60 W. A las 24 h los quistes y nauplios fueron cosechados y enjuagados con agua de mar estéril. El número de bacterias se evaluó mediante técnicas microbiológicas estándar. Brevemente, los quistes y nauplios fueron colocados en 3 mL de agua de mar estéril homogeneizados mediante un disruptor de tejidos Tissue-Tearor, a partir del homogeneizado se hicieron diluciones decimales en agua de mar estéril y las diluciones fueron sembradas en placas de TCBS. La carga bacteriana fue expresada en unidades formadoras de colonias UFC por quiste-nauplio.

## **2.7.- Efecto de *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* sobre la eclosión y supervivencia temprana de *A. franciscana*.**

El efecto de las cepas 14126, EC11, 17802 y PS-017 sobre la eclosión y supervivencia durante la eclosión de *A. franciscana* se evaluó mediante una modificación del método descrito por Defoirdt *et al.*, (2005). Cien quistes libres de bacterias se colocaron en tubos con 10 mL de agua de mar estéril y se inocularon con una dosis de 1, 10, 100 y 100  $\mu$ L de suspensión de cada cepa ( $OD_{585}=1$ ). Los tubos fueron mantenidos en un Tube shaker a 28° C con luz continua (1500 lux) y el porcentaje de eclosión y supervivencia de los nauplios fue registrado a las 24 h (aproximadamente 12 horas post eclosión). Registrando la etapa de desarrollo de

cada organismo y la mortalidad total (MT) la cual se calculó como  $MT=MQ+MDE+MPE$  donde MQ= Es el número de quiste no eclosionado; MDE= Es la muerte durante la eclosión incluyendo todos los organismos muertos durante la etapa de umbrela y MPE= muerte después de la eclosión en el cual se incluye a los organismos en Instar I.

## **2.8.- Efecto de *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* sobre nauplios de *A. franciscana*.**

La mortalidad registrada por cepa en cada etapa se comparó con un análisis de correlación y en contraste con la mortalidad registrada durante las pruebas de reto previamente estandarizadas. Nauplios axénicos (obtenidos como se describió previamente) fueron colocados en unidades experimentales con 100 mL de agua de mar estéril a una densidad de 1 nauplio por mL, las unidades fueron inoculadas por triplicado con 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{L}$  de una suspensión de *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* ajustadas a  $DO_{585}=1$  mantenidas a  $28^{\circ}\text{C}$  a las registrando a las 48 h la mortalidad en cada tratamiento. Empleando un modelo de relación dosis-respuesta con la finalidad de evaluar el riesgo de las mortalidades por *Vibrio* sp. durante la producción de nauplios. Los datos de mortalidad de los quistes-nauplios expuestos a diferentes dosis se utilizaron para ajustarse a un modelo Beta ( $\beta$ )-Poisson

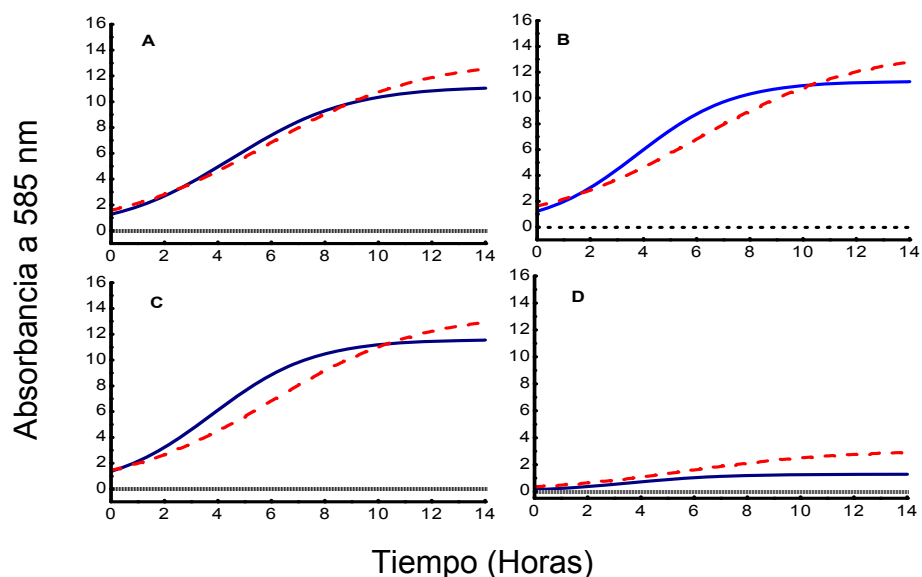
descrito por French *et al.*, (2002):  $P_{death}(D; \alpha, \beta) = 1 - \left(1 + \frac{D}{\beta}\right)^{-\alpha}$

Donde  $P$  describe la probabilidad de muerte con cada dosis de vibrios,  $\beta$  y  $\alpha$  describe la supuesta heterogeneidad en la probabilidad de que cualquier organismo muera por *Vibrio* sp. y  $D$  es la dosis en  $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Para cada cepa la probabilidad más alta de  $\beta$  y  $\alpha$  se obtuvieron mediante el método Bayesiano descrito por French *et al.*, (2002). Los valores de los parámetros  $\beta$  y  $\alpha$  obtenidos por cepa fueron PS-017 ( $\beta = 0.324$ ,  $\alpha = 0.098$ ), ATCC 17802 ( $\beta = 0.565$ ,  $\alpha = 0.115$ ), EC11 ( $\beta = 0.037$ ,  $\alpha = 0.194$ ) and ATCC 14126 ( $\beta = 0.343$ ,  $\alpha = 0.041$ ); los análisis se realizaron empleando Solver (Microsoft Excel 2010).

### 3. Resultados

#### 3.1.- Crecimiento de vibrios en el agua de eclosión de *Artemia*

El crecimiento de los vibrios probadas en el presente trabajo fue significativamente mayor en AEA que en CM y AMA ( $P < 0.05$ ) (Tabla 1), las cepas 17802, PS-017 y EC11 alcanzaron una densidad celular alrededor de un 20% más en AEA que el registrado en CM, mientras que la cepa 14126 alcanzó una densidad de más del 130% del registrado en CM. Los controles se mantuvieron sin cambios aparentes, por lo que el crecimiento en AEA es atribuible a los nutrientes liberados durante la eclosión de *A. franciscana*. El crecimiento en todos los casos sigue una tendencia logística típica con tasas de crecimiento entre 0.161 y 0.240 generaciones por hora y el estado estacionario es alcanzado entre las 8 y 12 horas de incubación. Con un crecimiento máximo de  $1 \times 10^8$  UFC por mL en el caso de *V. parahaemolyticus* y  $1 \times 10^9$  UFC por mL de *V. harveyi*. En promedio la tasa de crecimiento (K) y el máximo crecimiento registrado en CM fue  $\sim 15\%$  menor al registrado en el AEA respectivamente (Fig. 1A - D).



**Figura 1.-** Crecimiento de *V. parahaemolyticus* PS-017 (A), cepa 17802 (B) y *V. harveyi* cepa EC11 (C) y cepa 14126 (D) en agua de eclosión de *Artemia* y en Agua de Eclosión de *Artemia* (---), Caldo Marino (—) y Agua de Mar Artificial (....).



**Tabla 1.-** Cálculo de parámetros de crecimiento de *V. parahaemolyticus* (cepas PS-017y 17802) y *V. harveyi* (cepas EC11y 14126)

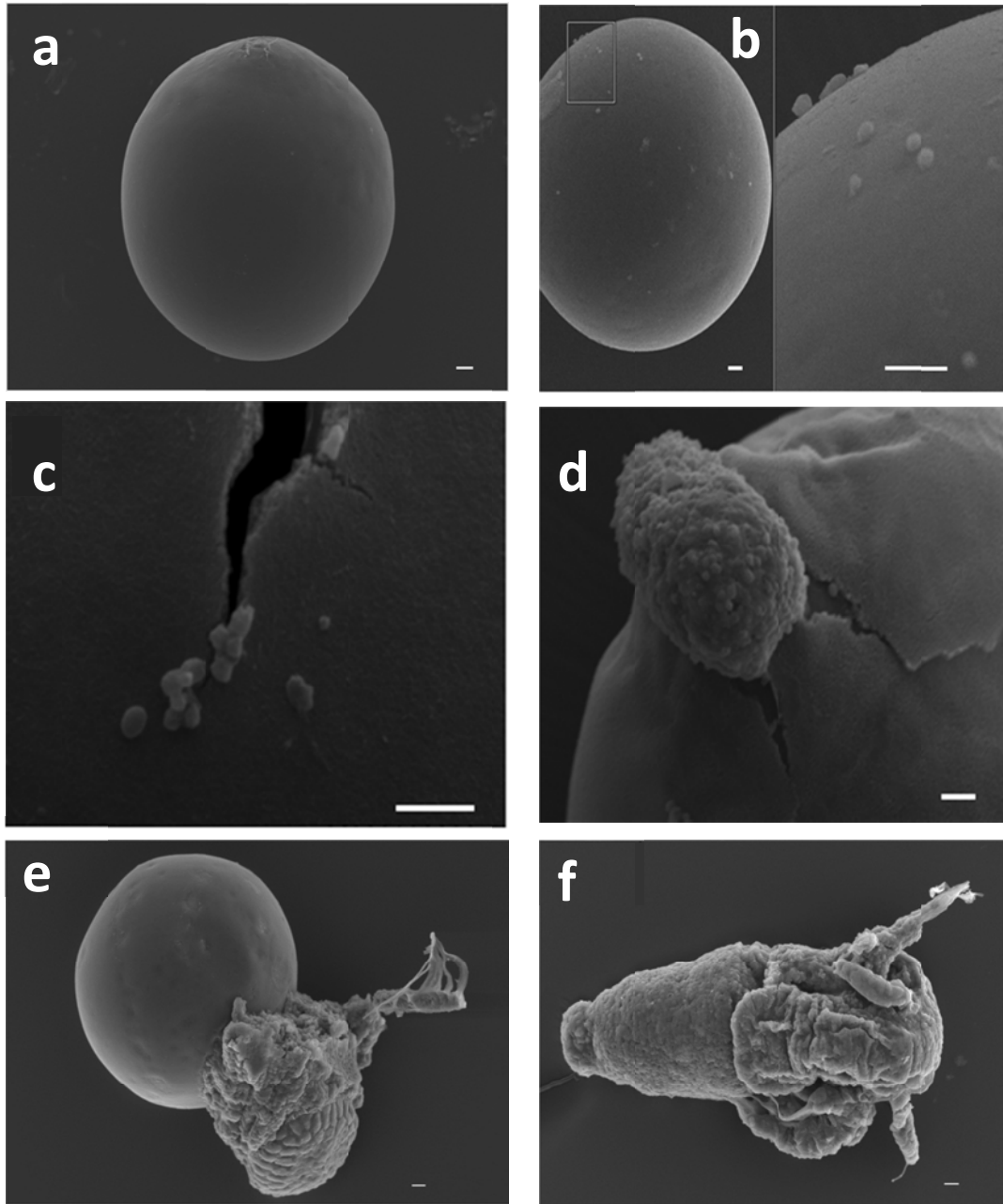
Cepas	Medio*	Tasa de crecimiento(generación/h)	Parámetros de modelo logístico			Valores de correlación
		K	a	b	c	R
<i>Vibrio parahemolyticus</i> (PS-017)	AEA	0.240	0.32	1.96	0.27	0.990
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (17802)	AEA	0.220	0.37	2.08	0.26	0.991
<i>Vibrio harveyi</i> (EC11)	AEA	0.213	0.37	2.08	0.26	0.983
<i>Vibrio harveyi</i> (14126)	AEA	0.161	0.40	2.01	0.52	0.987

CM = Caldo Marino; AEA = Agua de Eclosión de *A. franciscana*

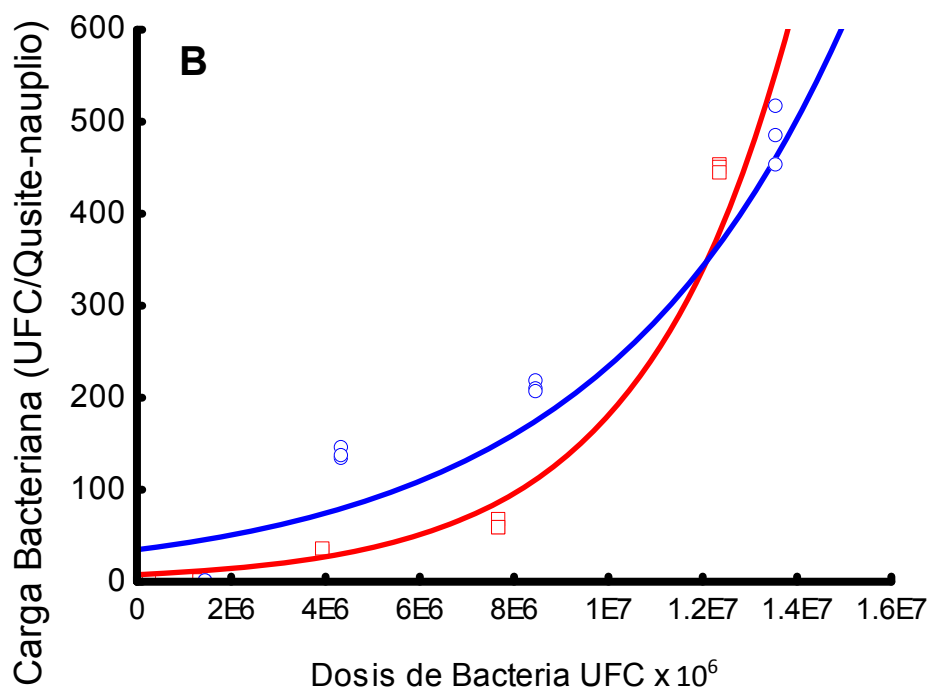
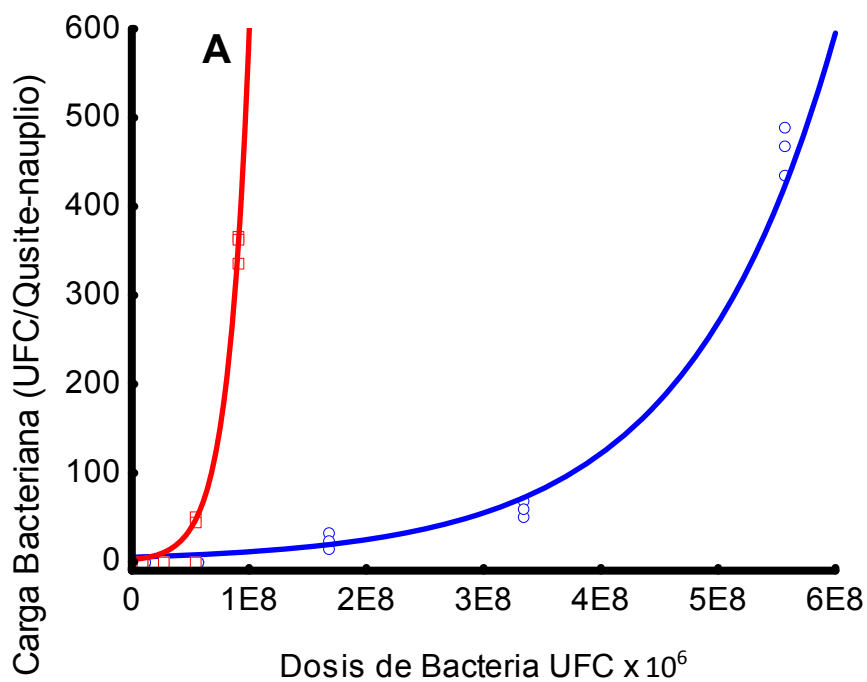
### 3.2.- Colonización de *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* en quistes de *A. franciscana*

La adhesión y la posterior colonización de las cepas de bacterias aparentemente comenzaron en el área de estallamiento (donde se produce la ruptura de la membrana cuticular externa de quistes) (Fig. 2 b, c). Los números máximos observados en los quistes con las cepas de *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* alcanzan  $1 \times 10^6$  CFU·Quiste. Al momento de la eclosión, se observó que los nauplios fueron cubiertos con bacterias (Fig. 2d) y, a diferencia de los controles, algunos organismos tenían daños aparentes, tales como natación errática y falta de apéndices (Fig. 2f). En algunos casos, la muerte ocurrió en la membrana de eclosión o en las primeras cuatro horas después de la eclosión (Fig. 2e).

*A. franciscana* fue rápidamente colonizada por *Vibrio* sp. y el número final de bacterias fue directamente correlacionado con el número de bacterias inoculadas PS-017 (R=0.98), ATCC 17802 (R=0.89), EC11 (R=0.88) and ATTC 14126 (R=0.86) (en todos los casos  $P < 0.05$ ). La relación entre el número de bacterias inoculadas (dosis) y el número de bacterias por nauplios fue debidamente descrito usando un modelo exponencial  $Y = a \cdot e^{bx}$  (Fig. 3). Las aparentes diferencias entre las cepas encontradas, es decir, la mayor carga bacteriana fue registrada como 500 UFC por organismo, sin embargo, la dosis necesaria para llegar a esta carga bacteriana fue diferente entre cepas: para *V. parahaemolyticus* (PS-017 y 17802) la mayor carga bacteriana fue registrada a una dosis de  $14 \times 10^6$  CFU mL<sup>-1</sup> mientras que *V. harveyi* la mayor dosis requerida fue entre 100 y  $600 \times 10^6$  CFU mL<sup>-1</sup> para alcanzar dicha carga bacteriana.



**Figura 2.-** Colonización de quistes de *A. franciscana* en SEM. (a) Quiste axénico, (b) Quiste colonizado por bacterias patógenas en 2 h de la infección experimental, (c) bacterias en la zona de estallido, (d) Instar I colonizada durante la eclosión, (e) eclosión incompleta, (f) Metanauplio I con daño aparente como ausencia de anténula, escala 1 $\mu$ m, distancia de trabajo 14.5 mm, detector de electrones secundarios



**Figura 3.-** Colonización de quistes de *A. franciscana* expuestos a diferentes dosis con *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*. (A) ATCC 14126 (□) EC11 (○) (B) ATCC 17802 (□) PS-017 (○)

### **3.3.- Efecto de *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* sobre la eclosión y supervivencia temprana de *A. franciscana*.**

En los tratamientos con las cepas EC11, ATCC17802 y PS-017 las mortalidades más altas se observaron en dos etapas de la producción de nauplios: MQ y MPE; en ambos casos este efecto se vio reflejado con las dosis de 100 y 1000  $\mu$ L (Tabla 2). Con *V. harveyi* cepa EC11 no hubo diferencias significativas en las concentraciones menores ( $P>0.05$ ) en los cuales se puede obtener mortalidades durante la eclosión CM y HM mientras que en las dosis altas se obtuvieron diferencias significativas ( $P<0.05$ ) entre el HM y PHM (Fig. 5 c). Con las cepas de *V. parahaemolyticus* se observó que no hubo diferencias significativas en las concentraciones menores ( $P>0.05$ ) durante el CM mientras que a concentraciones altas se obtuvo diferencias significativas ( $P<0.05$ ) entre HM y PHM (Fig. 4 a y b). Por otra parte se observa que durante el HM esta fue dependiente del tratamiento ya que en el caso de las muestras de EC11 fue menor a diferencia de los tratamientos ya mencionados.

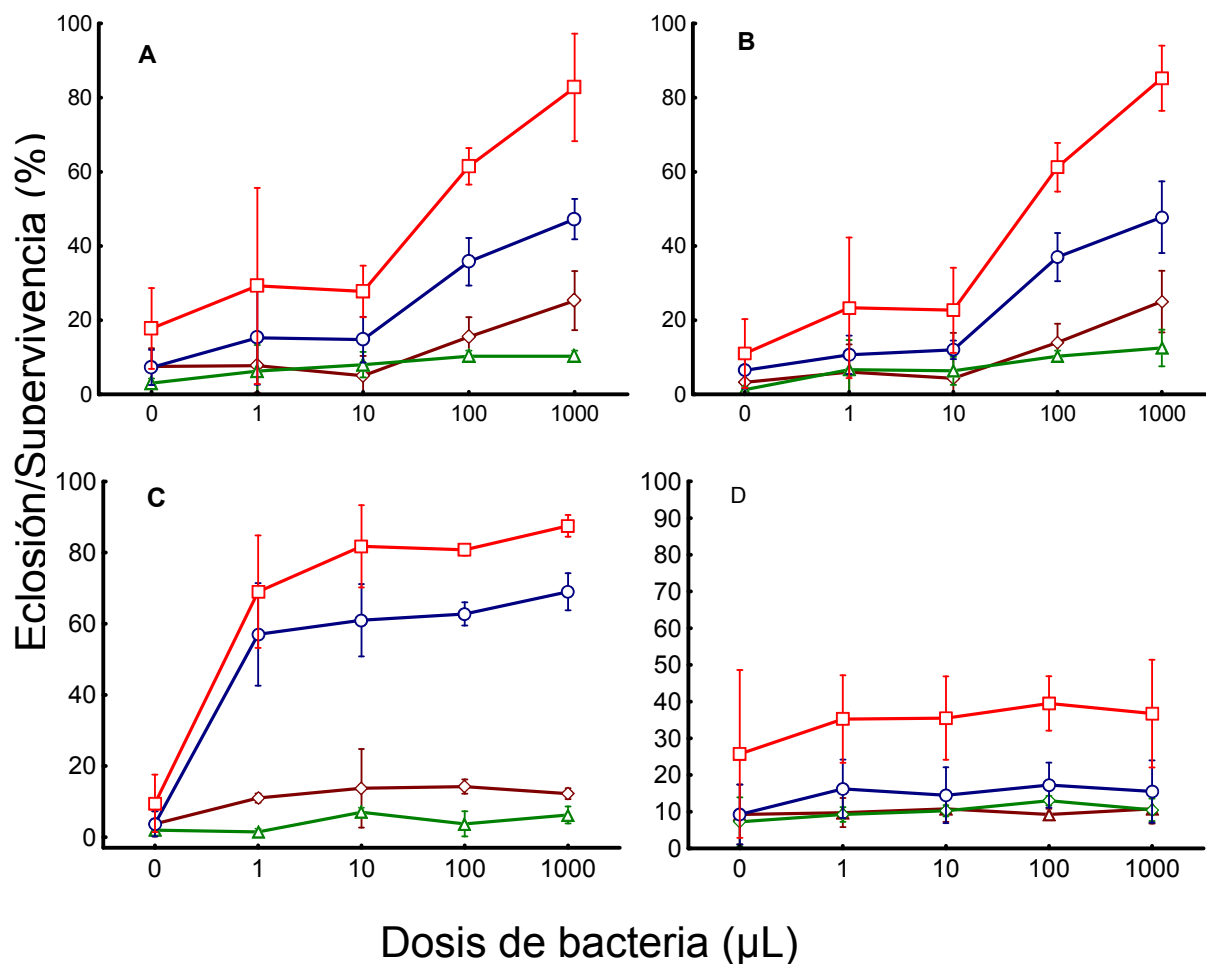
En contraste con la cepa 14126, no se observó un efecto dependiente de la dosis de bacterias, la mortalidad máxima acumulada entre los quistes no eclosionados y la mortalidad temprana fue de 20 %. Además de no obtener diferencias significativas ( $P>0.05$ ) en las dosis probadas obteniendo un 90% de eclosión y un 80% de supervivencia (Fig. 5 d).

**Tabla 2.-** Efecto de diferentes dosis de *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* durante la eclosión de *A. franciscana*. TM= Mortalidad Total; QM= Mortalidad de quistes (organismos no eclosionados); EM= Mortalidad durante la eclosión (organismos muertos durante la eclosión dentro del huevo o en la membrana de eclosión); PEM= Mortalidad post-eclosión (nauplio muertos). Los datos son la media obtenida de triplicados y desviación estándar entre paréntesis, letras diferentes indican diferencias significativas al comparar entre dosis.

Cepa	Estadio	Dosis bacteriana (µL)					P
		0	1	10	100	1000	
<i>V. parahaemolyticus</i>	CM	7.50 (3.11) <sup>ab</sup>	7.75 (4.57) <sup>ab</sup>	5.00 (3.37) <sup>a</sup>	15.50 (3.32) <sup>b</sup>	25.25 (4.99) <sup>c</sup>	***
PS-017	HM	3.00 (0.82) <sup>a</sup>	6.25 (4.43) <sup>ab</sup>	8.00 (2.16) <sup>ab</sup>	10.25 (0.96) <sup>b</sup>	10.25 (0.96) <sup>b</sup>	**
	PHM	7.25 (2.99) <sup>a</sup>	15.25 (7.97) <sup>a</sup>	14.75 (3.86) <sup>a</sup>	35.75 (4.03) <sup>b</sup>	47.25 (3.40) <sup>c</sup>	***
	HTM	17.75 (6.85) <sup>a</sup>	29.25 (16.60) <sup>a</sup>	27.75 (4.35) <sup>a</sup>	61.50 (3.11) <sup>b</sup>	82.75 (9.11) <sup>c</sup>	***
	NM	0.25 (0.53) <sup>a</sup>	56.25 (0.53) <sup>b</sup>	67.25 (0.53) <sup>c</sup>	77.50 (0.57) <sup>d</sup>	88.50 (0.57) <sup>e</sup>	***
<i>V. parahaemolyticus</i>	CM	3.25 (2.63) <sup>a</sup>	6.00 (3.00) <sup>ab</sup>	4.33 (4.93) <sup>a</sup>	14.00 (3.16) <sup>b</sup>	25.00 (5.23) <sup>c</sup>	***
17802	HM	1.25 (0.50) <sup>a</sup>	6.67 (3.21) <sup>b</sup>	6.33 (1.53) <sup>b</sup>	10.25 (0.96) <sup>bc</sup>	12.50 (3.11) <sup>c</sup>	***
	PHM	6.50 (3.11) <sup>a</sup>	10.67 (2.08) <sup>a</sup>	12.00 (1.00) <sup>a</sup>	37.00 (4.08) <sup>b</sup>	47.75 (6.08) <sup>c</sup>	***
	HTM	11.00 (5.83) <sup>a</sup>	23.33 (7.64) <sup>a</sup>	22.67 (4.62) <sup>a</sup>	61.25 (4.11) <sup>b</sup>	85.25 (5.50) <sup>c</sup>	***
	NM	1.00 (0.81) <sup>a</sup>	58.75 (0.53) <sup>b</sup>	68.75 (1.25) <sup>c</sup>	78.50 (0.57) <sup>d</sup>	87.75 (0.53) <sup>e</sup>	***
<i>V. harveyi</i>	CM	3.75 (2.22) <sup>a</sup>	11.00 (0.82) <sup>ab</sup>	13.75 (6.95) <sup>b</sup>	14.25 (1.26) <sup>b</sup>	12.25 (0.96) <sup>b</sup>	**
EC11	HM	2.00 (0.82) <sup>a</sup>	1.50 (0.58) <sup>a</sup>	7.00 (0.82) <sup>c</sup>	3.75 (2.22) <sup>ab</sup>	6.25 (1.50) <sup>bc</sup>	***
	PHM	3.75 (2.22) <sup>a</sup>	57.00 (9.06) <sup>b</sup>	61.00 (6.38) <sup>bc</sup>	62.75 (2.06) <sup>bc</sup>	69.00 (3.27) <sup>c</sup>	***
	HTM	9.50 (5.07) <sup>a</sup>	69.00 (9.93) <sup>b</sup>	81.75 (7.27) <sup>bc</sup>	80.75 (0.96) <sup>bc</sup>	87.50 (1.91) <sup>c</sup>	***
	NM	0.75 (0.57) <sup>a</sup>	56.00 (0.81) <sup>b</sup>	77.50 (0.57) <sup>c</sup>	86.50 (1.00) <sup>d</sup>	90.75 (0.53) <sup>e</sup>	***

<i>V. harveyi</i>	CM	9.25 (5.12)	9.75 (2.50)	10.75 (2.22)	9.25 (0.96)	10.75 (2.50)	ns
14126	HM	7.25 (4.19) <sup>ab</sup>	9.25 (1.26) <sup>b</sup>	10.25 (0.96) <sup>b</sup>	13.00 (0.82) <sup>bc</sup>	10.50 (1.91) <sup>b</sup>	*
	PHM	9.25 (5.12)	16.25 (4.99)	14.50 (4.80)	17.25 (3.86)	15.50 (5.32)	ns
	HTM	25.75 (14.36)	35.25 (7.50)	35.50 (7.14)	39.50 (4.65)	36.75 (9.22)	ns
	NM	0.25 (0.57) <sup>a</sup>	3.00 (1.41) <sup>b</sup>	10.75 (0.95) <sup>c</sup>	18.50 (1.00) <sup>d</sup>	19.75 (0.53) <sup>d</sup>	***

Ns = sin diferencias significativas; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , y \*\*\* $P < 0.001$



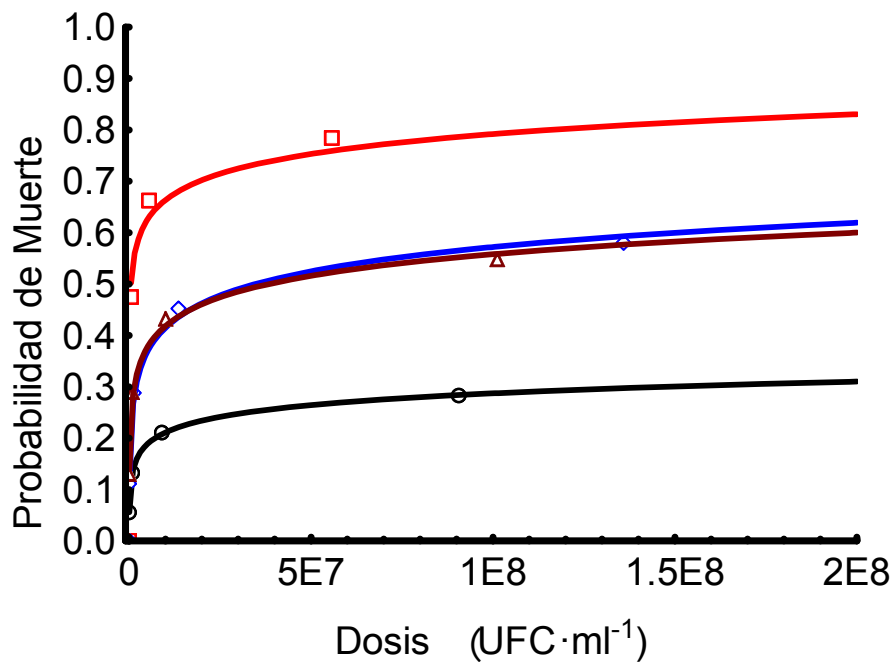
**Figura 4.-** Efecto de eclosión y post-eclosión de nauplios de *A. franciscana* durante la infección experimental con (A) PS-017, (B) ATCC 17802, (C) EC11 y (D) ATCC 14126 Mortalidad Total (MT=□), Mortalidad post-eclosión (MPE=○), Mortalidad durante la eclosión (MDE=◇) y Quistes no eclosionados (MQ=△).

### 3.4.- Efecto de *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* en la supervivencia de nauplios de *A. franciscana*

Se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la mortalidad de nauplios de *A. franciscana* expuestos a las diferentes dosis de *V. harveyi* comparadas con el control, obteniendo una supervivencia de 50% con la dosis de 1µL con EC11, mientras que con la cepa 14126 se obtuvo una supervivencia de 70% para las



cepas de *V. parahaemolyticus* se obtuvo una supervivencia de 50 % con ambas cepas a una concentración de 100  $\mu$ L. Sin embargo con el modelo beta Poisson los dosis menores parecieran dar un mal ajuste; ya que la relativamente alta probabilidad de que los organismos se enfermaran a dichas dosis es baja demostrando así que aparentemente no tiene un efecto en la curva descrita por el modelo. Sin embargo a dosis más altas se puede determinar las diferencias entre cada una de las cepas permitiendo así tener un ajuste en la curva las cuales permanece constante a dichas dosis (Fig. 6).



**Figura 5.-** Probabilidad de infección en nauplios de *A. franciscana* con *V. parahaemolyticus* ( $\Delta$  = cepa PS-017 y  $\diamond$  = cepa 17,802) y *V. harveyi* ( $\square$  = cepa EC11  $\circ$  y = cepa 14126)

#### 4.- Discusión

En estudios previos se ha demostrado un efecto importante de la comunidad microbiana durante el desarrollo de *A. franciscana* (Orozco- Medina 2001; Hipólito- Morales 2005; Carmona-Pérez 2010), sin embargo, el efecto de las bacterias patógenas durante la eclosión de *A. franciscana* no ha sido documentado. Los quistes comerciales de *Artemia* sp. vienen acompañados de bacterias (Wheeler *et al.*, 1979) las cuales fueron adquiridas en los sitios de producción, *i. e.* durante la cosecha son colonizados por *Vibrio* sp. *Staphylococcus* sp. y *Pseudomonas* sp., dichas bacterias se pueden reactivar durante la incubación alcanzando niveles superiores de  $10^6$ UFC/g (Dehasque *et al.*, 1998) afectando los cultivos donde son usadas como alimento.

Durante el presente estudio se determinó que a una densidad de aproximada  $1.1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> las cepas de *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* tienen la capacidad de colonizar los quistes durante las primeras 3 h de exposición, además, inducen una reducción en los porcentaje de eclosión hasta 30% en comparación al control sin bacterias que alcanza un 98% de eclosión bajo las mismas condiciones de cultivo. Sorgeloos *et al.*, (2001) observaron que los quistes tratados con hipoclorito eran desinfectados en su totalidad y los nauplios eran recolonizados rápidamente durante la ruptura del quiste, asociando la liberación de glicerol con el crecimiento de *Vibrio* sp. En el presente estudio se observó que al eclosionar, algunos nauplios ya estaban colonizados de bacterias y/o presentaban daños externos evidentes, como falta de apéndices, nado errático, coloración opaca, y en algunos casos, los nauplios murieron dentro de la membrana de eclosión. Nuestras observaciones son similares con lo descrito por Austin & Allen (1982); ellos encontraron que la carga bacteriana de los quistes era relativamente baja en condiciones de laboratorio y que dichas bacterias se multiplicaban rápidamente a las 24 horas de la eclosión ocasionando mortalidades masivas alrededor de las 72 horas.

*Artemia* sp. ha sido usada como modelo, para estudiar los procesos patológicos causados por diferentes especies de *Vibrio* sp. en crustáceos. Algunas cepas son aparentemente inocuas para *Artemia* sp., al estar en una suspensión de estas bacterias las encapsula y de este modo se pueden usar como vector en modelos de infección con camarón o peces (Gómez- Gil *et al.*, 1998).

En el presente estudio, se observó que *V. harveyi* cepa EC11 indujo mortalidades de 48 y 86 % a densidades de  $1.1 \times 10^6$  y  $5.4 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> respectivamente. Previamente Soto Rodríguez *et al.*, (2003) registraron una mortalidad máxima del 82% durante la infección experimentales de nauplios de *A. franciscana* con *V. harveyi* (cepa Z2) aislada de agua de tanques de engorda de *Penaeus stylirostris*. En contraste la cepa ATCC14126 indujo mortalidades de 6 y 28% lo cual es menor en comparación a la cepa EC11.

Las cepas 17802 y PS-017 de *V. parahaemolyticus* indujeron una mortalidad cercana al 41% cuando se aplicó una dosis de  $1.3 \times 10^7$ . Estudios previos han presentado valores variables de mortalidad con otras cepas. En este sentido, Puente *et al.*, (1992) demostraron que una cepa de *V. parahaemolyticus* indujo una mortalidad cercana al 50%, mientras Rico-Mora & Voltolina (1995) observaron un 100% de mortalidad en nauplios de *Artemia* sp. Las diferencias encontradas con estudios anteriores, soportan la idea que la virulencia de *V. parahaemolyticus* es cepa-específica y podría depender de su capacidad de producción de enzimas o toxinas u otros factores de virulencia, los cuales no fueron medidos en el presente estudio, sin embargo, se requiere determinar los factores que modifican la virulencia para valorar los riesgos de su presencia en la producción de crustáceos. En el presente estudio *V. parahaemolyticus* no solo provocó la muerte de los nauplios sino que, también su presencia, redujo la tasa de eclosión, indujo lesiones durante el desarrollo (*i.e.* pérdida de apéndices); y los nauplios que eclosionaron murieron en menos de 12 horas post-eclosión.

*V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* son consideradas como las principales bacterias responsables de enfermedad y muerte en cultivo de camarón y otros crustáceos, aunque también son capaces de inducir procesos infecciosos en moluscos, peces y en el caso de *V. parahaemolyticus* en humanos. En el caso de *A. franciscana* la presencia de *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* es relevante por la posibilidad de transmisión a los cultivos donde son empleados, sin embargo, con base en los resultados de este estudio, la presencia de estas bacterias puede afectar los rendimientos durante la producción de *A. franciscana* afectando el éxito de eclosión y la supervivencia temprana de *A. franciscana*.

Los modelos gnotobióticos se han convertido en una herramienta indispensable para elucidar el papel de los microorganismos de la microbiota o que putativamente causan daños en los sistemas de producción. Su uso permite eliminar sesgos provocados por la interacción con otros microorganismos y descubrir procesos atribuibles a la presencia de bacterias específicas. En *Artemia* sp. los modelos gnotobióticos han servido para catalogar bacterias con efecto negativo (patógenos), positivos (probióticos) o neutrales (Marques *et al.*, 2005) derivado del efecto sobre la mortalidad o el desarrollo. Marques *et al.* (2005) llegaron a la conclusión que algunos patógenos solo pueden inducir un incremento en la mortalidad cuando *Artemia* sp. es mantenida en condiciones sub óptimas o que comprometen el buen funcionamiento del sistema inmune. El presente estudio se incluyeron tres periodos en los que las bacterias pueden provocar daños en *A. franciscana*: a) dentro del quiste; b) al momento de eclosionar y c) durante la apertura de la cavidad oral. En cada una de estas etapas, la susceptibilidad de *A. franciscana* puede ser diferente debido a las barreras físicas que impiden la entrada de las bacterias a los tejidos, sin embargo, nosotros encontramos que para las cepas probadas de *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* existe una correlación muy alta entre las mortalidades ocurridas en cada una de las etapas, lo que sugiere que en algunos casos la virulencia para *A. franciscana* puede valorarse desde la eclosión lo que facilitaría drásticamente su evaluación, permitiendo una reducción de tiempo y laboriosidad del proceso. Desafortunadamente lo anterior puede depender de las especies o cepas de bacterias, ya que en algunos casos (*i.e.* *V. alginolyticus*) los

daños en los nauplios fueron atribuidos a una sobre colonización de los nauplios lo que les impide nadar (Gunther & Catena 1980). De igual forma Soto-Rodríguez *et al.* (2003) examinaron la relación entre varios vibrios luminiscentes (en su mayoría *V. harveyi*) obtenidos a partir de agua de mar y de camarones enfermos en nauplios de *A. franciscana* axénicos. Observando que con nueve de estas inoculadas a  $10^6$  cel·mL<sup>-1</sup> se lograron obtener mortalidades y que estas pueden encapsular un máximo de  $10^3$  cel·mL<sup>-1</sup> por nauplio, sin aparente relación entre las densidades de bacterias inoculadas, la cantidad de bacterias ingeridas y la mortalidad de nauplios. Por lo tanto se sugiere que la virulencia de las cepas bacterianas se relaciona más con la producción de exoenzimas que a factores de colonización en estudios gnotobióticos. La reproducción experimental de los procesos infecciosos es esencial en el desarrollo de medidas de control, como el uso de desinfectantes antibióticos o incluso para evaluar los beneficios de cepas probióticas. El modelo obtenido en el presente estudio puede ser empleado para esos fines, además de que demuestra la capacidad que estas bacterias tienen para afectar la producción de *A. franciscana*.

## Capítulo II

---

Selección de un consorcio de bacterias probióticas para el control de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio harveyi* durante la producción de nauplios de *Artemia franciscana*

Parte de este capítulo fue presentado en el curso **Microbial community management in aquaculture (PhD course & Training school)** of Laboratory of Aquaculture & Artemia Reference Center of Ghent University, Belgium, obteniendo un segundo lugar por el modelo de selección y uso de probióticos desarrollado. Además de ser presentado en el congreso *vibrios In The Environment 2010* Biloxi, Mississippi, USA.

## Resumen

En el presente capítulo se seleccionó un consorcio de bacterias probióticas como estrategia de control microbiano con base en 1) exclusión competitiva; 2) competencia por nutrientes; 3) disminución de patógenos oportunistas y 4) competencia por sitios de adhesión. Se incluyeron solo organismos que en pruebas *in vitro* no mostraran una actividad antagónica entre cada uno de los probióticos. Se seleccionó un consorcio bacteriano de 11 cepas potencialmente probióticas. Se determinó que los materiales nutritivos liberados durante la eclosión de *Artemia franciscana* favorecen el crecimiento de cada una de las cepas del consorcio. De igual forma se determinó que los quistes fueron colonizados al contacto con el consorcio, reduciendo de esta manera el tiempo de eclosión de 13 h a 6 h; además de servir como una forma de control biológico sobre los patógenos a partir de una dosis de  $5 \times 10^7$  cel·mL<sup>-1</sup> suministrada en muestras infectadas experimentalmente, se obtuvieron los siguientes valores de supervivencia y eclosión respectivamente: 85 y 89 % en las muestras infectadas con *Vibrio harveyi* y 89 y 90% en las muestras infectadas con *Vibrio parahaemolyticus*. De esta manera el consorcio bacteriano controla *in vivo* la incidencia de los patógenos durante la producción de *Artemia franciscana*.

**Palabras clave:** Probióticos, *V. parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, Quistes de *Artemia*

## 1. Introducción

En acuicultura, *Artemia* sp. es usada de forma enriquecida para poder incrementar la frecuencia de desoves, mejorar los niveles de maduración de reproductores y mejorar la calidad larvaria (Wouters *et al.*, 1999). Siendo el estadio metanauplio II un mejorador del crecimiento en los estadios post-larvales de camarón, y larvarios en peces, obteniendo mejores resultados en el control de calidad de larvas (Sorgeloos *et al.*, 1988).

Para la obtención de nauplios de *Artemia* sp. las granjas realizan rutinariamente la descapsulación química mediante hipoclorito, con la cual teóricamente se logra una completa desinfección de los quistes de *Artemia* sp. (Sorgeloos, 1972). Sin embargo, aunque el tratamiento con hipoclorito llega a desinfectar los quistes completamente, estos son rápidamente recolonizados por bacterias durante la etapa de eclosión (Dehasque *et al.*, 1998). Ello ocasiona que la producción intensiva de este alimento vivo esté asociada a la transmisión de enfermedades y a la disminución en la supervivencia. Adicionalmente, la elevada producción de sustancias orgánicas que libera *Artemia* sp. dentro de los sistemas de cultivos ocasiona una rápida proliferación de bacterias patógenas oportunistas (Skjermo *et al.*, 1997).

Estudios recientes se han enfocado en el análisis de las comunidades bacterianas en cultivos de *Artemia* sp. principalmente para mejorar la supervivencia larval y el desarrollo, e incrementar la resistencia a enfermedades (Verschure *et al.*, 1999; Verschure *et al.*, 2000; Makridis *et al.*, 2000; Marques *et al.*, 2006). Por ello diversos probióticos han sido estudiados analizando su actividad antagonica y/o de exclusión competitiva, promoviendo así el desarrollo de resistencia a enfermedades en los organismos cultivados (Maldonado-Galdeano *et al.*, 2009), además de que su uso pudiera constituir una alternativa ecológicamente aceptable para el control de enfermedades (Gildberg *et al.*, 1997; Cabello, 2006).



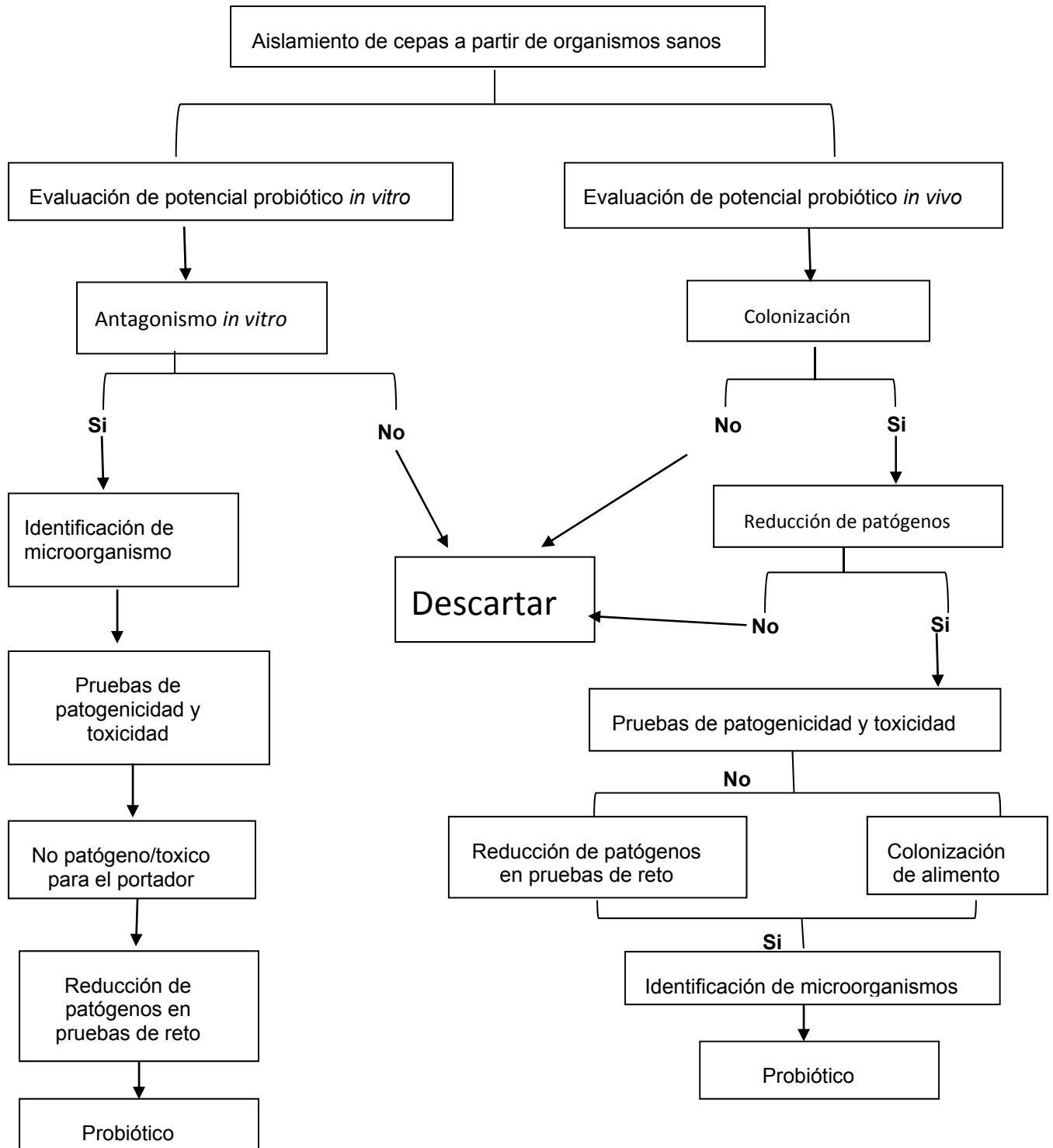
De igual forma se ha sugerido que el mantenimiento de una comunidad bacteriana natural y equilibrada puede beneficiar a los sistemas acuícolas (Alabi *et al.*, 1997). Por lo que se han explorado los bioencapsulados en nauplios de *Artemia* sp. como alimento en diversos organismos acuáticos. Gómez-Gil *et al.* (2000) demuestran que *L. bulgaricus* y *S. lactis* bioencapsulados en nauplios de *Artemia* mejoran la supervivencia de larvas de *Scophthalmus maximus*. En crustáceos, Patra y Mohamed (2003) enriquecieron nauplios de *Artemia* sp. con *S. boulardii* y encontraron que con  $10^4$  UFC ml<sup>-1</sup> se mejora la resistencia de dichos nauplios a la infección con *V. harveyi*. Así mismo, Venkat *et al.*, (2004) obtuvieron mayor crecimiento y una alta conversión alimenticia y ganancia de proteínas en postlarvas del camarón *Macrobrachium rosenbergii* alimentadas con *L. sporogenes* bioencapsulados en nauplios de *Artemia* sp.

Sin embargo la bioencapsulación de bacterias y levaduras en *Artemia* sp. depende del inóculo, de la especie de microorganismo empleado, del tiempo de exposición y del estado de desarrollo de la *Artemia* sp. Gómez-Gil *et al.*, (1998) bioencapsularon cepas de *Vibrio* sp. (C7b y HL57) en nauplios de *A. franciscana* con inóculos de  $10^7$  y  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> y a los 45 minutos y 2h logran la máxima concentración de  $2,7 \times 10^3$  y  $4,5 \times 10^3$  UFC nauplio<sup>-1</sup>, respectivamente. De igual manera Makridis *et al.* (2001) bioencapsularon *Vibrio* sp. (PB1-11 y PB 6-1) pero en metanauplios de *A. franciscana* empleando un inóculo de 1 a  $2 \times 10^7$  UFC ml<sup>-1</sup> durante 30 minutos para lograr  $2,7 \times 10^3$  UFC metanauplio<sup>-1</sup> y a las 4 h logran los mayores valores de  $0,85 \times 10^2$  UFC nauplio<sup>-1</sup>.

Por lo tanto, la capacidad de modular la carga microbiana durante la producción de nauplios de *A. franciscana* es una medida que puede ayudar a obtener nauplios con diversas cepas probióticas capaces de disminuir la presencia de patógenos oportunistas durante la producción, sirviendo esto como un modelo de control biológico en los sistemas de acuícolas. En el presente trabajo, se analizó la capacidad colonizar y de inhibir *in vivo* la proliferación de vibrios durante la eclosión de *A. franciscana*, mediante el uso de bacterias probióticas aisladas de la microbiota de larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y del tracto digestivo de juveniles de *Oreochromis niloticus*.

## 2.0.- Materiales y métodos

2.1.- En el siguiente diagrama se resumen los procedimientos desarrollados en el presente capítulo.



## 2.2.- Probióticos

Las bacterias empleadas en el presente estudio fueron aisladas previamente de cultivos larvarios de camarón blanco (R1C, R7C, R8C, R11C, R12C, R13C, R34C, UTM126) (García-Rodríguez 2003; Balcázar & Rojas-Luna, 2007) del tracto digestivo de juveniles de *Oreochromis niloticus* (Be1, Be5, Be12, B10, B11, B12, Cb Lta, C10 Lta, Cb Lba, B18) (Apún-Molina *et al.*, 2007). Además, se utilizaron cepas de referencia de la American Type Culture Collection (ATCC) *Lactobacillus acidophilus* (11975), *Bacillus subtilis* (6051), *Bacillus clausii* (21536), *Bacillus clausii* (21537), *Lactobacillus rhamnosus* (53103) y *V. alginolyticus* (17749). Todas las cepas fueron mantenidas a -80°C y cultivadas en placas de agar marino, incubadas a 35°C y cosechadas a las 24 h. Para los experimentos las cepas fueron ajustadas a densidad óptica de 1 a 585 nm ( $DO_{585} = 1$ ) en un (Spectroquant 1117 Merk) y el número de unidades formadoras de colonias (UFC) se contaron después de cada dilución serial en 2.5% NaCl en placas de Agar Marino (Agua de mar filtrada 1 l, Extracto de levadura 1 g, Peptona de carne 5 g y BactoAgar 17 g). Las bacterias patógenas empleadas para las pruebas de reto son los mencionados en el capítulo I.

## 2.3.- Producción de sustancias antagónicas

Para esto mediante una modificación de la técnica de doble capa descrita por Dopazo *et al.*, (1988), se realizaron punciones sobre placas de agar marino de cada uno de las cepas probióticas incubándolas a 35°C por 24 h; posteriormente se mataron exponiéndolas a vapor de cloroformo absoluto durante 20 min. Seguido, de un cultivo de 24 h de los patógenos (*V. harveyi* 14126, EC11 y *V. parahaemolyticus* 17802, PS-017) y de cada uno de los probióticos se preparó una suspensión bacteriana a una densidad óptica de 1 a 560 nm ( $D.O=1 \lambda=560$ ), de la cual se hicieron diluciones decimales ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) en solución salina estéril (2.5 % NaCl). Tomando 100  $\mu$ L de cada dilución y se adicionaron a tubos con 10 mL de agar marino estéril a 50°C, los cuales se vertieron a las placas con las punciones bacterianas incubándolas a 35°C por 24 h. la capacidad antagónica de cada cepa con base a la formación de halo de inhibición alrededor de la punción.

#### **2.4.- Actividad hemolítica de cepas probióticas**

La actividad hemolítica fue determinada de acuerdo a Cowan & Steel's (1993): en la cual se emplearon placas petri con base agar y 5% de sangre humana. Se hicieron punciones de cada uno de los probióticos y se incubaron a 37°C, por 24 h. observando al final el halo de lisis para determinar el tipo de hemólisis ( $\alpha$ ,  $\beta$  ó  $\gamma$ ).

#### **2.5.- Pruebas bioquímicas**

Se realizó una caracterización de cada uno de las cepas probióticas con base en Tinción de Gram, forma, tamaño, Oxidasa (OXI), Catalasa (CAT), Citrato (CIT) e Indol (IND). Cada una de las técnicas así como la composición de los medios usados se realizó de acuerdo a lo descrito por Quiroz-Guzmán (2005)

#### **2.6.- Producción de exotoxinas (ECP's) y su efecto durante la producción de nauplios de *A. franciscana***

Los productos extracelulares (ECP's) de cada una de las cepas probióticas y su mezcla fueron recuperados a partir de cultivos de 24 horas en tubos con 10 mL de caldo marino y agua de eclosión de *A. franciscana* Posteriormente los cultivos fueron centrifugados a 3000 rpm por 30 min. El sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de 0.02  $\mu$ m, recuperado en tubos previamente esterilizados. Posteriormente por cuadruplicado se agregó de 1- 1000  $\mu$ L de este sobrenadante a tubos de 10 mL con 100 quistes axénicos de *A. franciscana* y a unidades con 100 mL con 100 nauplios axénicos de *A. franciscana* Evaluando el porcentaje de eclosión a las 18 h en el caso de las unidades con quistes y la supervivencia a las 48 h para las unidades de nauplios de *A. franciscana* Controles axénicos fueron evaluados simultáneamente durante el experimento.

## **2.7.- Colonización de quistes de *A. franciscana***

Para llevar a cabo el estudio capacidad de colonización y el crecimiento de las cepas probióticas en el agua de eclosión de *A. franciscana* se emplearon las técnicas descritas por Quiroz-Guzman *et al.*, (2013).

## **2.8.- Evaluación *in vivo* durante la incubación de quistes de *A. franciscana***

El efecto de los probióticos sobre la eclosión y supervivencia durante la eclosión de *A. franciscana* se evaluó por cuadruplicado en tubos de 10 mL bajo las condiciones previamente descritas. Cien quistes libres de bacterias se colocaron en tubos con 10 mL de agua de mar estéril y se inocularon con una dosis de 1, 10, 100 y 100  $\mu$ L de las cepas seleccionadas por separado y en mezcla ( $OD_{585}=1$ ). Los tubos fueron mantenidos en un agitador rotatorio a 28° C con luz continua (1500 lux) y el porcentaje de eclosión y supervivencia de los nauplios fue registrado a las 24 h (aproximadamente 12 h post eclosión). Controles axénicos fueron evaluados simultáneamente durante el experimento.

## **2.9.- Efecto de los probióticos en nauplios de *A. franciscana***

Para evaluar la supervivencia de nauplios de *A. franciscana* inoculados con la mezcla de cepas probióticas, se obtuvieron quistes axénicos como se describió previamente colocándolos en unidades experimentales con 100 mL de agua de mar estéril a una densidad de 1 nauplios por mL, las unidades fueron inoculadas por triplicado con 1, 10, 100 y 1000  $\mu$ L de una suspensión de la mezcla de cepas probióticas ajustadas a una densidad óptica de 1 a 585 nm evaluando la supervivencia de cada tratamiento a las 48 h.

## **2.10.- Reducción de *Vibrio* sp. durante la eclosión de *A. franciscana***

El efecto de la mezcla de probióticos sobre la eclosión y supervivencia durante la eclosión de *A. franciscana* se evaluó por cuadruplicado en tubos con 10 mL bajo las condiciones previamente descritas. Cien quistes libres de bacterias se colocaron en tubos con 10 mL de agua de mar estéril y se inocularon con dosis de 1, 10, 100 y 1000  $\mu$ L de la mezcla de probióticos y 100  $\mu$ L de cada uno de los vibrios. Los tubos fueron mantenidos en agitador rotatorio a 28°C con luz continua evaluando el porcentaje de eclosión, supervivencia y reducción de *Vibrio* sp. de los nauplios a las 20 h (aproximadamente 5 horas post eclosión). Controles axénicos fueron evaluados simultáneamente durante el experimento.

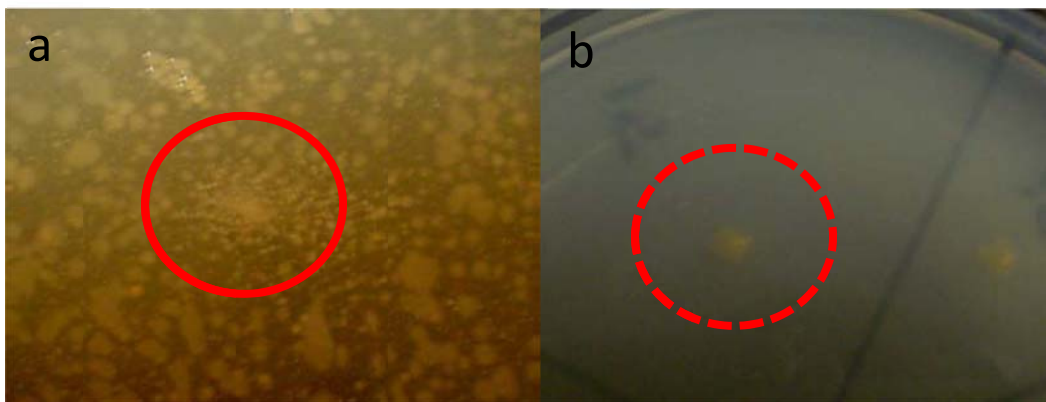
## **2.11.- Bacterias probióticas durante pruebas de reto con en nauplios de *A. franciscana***

Como se describió previamente quistes axénicos se eclosionaron en tubos de vidrio con 100 mL de agua de mar estéril los cuales fueron inoculados con 100  $\mu$ L de la mezcla de probióticos. Ya eclosionados los nauplios fueron colocados en unidades experimentales con 100 mL de agua de mar estéril a una densidad de 1 nauplio por mL, las unidades fueron inoculadas por triplicado con 100  $\mu$ L de una suspensión de *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* ajustadas a una densidad óptica de 1 a 585 nm a las 48 h se registró la reducción de vibrios y la mortandad en cada tratamiento.

### 3. Resultados

#### 3.1.- Producción de sustancias antagónicas

Ninguna de las 37 cepas empleadas durante el presente estudio presentó efecto antagónico sobre *V. parahaemolyticus* o *V. harveyi*. De igual forma mediante esta técnica se observó que no existe efecto antagónico entre bacterias probióticas, lo cual permitió obtener una mezcla entre los probióticos seleccionados (Fig. 7 a y b).



**Figura 7.-** Efecto *in vitro* de las bacterias probióticas sobre *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* (a) sin efecto antagónico; (b) cepas probióticas sin efecto antagónico entre las mismas.

#### 3.2.- Actividad hemolítica de cepas probióticas

De las bacterias probióticas seleccionadas solo las 2 cepas de *B. subtilis* presentaron hemólisis de tipo  $\beta$  (total), mientras que las 2 cepas de *Lactobacillus* presentaron hemólisis  $\beta$  (parcial) y finalmente con las cepas del género *Lactococcus* solo 2 presentaron hemólisis de tipo  $\beta$  (total), 2 presentaron hemólisis tipo  $\alpha$  (total) y 2 presentaron hemólisis de tipo  $\alpha$  (parcial) (Tab. 3).

**Tabla 3.** Prueba de hemólisis de las cepas presuntivas de *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Lactococcus*

Cepa No.	Clave	Hemólisis	
		Total	Parcial
1	UTM 126	$\beta$	
2	ATCC 6051	$\beta$	
3	R8C		$\beta$
4	R34C		$\beta$
5	B10 chica	$\beta$	
6	B10 chica	$\beta$	
7	Be 12 chica	$\beta$	
8	Be 12 grande	$\alpha$	
9	C10 Lta chica	$\alpha$	
10	C10 Lta grande		$\alpha$
11	Cb Lta		$\alpha$

### 3.3.- Pruebas bioquímicas

Las cepas probióticas fueron Gram-positivas; se encontraron morfologías como bacilos con formación de endospora, bacilos cortos y cocos. Todas presentaron la misma reacción a las pruebas bioquímicas siendo negativas únicamente a la prueba de Indol (Tab. 4)

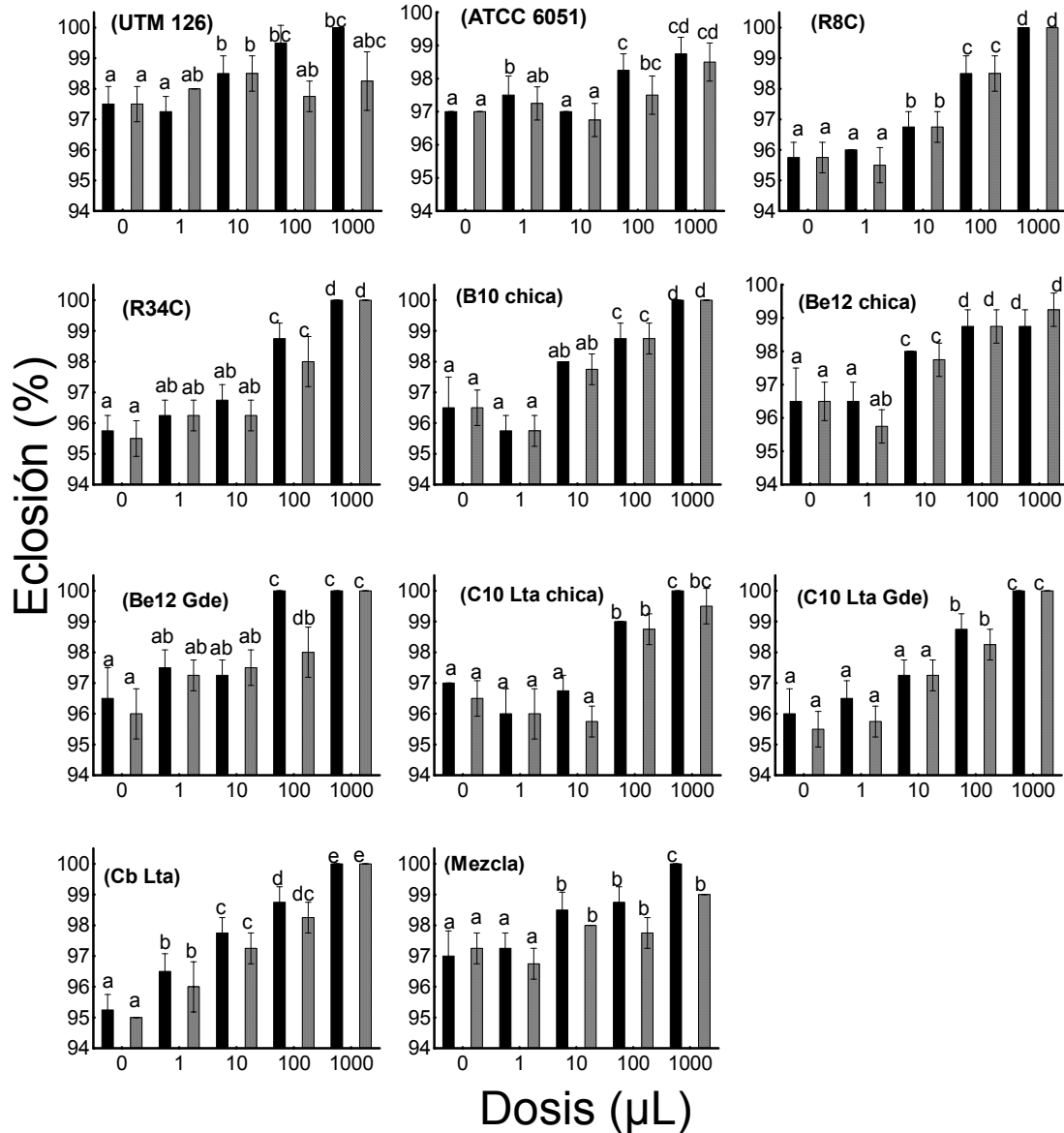


**Tabla 4.-** Caracterización morfológica y bioquímica de las cepas antagónicas aisladas.

<b>Cepa</b>	<b>Tinción de Gram</b>	<b>Forma</b>	<b>Tamaño (µm)</b>
UTM 126	+	Bacilo	1.0x1.0
ATCC 6051	+	Bacilo	1.5x0.9
R8C	+	Bacilo corto	1.2x1.0
R34C	+	Bacilo corto	1.0x1.0
B10 chica	+	Bastones	1.1x0.6
B10 grande	+	Bastones	1.1x0.6
Be 12 chica	+	Bastones	1.0x0.7
Be 12 grande	+	Bastones	1.2x1.0
C10 Lta chica	+	Esféricas pares y en cadena	1.0x0.6
C10 Lta grande	+	Esféricas pares y en cadena	1.3x1.2
Cb Lta	+	Esféricas pares y en cadena	1.0x0.9

### **3.4.- Producción de exotoxinas (ECP's) y su efecto durante la producción de nauplios de *A. franciscana***

Se observó que no hay diferencia significativas ( $p > 0.05$ ) entre los ECP's liberados en ambos medios de cultivo de cada uno de las cepas probióticas como la mezcla, sin embargo durante las pruebas se observó que si hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con las cepas ATCC 6051, R34 C, C10 Lta chica, C10 Lta grande, Cb Lta y Mezcla en la tasa de eclosión con los ECP's de caldo marino obteniendo una tasa de eclosión superior a los tratamientos con ECP's de Agua de eclosión de *A. franciscana* y el control conforme se incrementa la dosis de cada uno de los ECP's de cada tratamiento (Fig. 8).

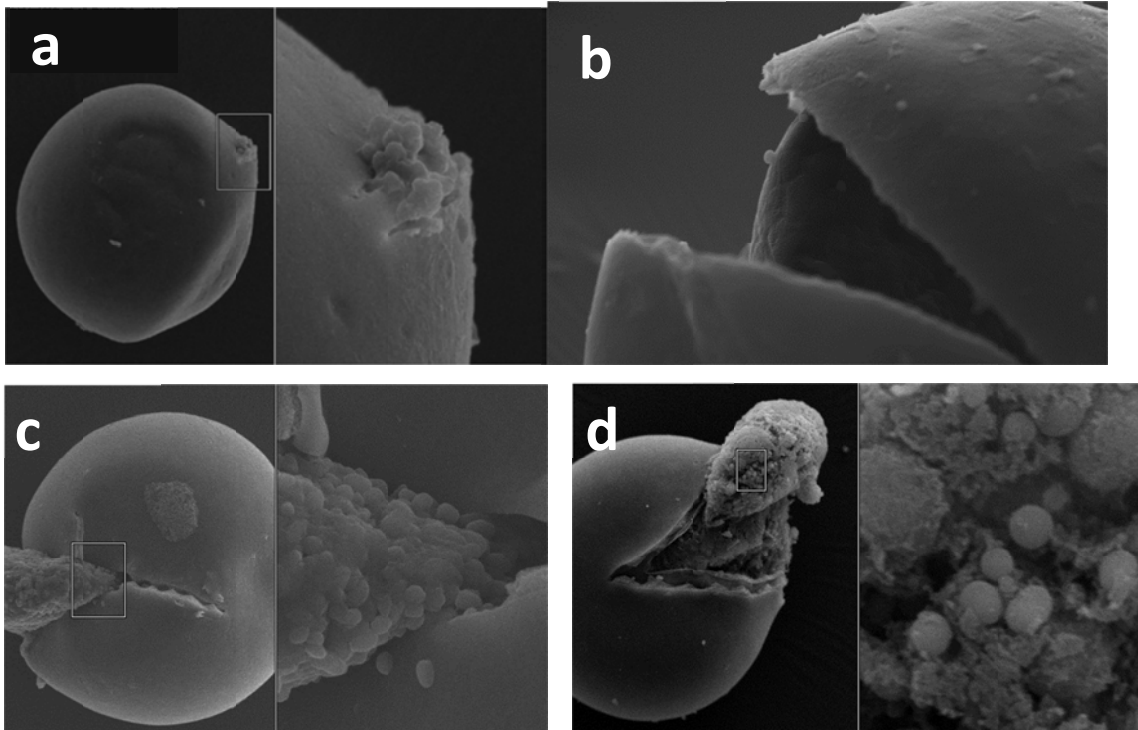


**Figura 8.-** Efecto de los productos extracelulares sobre la eclosión de *A. franciscana* con (■)=Agua de eclosión de *A. franciscana* y (▨)=Caldo Marino de las cepas probióticas donde denominaciones a, b y ab se utilizan para distinguir entre los tratamientos (A es diferente de B pero igual a AB).

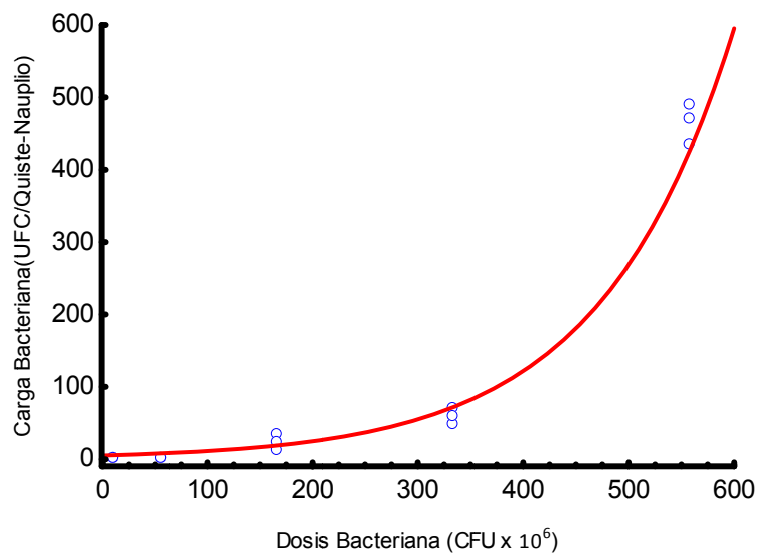
### 3.5.- Colonización de quistes de *A. franciscana*

La adhesión y colonización de cada cepa probiótica y mezcla aparentemente comenzaron en el área de estallamiento (donde se produce la ruptura de la membrana cuticular externa de quistes) (Fig. 9 a, b). Los números máximos observados en los quistes con las cepas de *B. subtilis* fue de  $1 \times 10^6$  CFU·Quiste, de las cepas de *Lactobacillus* fue de  $1 \times 10^7$  CFU·Quiste, de las cepas de *Lactococcus* fue de  $1 \times 10^7$  CFU·Quiste. Al momento de la eclosión, se observó que los nauplios fueron cubiertos con bacterias (Fig 9 c, d).

*A. franciscana* fue rápidamente colonizada por cada probiótico y la mezcla y el número final de bacterias fue directamente correlacionado con el número de bacterias inoculadas UTM 126 (R=0.98), ATCC 6051 (R=0.97), R8C (R=0.98) R34C(R=0.99), B10 chica (R=0.99), Be 12 chica (R=0.99), Be12 grande (R=0.98), C10 Lta chica (R=0.98), C10 Lta grande (R=0.99), Cb Lta (R=0.99) y la Mezcla (R=0.99), (en todos los casos  $P < 0.05$ ). La relación entre el número de bacterias inoculadas (dosis) y el número de bacterias por nauplio fue debidamente descrito usando un modelo exponencial  $Y = a \cdot e^{bx}$  (Fig. 10). Las aparentes diferencias entre las cepas de *B.*, *Lactococcus* y *Lactobacillus* encontradas, es decir, la mayor carga bacteriana fue registrada como 200 UFC por organismo (Apéndice I), sin embargo, la dosis necesaria para llegar a esta carga bacteriana fue diferente entre cepas: las cepas de *Lactobacillus* fue de  $2 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> mientras que Las cepas de *B. subtilis* y *Lactococcus* la mayor dosis requerida fue entre  $1.2$  y  $1.5 \times 10^6$  para alcanzar dicha carga bacteriana.



**Figura 9.-** Colonización de quistes y nauplios de *A. franciscana* en SEM a) Quiste colonizado por bacterias probióticas a las 2 h de la inoculación en la zona de estallido del quiste b) Metanauplio colonizado durante la eclosión escala 1µm, distancia de trabajo 14.5 mm, detector de electrones secundarios.



**Figura 10.-** Colonización de quistes de *A. franciscana* expuestos a diferentes dosis de la mezcla de probióticos.

### 3.6.- Crecimiento de probióticos en el agua de eclosión de *A. franciscana*

Los resultados de las cinéticas de crecimiento mostraron curvas típicas del crecimiento bacteriano en donde se observa un crecimiento significativamente mayor de cada uno de los probióticos y de la mezcla en Agua de Eclosión de *A. franciscana* que en Caldo Marino ( $P < 0.05$ ) (Tabla 5), las cepas de *B. subtilis* alcanzaron una densidad celular alrededor de un 80%, las cepas de *Lactococcus* alcanzaron un 70%, los *Lactobacillus* alcanzaron un 80% y finalmente la mezcla alcanzó un 89% del registrado para caldo marino. El crecimiento en todos los casos sigue una tendencia logística típica con tasas de crecimiento entre 0.122 y 0.198 generaciones por hora y el estado estacionario es alcanzado entre las 6 y 12 horas de incubación. Con un crecimiento máximo de  $2 \times 10^8$  UFC por mL en el caso de *Bacillus*,  $1 \times 10^8$  UFC por mL de *Lactococcus*,  $1 \times 10^8$  UFC por mL de *Lactobacillus* y finalmente la mezcla  $2 \times 10^9$  UFC por mL. En promedio la tasa de crecimiento ( $K$ ) y el máximo crecimiento registrado en CM fue ~ 30% menor al registrado en el AEA respectivamente (Ver Apéndice 3).

**Tabla 5.** Estimación de parámetros de crecimiento de cepas probióticas y mezcla de estas

Cepas	Medio*	Tasa de crecimiento(generación/h)	Parámetros de modelo logístico			Valores de correlación
		<i>K</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>C</i>	<i>R</i>
UTM 126	CM	0.122	0.383	4.217	0.188	989
	AEA	0.182	0.495	8.395	0.194	972
ATCC 6051	CM	0.167	0.317	2.811	0.221	969
	AEA	0.179	0.509	8.217	0.192	981
R 8C	CM	0.172	0.304	2.800	0.272	.983
	AEA	0.195	0.441	7.871	0.220	986
R 34C	CM	0.145	0.246	4.100	0.246	991
	AEA	0.172	0.267	3.342	0.390	.991
B10 chica	CM	0.136	0.168	2.263	0.328	993
	AEA	0.177	0.267	3.878	0.382	997
Be 12 chica	CM	0.136	0.207	3.305	0.286	997
	AEA	0.170	0.269	3.821	0.370	998
Be 12 grande	CM	0.136	0.168	2.263	0.328	993
	AEA	0.179	0.304	2.800	0.272	983

C10 Lta chica	CM	0.182	0.394	7.531	0.243	993
	AEA	0.193	0.495	8.395	0.194	989
C10 Lta grande	CM	0.154	2.609	3.921	2.426	994
	AEA	0.173	2.655	3.587	3.940	992
Cb Lta	CM	0.135	1.673	2.381	3.438	992
	AEA	0.191	2.655	3.587	3.940	992
Mezcla	CM	0.124	1.684	2.263	3.283	993
	AEA	0.198	2.674	3.878	3.822	997

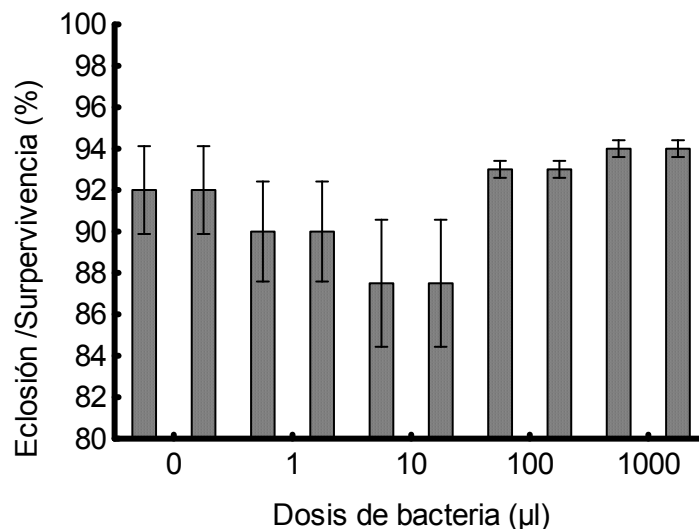
---

CM = Caldo Marino; AEA = Agua de Eclosión de *A. franciscana*

### 3.7.- Efecto de probióticos en la eclosión

En los tratamientos de *A. franciscana* axénico con las bacterias probióticas de estas las supervivencias más altas se observaron en dos etapas de la producción de nauplios, 1) en los quistes y 2) post-eclosión; estos efectos se vieron reflejados a partir de 10–1000  $\mu\text{L}$  (Apéndice 2). Mientras que con la mezcla se logró observar estos efectos a partir de la dosis de 1 $\mu\text{L}$  no se hay deferencia significativa con el control ( $P>0.05$ ) con una supervivencia de 90%, mientras que en las dosis altas se obtuvieron diferencias significativas ( $P<0.05$ ) con el control en la cual se logró obtener una eclosión y supervivencia del 93% a diferencia del control con el cual se obtuvo el 92%.

Con la dosis de 10  $\mu\text{L}$  no se tuvieron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) con el control y con 1  $\mu\text{L}$  de la mezcla sin embargo esta presento una eclosión y supervivencia de 87% la cual es menor al control (Fig.11). De igual forma se observó que los nauplios presentaron un mejor desarrollo con la mezcla de las cepas los cuales alcanzaron el estadio de nauplio II a diferencia del control el cual la mayoría de los organismos que eclosionaron permanecieron en los estadios de sombrilla y metanauplio I.

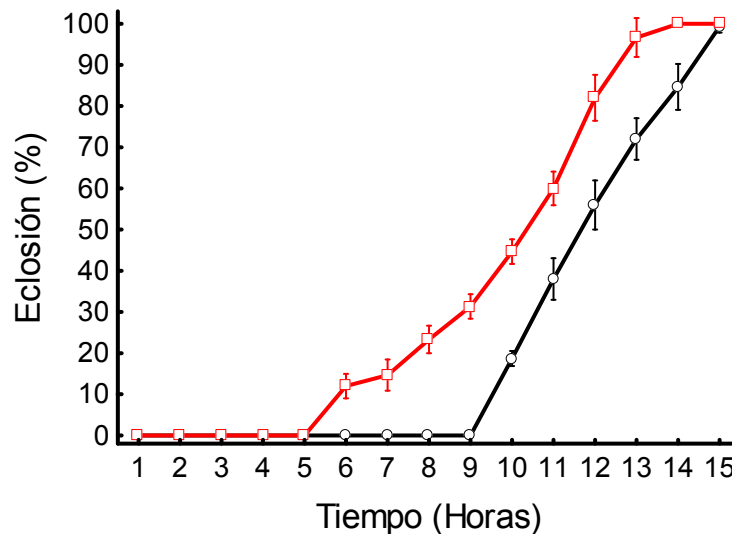


**Figura 11.** Porcentaje de eclosión y supervivencia de quistes infectados con la mezcla de cepas probióticas. Los datos son la media y desviación estándar  $n=4$



### 3.8.- Tiempo de eclosión

Se observó una mejora en los tiempos de eclosión en las unidades con la mezcla la cual inicio a las 6h a diferencia del control axénicos que fue a partir de las 9 h (Fig 12) Así mismo, se observó un mejor desarrollo en los nauplios tratados con la mezcla los cuales al termino del ensayo alcanzaron el estadio de Metanauplio II a diferencia del control que sólo alcanzó los estadios de Metanauplio y Metanauplio I

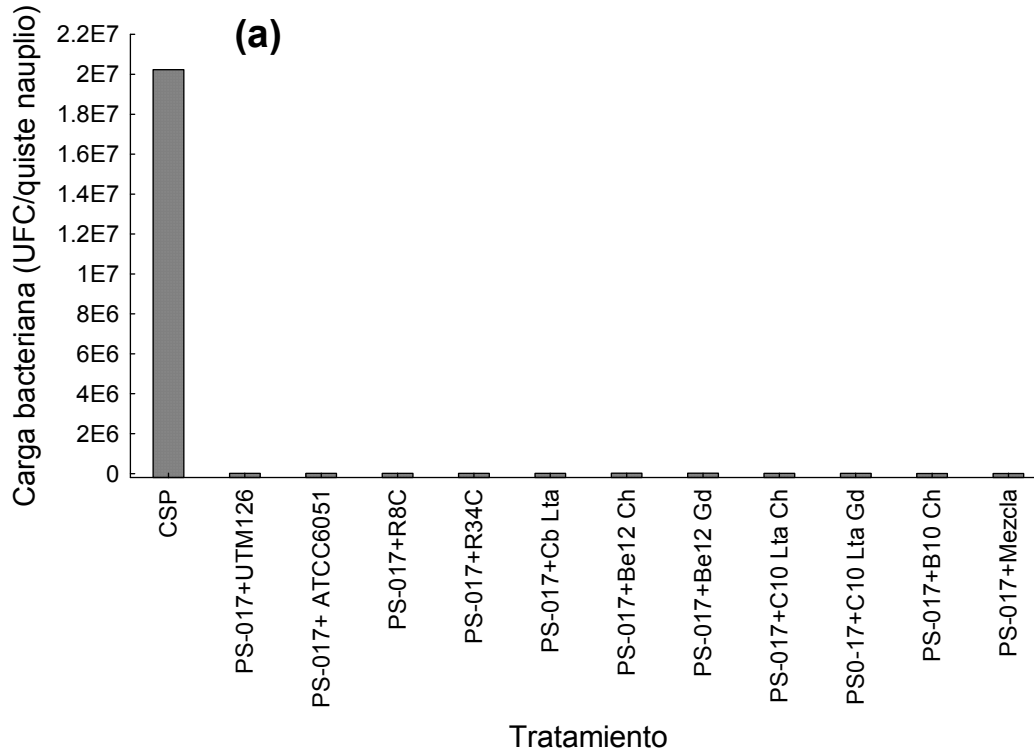


**Figura 12.-** Tiempo de eclosión de quistes inoculados con mezcla de probióticos (□) y sin mezcla (●). Los datos son la media y desviación estándar n=4

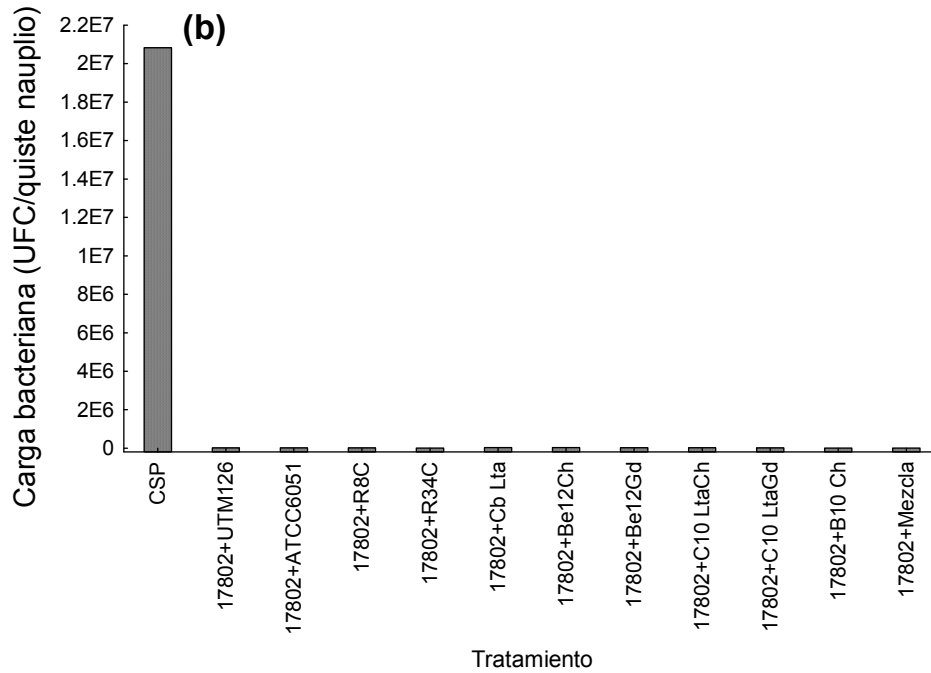
### 3.9.- Reducción de *Vibrio* sp. durante la eclosión de *A. franciscana*

Se observó que el número de *Vibrio* sp. en los eclosionadores sin bacterias probióticas fue de  $1 \times 10^7$  UFC·Quiste en el caso de las cepas de *V. parahaemolyticus* (PS-017 y ATCC 17802) y en el caso de las cepas de *V. harveyi* fue de  $5 \times 10^7$  UFC·Quiste en EC11 mientras que con la cepa ATCC 14126 fue de  $9 \times 10^6$  UFC·Quiste a las 13 horas (aproximadamente 5 horas post eclosión). Mientras que en los tratamientos a los que se agregaron las bacterias probióticas y

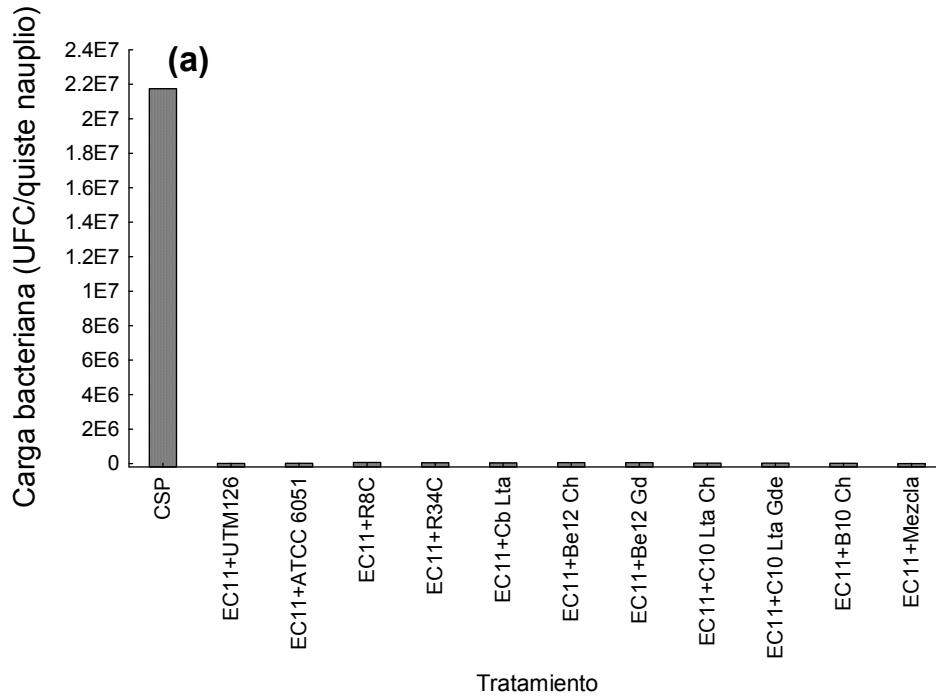
la mezcla inhibieron por completo su colonización *V. parahaemolyticus* (Fig. 13 a, b) y *V. harveyi* (Fig. 14 a, b).



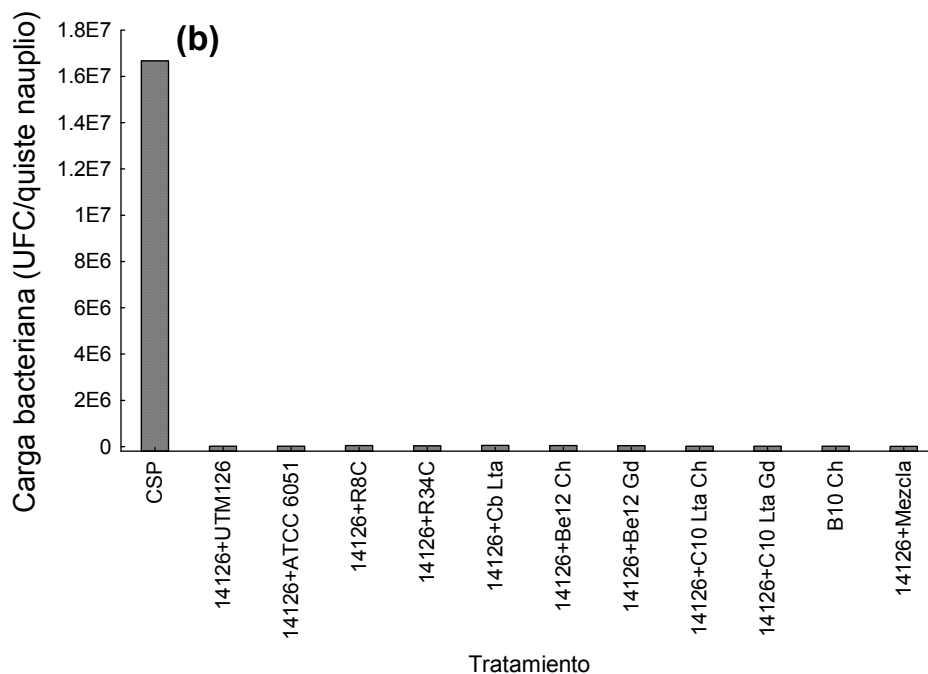
**Figura 13 (a).**- Efecto de cepas probióticas y la mezcla sobre la colonización de PS-017 durante la eclosión de *A. franciscana* control sin probióticos (CSP).



**Figura 13 (b).**- Efecto de cepas probióticas y la mezcla sobre la colonización de ATCC 17802 durante la eclosión de *A. franciscana* control sin probióticos (CSP).



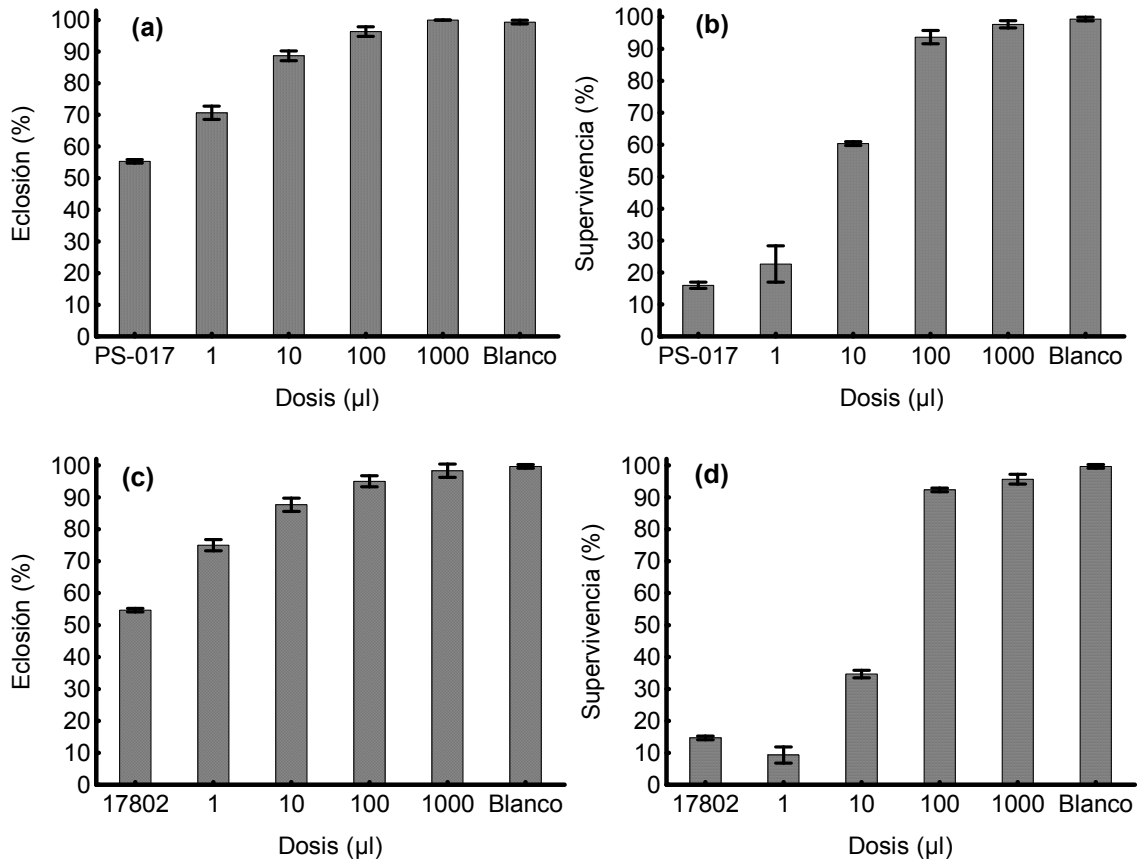
**Figura 14 (a).**- Efecto de cepas probióticas y la mezcla sobre la colonización de EC11 durante la eclosión de *A. franciscana* control sin probióticos (CSP).



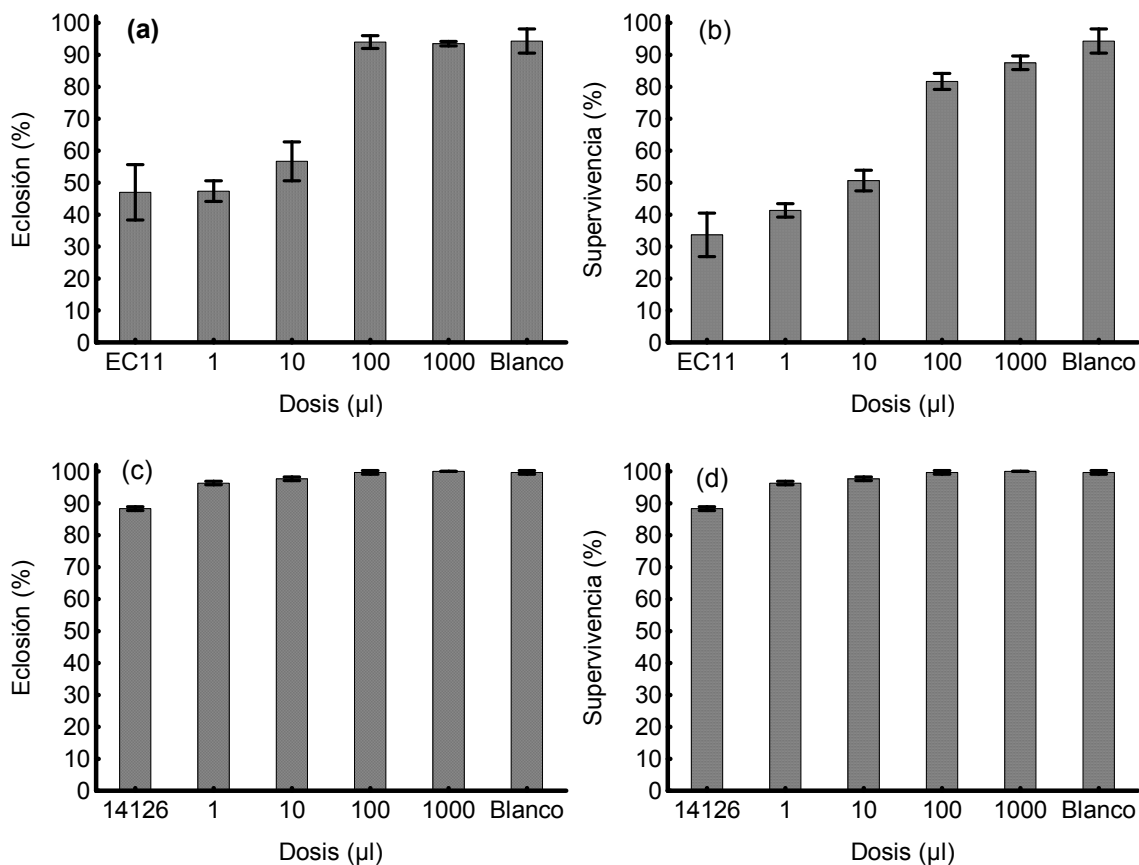
**Figura 14 (b).**- Efecto de cepas probióticas y la mezcla sobre la colonización de ATCC 14126 durante la eclosión de *A. franciscana* control sin probióticos (CSP).

### 3.10.- Probióticos en pruebas de reto con *Vibrio* sp. durante la eclosión

Durante los experimentos con la mezcla de probióticos se observó que su capacidad para reducir la mortalidad por *V. parahaemolyticus* (Fig. 15a-d) y *V. harveyi* (Fig. 15 a-d) depende de la dosis de bacterias usadas. La supervivencia en las concentraciones de 1 y 10  $\mu$ l no fue significativamente diferente del control infectado con *Vibrio* sp. ( $p > 0.05$ ), mientras que las concentraciones de 100 y 1000  $\mu$ L se evitó por completo el efecto adverso de *Vibrio* sp. y no fueron significativamente diferentes del control axénico ( $p > 0.05$ ).



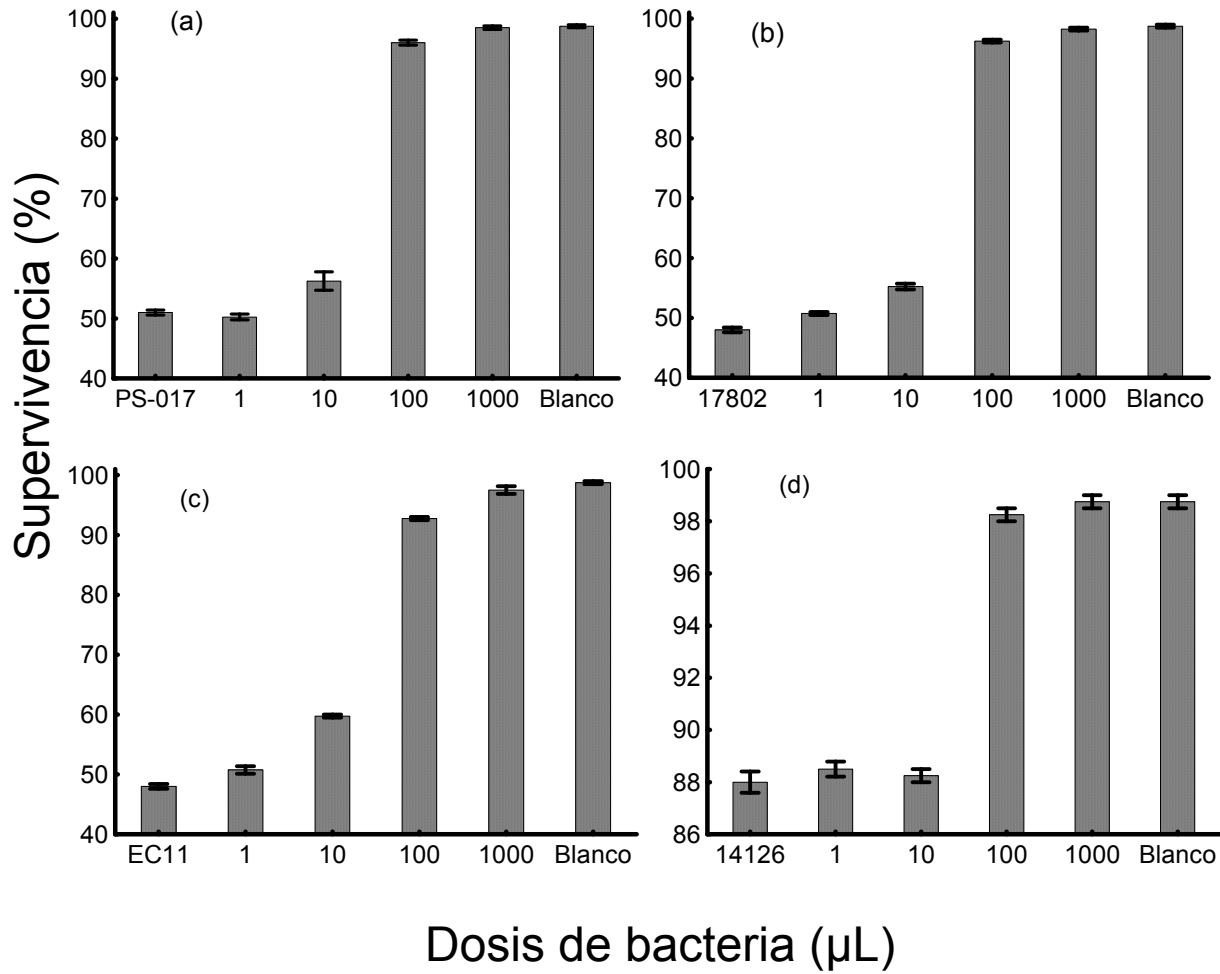
**Figura 15.-** Porcentaje de eclosión y supervivencia de nauplios de *A. franciscana* infectados experimentalmente con  $5.5 \times 10^6$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de (a, b) PS-017, (c, d) ATCC 17802, tratados con diferentes dosis de la mezcla de cepas probióticas. Los datos son la media y desviación estándar  $n=5$



**Figura 16.-** Porcentaje de eclosión y supervivencia de nauplios de *A. franciscana* infectados experimentalmente con  $5.5 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> de (a, b) EC 11, (c, d) ATCC 14126, tratados con diferentes dosis de la mezcla de cepas probióticas. Los datos son la media y desviación estándar n=5

### 3.11.- Bacterias probióticas durante pruebas de reto con nauplios de *A. franciscana*

La tendencia general fue que conforme se incrementó la dosis de la mezcla, el porcentaje de supervivencia fue mayor en los nauplios infectados con *Vibrio* sp. Las supervivencia en las concentraciones 1 y 10 µL no fue significativamente diferente del control infectado con *V. parahaemolyticus* (Fig. 17 a-d) y *V. harveyi* (Fig. 18 a-d) ( $p > 0.05$ ), mientras que las concentraciones de 100 y 1000 µL no fueron significativamente diferentes del control axénico ( $P > 0.05$ ).



**Figura 17.-** Supervivencia de nauplios tratados con mezcla de probióticos durante infecciones experimentales con (a) PS-017, (b) ATCC 17802 (c) EC11 y (d) 14126. Los datos son la media y desviación estándar n=4

#### 4.- Discusión

En los cultivos acuícolas, la comunidad microbiana es fuertemente asociada con el alimento suministrado particularmente, las condiciones en los cultivos de *Artemia* sp. influyen en el número y composición de la comunidad bacteriana asociada en al cultivo (Olsen *et al.*, 2000). Estudios previos han mencionado diversos factores que pueden influir en el crecimiento de *Artemia* sp. en la interacción *Artemia*-bacteria, como son el uso de biomasa bacteriana como alimento (Douillet 1987; Intriago & Jones, 1993; Rico-Mora & Voltolina, 1995; Gorospe *et al.*, 1996; Verschure 1999), biodisponibilidad de nutrientes disueltos mediante producción de biomasa bacteriana (Verschure, 1999). De esta manera, la promoción de una colonización selectiva de cepas probióticas durante la eclosión de *Artemia* sp. parece propiciar una estabilidad en la eclosión y una alternativa para mejorar la calidad sanitaria de *Artemia* sp.

En el presente trabajo se logró una colonización selectiva con cada una de las cepas probadas, ello fue corroborado mediante el uso de métodos microbiológicos tradicionales y microscopia electrónica de barrido (SEM) ya que cada cepa y la mezcla se adhieren a los quistes durante la incubación (1 h posterior a la inoculación); además, aparentemente dicho consorcio tiene la capacidad de penetrar hasta el embrión y colonizar su superficie antes de la eclosión al igual que los patógenos probados. Por lo que el modelo obtenido difiere por mucho de los modelos típicos de enriquecimiento *v. gr.* Carmona-Pérez (2006) quien observo una mejora en el desarrollo de nauplios de *A. franciscana* al adicionar alimento fermentado con la cepa *Exigobacterium* sp. Pro80 obteniendo organismos en etapa de postmetanauplio IV y con los estudios de Orozco-Medina (2001) e Hipólito-Morales (2005) quienes reportan un desarrollo larval avanzado de *Artemia* sp. (postmetanauplio I) utilizando *Exigobacterium* sp. *Microbacterium* sp. y la levadura de pan *Saccharomyces cerevisiae*. Mientras que en el modelo obtenido en el presente estudio demuestra la capacidad de colonización y exclusión competitiva *in vivo* de patógenos oportunistas durante la eclosión de *A. franciscana*. Lo cual sustenta una mayor producción de nauplios ya que estos



alcanzan estadios de metanauplio y post-metanauplios enriquecidos con el consorcio de cepas probióticas.

Por otra parte, se ha reportado que las bacterias ingeridas que siguen siendo viables, complementan los requerimientos nutricionales de los invertebrados (Barlocher 1980; Musgrove, 1988; Wainwright & Mann, 1982). Muchas bacterias presentan mecanismos antagónicos que les permiten subsistir en determinados ecosistemas. Esta propiedad es para varios investigadores uno de los principales criterios para la selección de bacterias probióticas. Dopazo *et al.*, (1988), utilizando medios líquidos, observaron que en una bacteria marina cepa FP6 inhibió el crecimiento de cepas patógenas como *Aeromonas hydrophila* B-32, *Aeromona solmonicida* ATCC 14174 y *V. anguillarum* R-82, por la producción de una sustancia antibiótica. Lo cual difiere con los resultados obtenidos durante el presente estudio en el cual, no se observó efecto antagónico *in vitro* por parte de las cepas seleccionadas sobre *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*. Sin embargo, durante las pruebas *in vivo*, se observó que al momento de agregar cada cepa y la mezcla durante la producción de *A. franciscana*, estas si presentaron una actividad inhibitoria.

Otro aspecto importante para la selección probióticos es evitar aquellas cepas que puedan causar daños en los organismos cultivados. En el presente estudio se usó como criterio la producción de compuestos extracelulares (ECP's) tóxicos, ya que estos han sido reportados como factores de virulencia en un espectro muy amplio de organismos marinos (Fukasawa *et al.*, 1988; Austin *et al.*, 2005). Entre los ECP's indeseables podemos encontrar exoenzimas y ecotoxinas. En el presente estudio se observó que estos productos no tuvieron efectos negativos sobre la producción de nauplios de *A. franciscana*. Igualmente Orozco-Medina (2001) obtuvo una alta actividad de ECP's liberados por las bacterias *Microbacterium* sp. cepa (L y cepa 8R) empleadas en nauplios de *Artemia* sp. obteniendo una supervivencia del 89% de los nauplios durante la aplicación de los ECP's.

Con la mezcla de cepas probióticas se obtuvo una eclosión y supervivencia de 90% a una densidad de  $7 \times 10^2$  UFC mL<sup>-1</sup>. Siendo similar a lo reportado por Coutteau *et al.*, (1990) observaron que en cultivos axénicos de *Artemia* sp. con levadura de pan esterilizada por autoclave a los 4 días de cultivo, con 90.3% de supervivencia, sin embargo a los 8 días de cultivo éstos autores reportaron una caída drástica en la supervivencia hasta 36.3%, mientras que Intriago y Jones (1993) reportan valores de 97% de supervivencia con *Flexibacter* cepa Inp 3 y el alga *Rhodomonas* sp. pero mayor en comparación al porcentaje obtenido por Verschure *et al.*(2000b) quienes lograron un 80% de supervivencia en cultivos de *Artemia* sp. gnotobiotica infectada experimentalmente con *V. proteolyticus* (CW8T2). Ellos emplearon comunidades bacterianas, distinguiendo dos categorías de protección en la supervivencia de *Artemia* sp., bacterias de protección total con la cual obtuvieron supervivencias del 84% y bacterias con protección parcial, obteniendo una supervivencia de 76%. Mientras que en el presente trabajo se obtuvo una protección total por parte del consorcio ya que estos en estadios naupliares redujeron por completo la carga bacteriana de *Vibrio* sp. incrementando la supervivencia hasta en un 100% en las unidades experimentales. De igual forma contribuyeron con el incremento de 85% a 100% en la tasa de eclosión además de reducir el tiempo de eclosión de 13 h a 6 h.

Por otra parte, Maeda *et al.* (1997) mencionan que ecosistemas acuícolas no pueden soportar una concentración mayor a  $10^6$  bacterias mL<sup>-1</sup>. Gómez-Gil (1998), determinó que la inoculación en cultivos larvales de camarones peneidos con altas concentraciones de bacterias ( $10^7$  bacteria mL<sup>-1</sup>) ocasionalmente resulta en niveles de concentración mayores a los obtenidos al tiempo de la inoculación; por el contrario, decrecieron a las 72 h. Gómez-Gil *et al.*, (1998) quienes obtuvieron una máxima concentración de bacterias bien capsuladas por nauplios de  $4.77 \times 10^3$  UFC nauplio<sup>-1</sup> de la bacteria *V. parahaemolyticus* HL57 inoculada con una concentración de  $1.5 \times 10^8$  de UFC mL<sup>-1</sup>. En el presente estudio se aplicaron concentraciones mayores de la mezcla de cepas probióticas en cultivos gnotobioticos las cuales fueron de  $1 \times 10^7$ -  $4 \times 10^8$  bacteria mL<sup>-1</sup> obteniendo una concentración final bacteriana de  $5 \times 10^7$  UFC nauplio<sup>-1</sup> de nauplios de *Artemia* sp.

permitiendo así de esta manera obtener un alimento con un nivel alto de colonización de cepas probióticas controlando así de esta manera la microbiota patógena oportunista de *Artemia* sp.

## Capítulo III

---

Desarrollo de una mezcla de vibriófagos para el control de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio harveyi* durante la producción de nauplios de *Artemia franciscana*

## Resumen

En el presente capítulo se analiza el uso de la terapia con fagos durante la producción de nauplios de *Artemia franciscana*, observando su efecto sobre la eclosión y supervivencia de nauplios infectados experimentalmente con *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio harveyi*. Para esto se seleccionaron 5 fagos de la colección del CICIMAR-IPN denominados VPMS1, A3S y Aie para *Vibrio parahaemolyticus* y F8 y F12 para *Vibrio harveyi*. Para ello, durante las pruebas de reto, la aplicación de los fagos individuales provocó una reducción de los patógenos, lo cual indujo el aumento significativo de la supervivencia ( $P < 0.05$ ) y mejoras en la eclosión a partir de una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1. Se determinó que los fagos redujeron el tiempo de eclosión de 13 h a 6 h y que a partir de ese momento ya se tenía un control sobre ambos vibrios. Ya en mezcla los vibriófagos presentaron un efecto lítico sobre los patógenos, generando los siguientes valores de supervivencia y eclosión: 85 y 89 % en las muestras infectadas con *Vibrio harveyi* y 89 y 90% en las muestras infectadas con *Vibrio parahaemolyticus*, respectivamente, además de que a diferencia de los controles infectados experimentalmente los nauplios no presentaron daño alguno en las extremidades además de que no se observó nada errático en cada uno de los tratamientos con la mezcla de vibriófagos.

**Palabras clave:** Vibriófagos, *Vibrio* quistes de *Artemia*, nauplio de *Artemia*

## 1. Introducción

La aplicación terapéutica con bacteriófagos para controlar las infecciones bacterianas ha despertado interés recientemente como una posible alternativa a la terapia con antibióticos tradicional. Esto debido a la aparición de infecciones bacterianas resistentes a múltiples fármacos que ha provocado un resurgimiento de la terapia de fagos (Thacker, 2003), proporcionando nuevos resultados teóricos y experimentales (Bull *et al.*, 2002; Danelishvili *et al.*, 2006; Kasman *et al.*, 2002; Levin & Bull, 1996; Matsuda *et al.*, 2005; Merrill *et al.*, 1996; Payne & Jansen, 2001; Payne *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 1987; Wagenaar *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2007; Weld *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2005).

Aunque la fagoterapia y la terapia antibiótica comparten el objetivo común de erradicar las bacterias infectantes rápidamente, varias características distinguen a estos enfoques. Los fagos se replican a entidades biológicas de crecimiento exponencial de la población, mientras que los antibióticos no pueden replicarse *in vivo*. Los fagos también tienden a infectar un intervalo relativamente limitado de agentes bacterianos, a diferencia del amplio espectro obtenido con la mayoría de los antibióticos (Payne *et al.*, 2000). Estos y otros atributos de rendimiento presentan unas posibles ventajas y desventajas de los tratamientos que emplean los fagos o antibióticos. Por ejemplo, el espectro de lisis por el fago permite la eliminación selectiva de las bacterias infecciosas y sin alterar el resto de la microbiota del portador. Sin embargo, se requiere una gama amplia de fagos para la identificación de la bacteria infecciosa u otro es el requerimiento de una mezcla de fagos que pueda potencializar el efecto permitiendo así ser una alternativa absoluta para el control de patógenos oportunistas o resistentes a los antibióticos (Schoolnik *et al.*, 2004). Cabe mencionar que para lograr este control, hay varias consideraciones importantes con respecto a aplicación. En primer lugar, es absolutamente esencial saber exactamente qué especie bacteriana es la causante agente de la infección. Antes del tratamiento, el patógeno o el agente infeccioso tienen que ser identificado y comprobado *in vitro* frente a una biblioteca de fagos para seleccionar el grupo de fagos más eficaz para aplicación terapéutica (Watanabe *et al.*, 2007; Weld *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2005).

Con base a esto la selección de los componentes de la mezcla de fagos para la preparación terapéutica es un procedimiento clave para prevenir la aparición de resistencia bacteriana a los fagos en algunos casos, los fagos deben exhibir un ciclo de infección lítica estrictamente durante la propagación en la bacteria portadora (Guttman *et al.*, 2005). La posible transferencia de genes virulentos no deseados, a través de la lisogenia o transducción debe ser excluido. La observancia de la resistencia bacteriana a los fagos tiene una frecuencia significativamente más baja ( $10^{-7}$  a  $10^{-8}$  por célula), en comparación con la de la resistencia a los antibióticos (Calendar & Inman, 2005). Sin embargo, la aparición de mutantes resistentes a los fagos es posible. Un ataque preventivo contra mutantes de bacterias resistentes a los fagos es la construcción de mezclas de fagos. Como los receptores de fagos en la pared celular son muy específicos para diferentes fagos, es prácticamente imposible para las bacterias que mutan de forma que debería ser resistente a la mezcla que contiene varios fagos diferentes. Por lo tanto, la construcción de la mezcla es esencial para lograr la máxima eficacia de la terapia de fagos.

En acuicultura, Shivu *et al.*, (2007), reportaron a seis fagos de *Vibrio harveyi* que tienen un amplio espectro lítico por lo que proponen su uso para el control de dicha bacteria en camaronicultura. Así mismo, 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. Phumkhachorn & Rattanachaikunsopon (2010), aislaron un bacteriófago a partir de camarones infectados y caracterizaron su capacidad de lisar cepas patógenas de *V. harveyi*. No obstante, se han reportado otras especies de interés en los sistemas de cultivo de camarón, que también generan grandes pérdidas (Chyntyanya *et al.*, 2001). Esto conduce a la necesidad de mezclas de fagos que actúen sobre diferentes especies bacterianas (Nakai, 2010).

## **2. Material y métodos**

### **2.1.- Bacteriófagos**

Los bacteriófagos líticos de *V. parahaemolyticus* empleados en el presente estudio fueron aisladas previamente de cultivos larvarios de camarón blanco (A3s, Aie) (Makarov, 2008), de hepatopáncreas de *Megapitaria squalida* (VPMS1) (Martínez-Díaz & Hipólito-Morales 2013). Para *V. harveyi* los bacteriófagos líticos empleados fueron aislados de la ensenada de La Paz (F8, F12) (Quiroz-Guzmán, 2005).

### **2.2.- Bacterias**

La bacteria patógena EC11 empleada en el presente estudio fueron aisladas durante brotes de vibriosis en cultivos larvarios de camarón de Ecuador (Balcázar & Rojas-Luna, 2007) e identificadas por secuenciación del gen 16S rRNA como *V. harveyi* (Acceso Gene Bank KC740490). Siguiendo las condiciones previas descritas por Balcázar *et al.* (2010). Además, se utilizó una cepa de referencia *V. parahaemolyticus* ATCC 17802. Todas las cepas fueron mantenidas a -80° C en glicerol al 50% y cultivadas en placas de agar marino, incubadas a 35° C y cosechadas a las 24 h. Para los experimentos, cada cepa se ajustó en agua de mar a una densidad óptica de 1 a 585 nm ( $DO_{585} = 1$ ) usando un espectrofotómetro (Spectroquant 1117, Merck) y el número de unidades formadoras de colonias (UFC) se determinó mediante diluciones decimales en tubos con NaCl al 2.5% en placas de agar marino.



### **2.3.- Selección de vibriófagos**

Para determinar el tipo de bacteriófagos a emplear durante el presente estudio se analizaron las siguientes condiciones **a)** actividad lítica específica contra cada patógeno empleado; **b)** no dejar bacterias resistentes **c)** lisis en agua de eclosión de *Artemia franciscana*.

### **2.4 Actividad lítica**

Para la determinación de la actividad lítica se utilizó el procedimiento descrito por Carlson (2004), que consiste en el enriquecimiento en caldo marino estéril previamente inoculado con la bacteria de interés al cual se le agregaron 100  $\mu$ L de cada suspensión de fago y se incubó por 24 horas a 30°C. A partir de este cultivo y con ayuda de una jeringa estéril se tomaron 10 mL, mismos que fueron depositados en tubos de vidrio estéril; estos se centrifugaron a 3,800 rpm a 4°C durante 30 minutos para concentrar la biomasa bacteriana; el sobrenadante se decantó en tubos de vidrio estériles y posteriormente se realizaron las pruebas de puntos la cual consiste en colocar una gota de muestra filtrada sobre una cepa de 24 horas de las bacterias prueba en agar marino para detectar la actividad lítica mediante la presencia de una zona de transparencia en área de inóculo.

### **2.5.- Efecto de fagos sobre bacterias resistentes**

Para determinar si los fagos seleccionados para la mezcla presentaban efecto sobre las bacterias resistentes que dejara cada fago, se realizaron pruebas cruzadas. Así, a partir de cultivos de 24 horas de cada una de las bacterias resistentes de *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* se realizaron cultivos en placas de agar marino a la cual se agregaron 13  $\mu$ L de la suspensión de fagos para determinar si los fagos seleccionados presentaron actividad lítica sobre las bacterias resistentes mediante la presencia de una zona de transparencia en área de inóculo.

## **2.6.- Cinética de lisis en agua de eclosión de *A. franciscana* y Caldo Marino.**

La capacidad de los fagos para generar la lisis bacteriana en el agua de eclosión de *A. franciscana* se evaluó de la siguiente manera: los quistes desinfectados se eclosionaron en unidades experimentales con 100 mL de agua de mar natural estéril a una densidad de 0.23 gr por mL, con aireación continua (pasada por un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$ ). Ya eclosionados (aproximadamente a las 18 horas), se extrajeron los nauplios de manera estéril recuperando el agua en tubos limpios y estériles a razón de 10mL por tubo. Posteriormente de un cultivo de 24 h de cada uno de los patógenos se ajustaron a una D.O. de 1 a 560 nm agregando a cada unidad 600 $\mu\text{L}$  de la suspensión obteniendo una D.O inicial de 0.2 y 10  $\mu\text{L}$  de cada suspensión de fago incubándolos a 30°C con agitación continua. Cada tratamiento se evaluó por triplicado y como control de cada tratamiento se puso a crecer en tubos con caldo marino y agua de mar artificial en las mismas condiciones. El efecto de cada fago sobre las bacterias fue registrado por 24 h como el decremento en absorbancia a 585 nm.

## **2.7.- Efecto de los fagos, en pruebas de reto con *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* durante la eclosión de quistes de *A. franciscana***

El efecto de los fagos sobre la eclosión y supervivencia durante la eclosión de *A. franciscana* se evaluó por cuadruplicado en tubos con 10 mL bajo las condiciones previamente descritas. 30 quistes libres de bacterias se colocaron en tubos con 10 mL de agua de mar estéril y se inocularon con un MOI de 0.1, 1, 10 y 100 de los fagos y 100  $\mu\text{L}$  de cada uno de los vibrios. Los tubos fueron mantenidos en agitador rotatorio a 28°C con luz continua y el porcentaje de eclosión y supervivencia de los nauplios fue registrado a las 24 h (aproximadamente 12 horas post eclosión). Así mismo se determinó la reducción de UFC en placas con agar marino, las cuales se incubaron durante 24 h a 35°C. Controles axénicos y con fagos fueron evaluados simultáneamente durante el experimento.

## **2.8.- Pruebas de reto con *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* en nauplios inoculados con fagos**

Nauplios axénicos (obtenidos como se describe en el capítulo 1) fueron colocados en unidades experimentales con 100 mL de agua de mar estéril a una densidad de 1 nauplio por mL, las unidades fueron inoculadas por cuadruplicado con 100 µL de una suspensión de *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* ajustadas a una densidad óptica de 1 a 585 nm y con un MOI de 0.1, 1, 10 y 100 de los fagos registrando a las 48 h la mortandad en cada tratamiento.

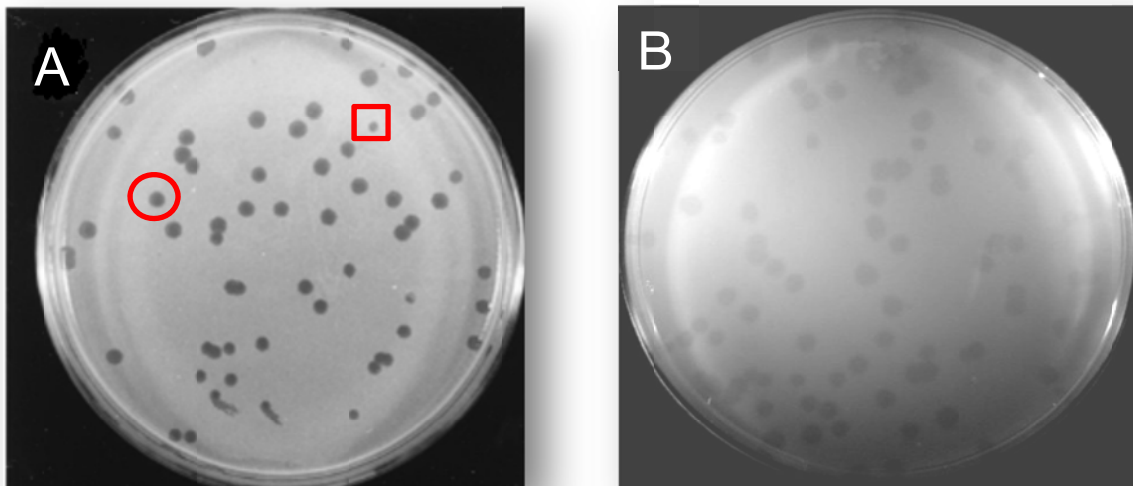
## **2.9.- Efecto de la mezcla fagos, en pruebas de reto con *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* durante la eclosión de *Artemia***

Para la realización de estas pruebas se utilizaron las técnicas descritas por Quiroz-Guzmán *et al.*, (2013) en las que se determino por cuadruplicado el efecto de la mezcla de vibriófagos en tubos con 10 mL de agua de mar natural esteril a una densidad de 30 quistes determinando la tasa de eclosión y supervivencia post-eclosión a las 24 h del experimento.

## 4.0 Resultados

### 4.1 Actividad lítica

Mediante este método se logró observar la actividad lítica sobre *V. parahaemolyticus* (cepas PS-017 y 17802) y *V. harveyi* (cepas EC11 y 14126) además de observarse que los vibriófagos VPMS 1 y A3S presentaron dos tipos de placas por lo que se tuvo que realizar una purificación de estos; mientras que los vibriófagos Aie, F8 y F12 solo presentaron un solo morfotipo de placa (Fig.18 A, B).



**Figura 18.** Placa de lisis de vibriófagos: (A) placa con dos morfotipos de lisis de VPMS1 en *V. parahaemolyticus* y (B) placa con un solo morfotipo de lisis en *V. harveyi*.

### 4.2 Bacterias resistentes

Durante las pruebas cruzadas con *V. parahaemolyticus* se observaron colonias resistentes al efecto lítico de los vibriófagos VPMS1p, VPMS1g, A3Sp, A3sg y Aie durante el primer y segundo aislamiento de colonias resistentes (Tablas 6 a, b y c). En el caso de las pruebas cruzadas con *V. harveyi* sólo se observaron colonias

resistentes al efecto de los vibriófagos F8 y F12 durante el primer aislamiento (Tabla 7 a y b). Con esto se demuestra la capacidad de la mezcla de fagos para reducir la presencia de colonias resistentes en los cultivos.

**Tabla 6a.** Características generales de las bacterias con resistencia a los fagos de *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*.

FAGO	BACTERIA	Morfología colonial (Borde, Color, Brillo, Textura)
VPMS1 P	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Redonda, beige, sin brillo, sólida
VPMS1 G	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Fusiforme, beige, con brillo, sólida
A3sP	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Irregular, beige, con brillo, sólida
A3sG	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Irregular, beige, con brillo, sólida
Aie	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Fusiforme, beige, con brillo, sólida
F8	<i>Vibrio harveyi</i>	Redonda, beige, sin brillo, sólida
F12	<i>Vibrio harveyi</i>	Fusiforme, beige, con brillo, sólida

**Tabla 6b.** Efecto lítico de los vibriófagos sobre bacterias resistentes de *V. parahaemolyticus* – Primer aislamiento.

Vibriófago	Bacterias resistentes al vibriófago				
	VPMS 1 P	VPMS1 G	A3S P	A3S G	Aie
VPMS1 P					+
VPMS 1 G	+				+
A3S P	+	+		+	+
A3S G		+	+		+
Aie		+			

+ = Efecto lítico sobre bacteria resistente

**Tabla 6c.** Efecto de los vibriófagos sobre bacterias resistentes de *V. parahaemolyticus* – Segundo aislamiento

Vibriófago	Bacterias resistentes al vibriófago				
	VPMS 1 P	VPMS 1 G	A3s P	A3s G	Aie
VPMS 1 P	+	+	+	+	
VPMS 1 G	+	+		+	
A3S P	+		+	+	
A3S G	+	+	+	+	
Aie	+	+	+	+	+

+ = Efecto lítico sobre bacteria resistente

**Tabla 7a.** Efecto de los vibriófagos sobre bacterias resistentes de *V. harveyi* – Primer aislamiento

Vibriófagos	Bacteria Resistente	
	F8	F12
F8		+
F12	+	

+ = Efecto lítico sobre bacteria resistente

**Tabla 7b.** Efecto de los vibriófagos sobre bacterias resistentes de *V. harveyi* – Segundo aislamiento

Vibriófagos	Bacterias Resistentes	
	F8	F12
F8	+	+
F12	+	+

+ = Efecto lítico sobre bacteria resistente

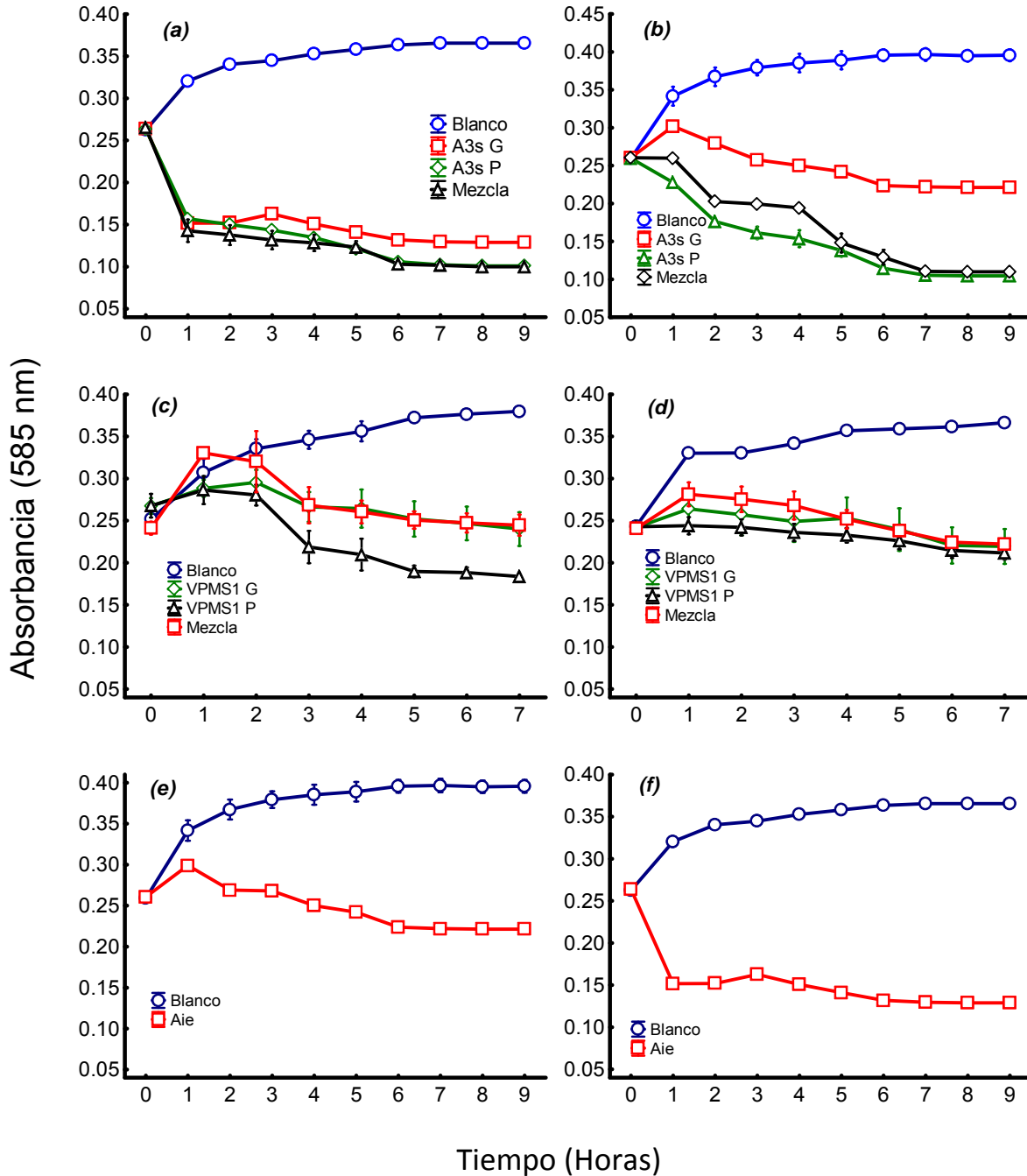
#### **4.3.- Cinética de lisis en agua de eclosión de *A. franciscana* y Caldo Marino.**

Durante el análisis de efecto lítico de los vibriófagos sobre las cepas de *V. parahemolyticus* (PS-017 ATCC17802) se observó que el fago A3S G presentó un mayor efecto lítico en el medio de agua de eclosión de *A. franciscana*, mientras que en caldo marino se redujo la actividad lítica; en el caso del A3S P y la mezcla de ambos fagos presentaron un efecto lítico en ambos medios, sin embargo dicho efecto hace suponer que fue debido a la presencia del fago A3S P, ya que éste presentó un mayor efecto de lisis sobre *Vibrio* sp. a las 12 h que duró el experimento. Por otra parte el vibriófago VPMS1 P y G y la mezcla de estos no presentaron diferencias en el efecto lítico en el agua de eclosión de *A. franciscana* sin embargo en caldo marino se observó que VPMS1 P tiene un mayor efecto lítico sobre las células bacterianas (Fig. 19).

Con el vibriófago Aie se observó que este de igual forma presenta un mayor efecto lítico en el agua de eclosión de *A. franciscana* en comparación con el caldo marino a las 12h que duró el experimento (Fig. 19).

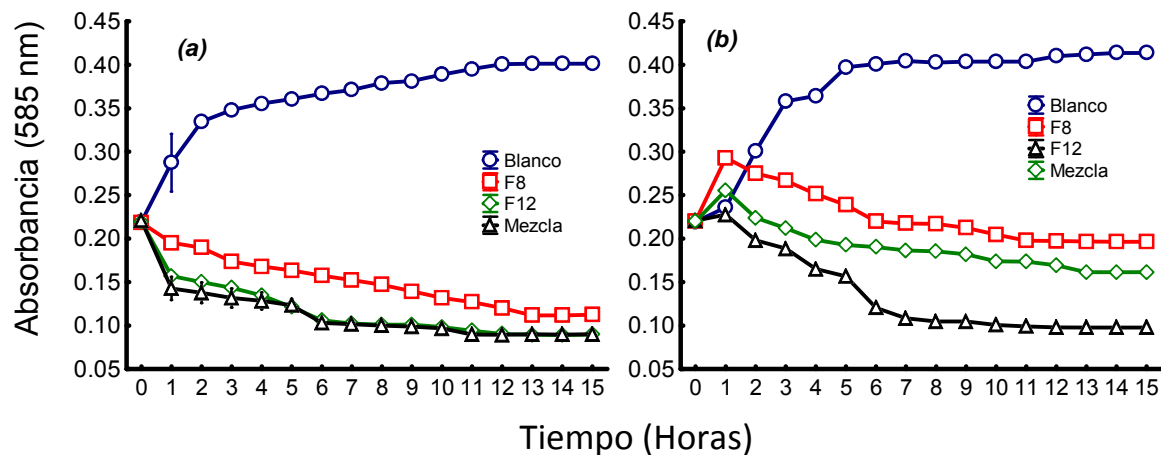
En el caso del efecto lítico sobre la cepa de *V. harveyi* (EC11), se observó que los vibriófagos F8 y F12 presentaron un mayor efecto lítico en el agua de eclosión de *A. franciscana*, notándose un efecto mayor por parte F12 y la mezcla, lo cual hace suponer que el efecto observado con la mezcla es causado por F12, ya que no se observaron diferencias en la lisis.

En el tratamiento con caldo marino se observa la misma tendencia de lisis que en el agua de eclosión de *A. franciscana* por parte del vibriófago F12 en comparación con F8; sin embargo aquí el efecto de la mezcla es mayor incluso que la causada por F12 (Fig. 20).



**Figura 19.** Cinética de lisis de los vibriófagos de *V. parahaemolyticus* en agua de eclosión de *A. franciscana* (a, c y e) y caldos marinos (b, d y f) los puntos representan la media  $\pm$  SD n=4



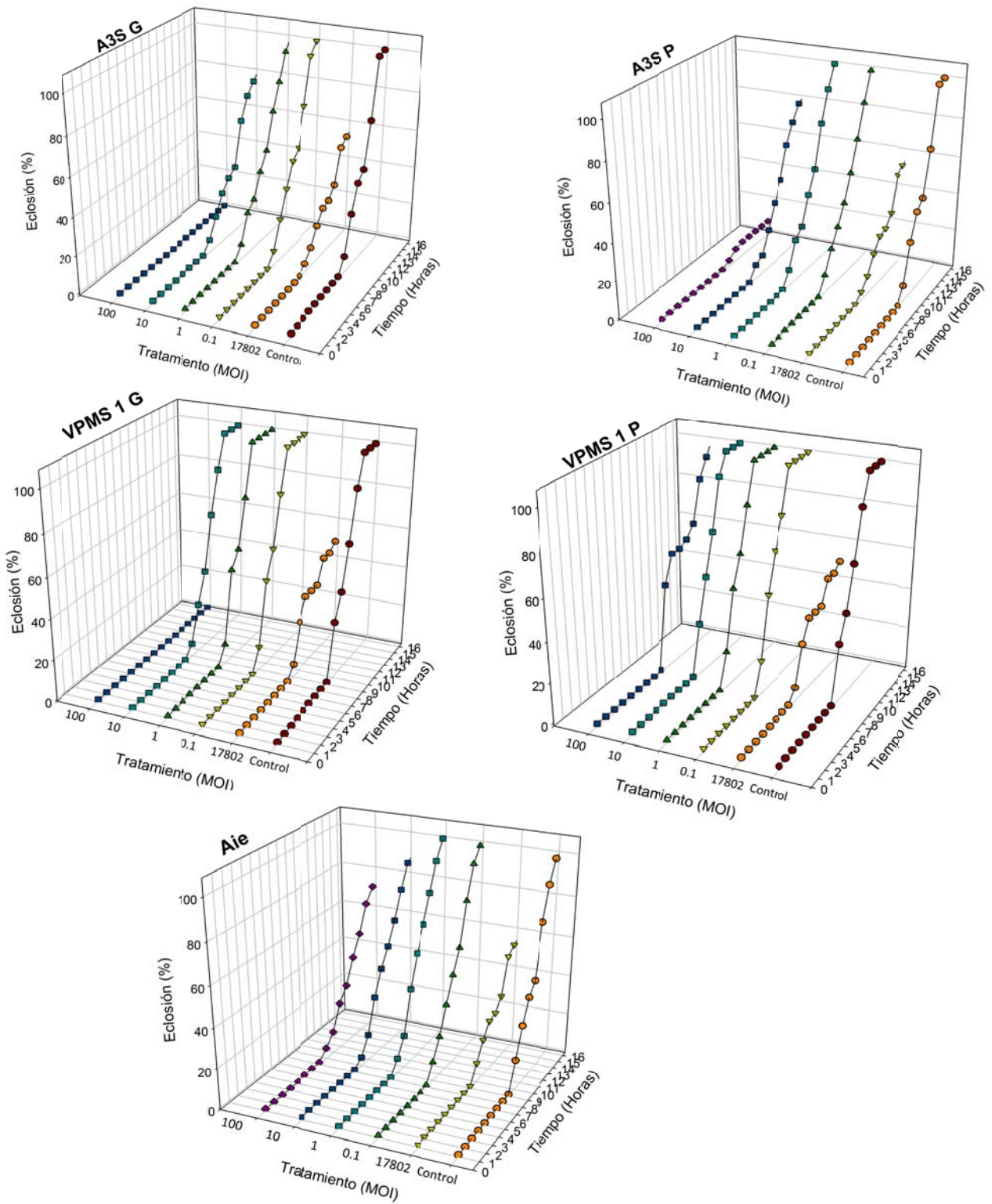


**Figura 20.** Cinética de lisis de los vibriófagos de *V. harveyi* en agua de eclosión de *A. franciscana* (a) y caldo marino (b) los puntos representan la media  $\pm$  SD n=4

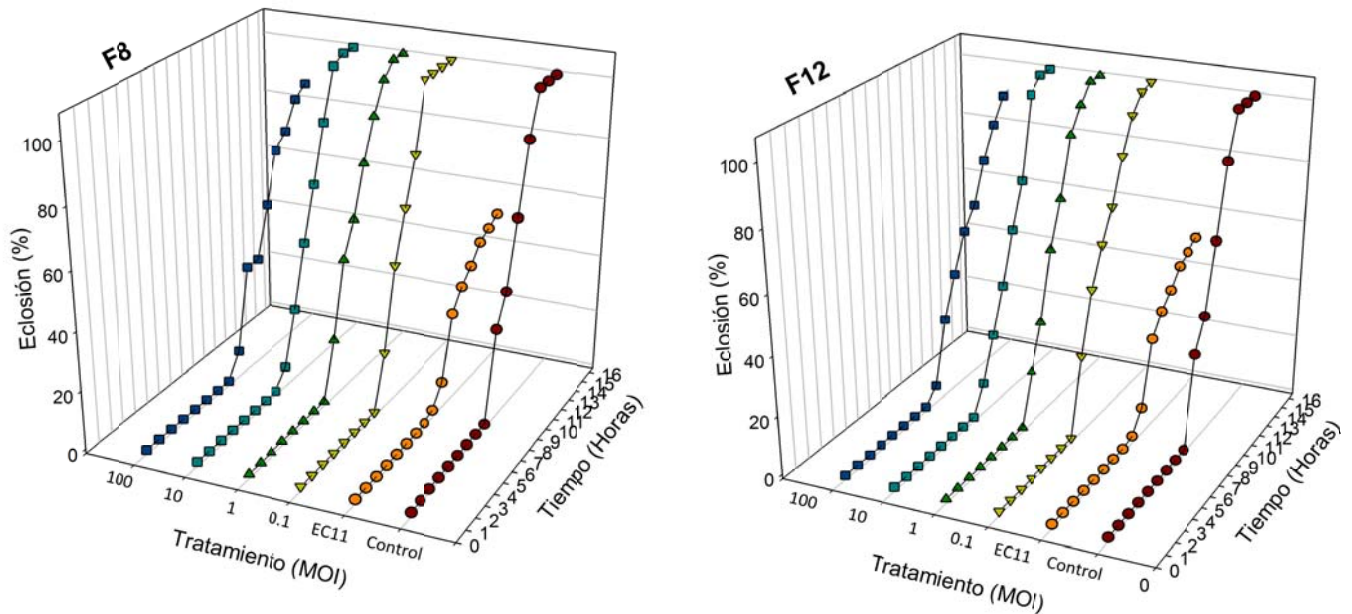
#### 4.4.- Efecto de los fagos, en pruebas de reto con *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* durante la eclosión de quistes de *A. franciscana*

Se observó que en los eclosionadores, con *V. parahaemolyticus* la tasa de eclosión fue de 50% a las 16 horas que duró el experimento. Mientras con los de MOI de 0.1, 1 y 10 de los fagos VPMS1 P y G, A3s P y G y Aie inhibieron la infección de *Vibrio* sp., obteniendo una tasa de eclosión similar al control (100%) al término de experimento. Con el MOI de 10 de VPMS1 P y Aie, no presentaron eclosión (Fig. 21).

En los eclosionadores, con *V. harveyi* se observó de igual forma la tasa de eclosión fue de 50% a las 16 horas que duró el experimento. Mientras que las unidades a las que se les suministró un MOI de 0.1, 1 y 10 de los vibriófagos F8 y F12 alcanzó una tasa de eclosión del 100% y con el MOI de 100 se obtuvo una eclosión del 85% en ambos casos (Fig. 22).



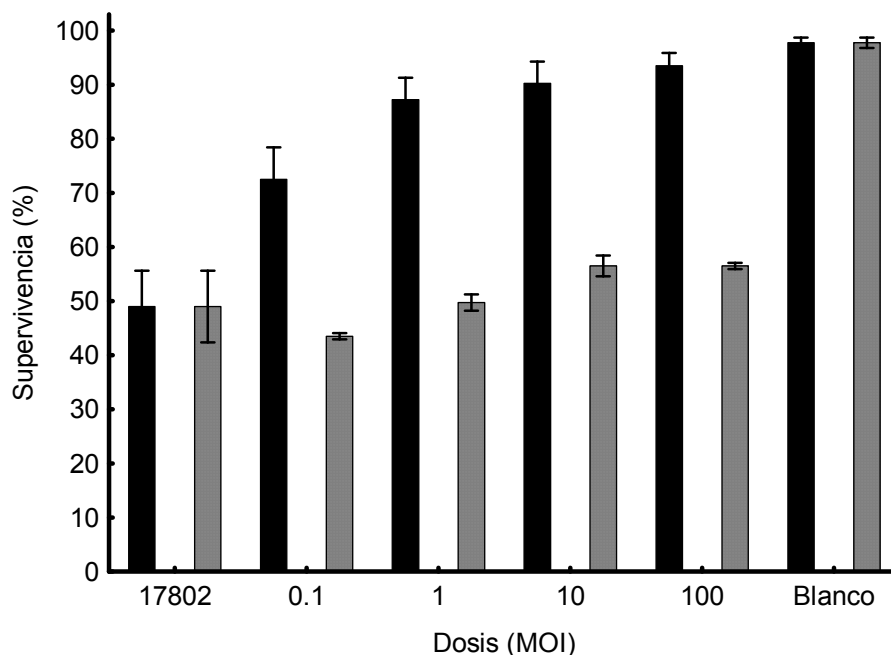
**Figura 21.-** Porcentaje de eclosión durante la producción de *A. franciscana* en prueba de reto con 17802 y vibriófagos, de acuerdo al tiempo, observando que en todos los casos hay una mayor tasa de eclosión con un MOI de 0.1- 10 y una menor tasa de eclosión con un MOI de 100.



**Figura 22.-** Porcentaje de eclosión durante la producción de *A. franciscana* en prueba de reto con EC11 y vibriófagos. de acuerdo a el tiempo observando que en todos los casos hay una mayor tasa de eclosión con un MOI de 0.1- 10 y una menor tasa de eclosión con un MOI de 100; de los fagos F8 y F12 los puntos representan la media  $\pm$  SD n=4.

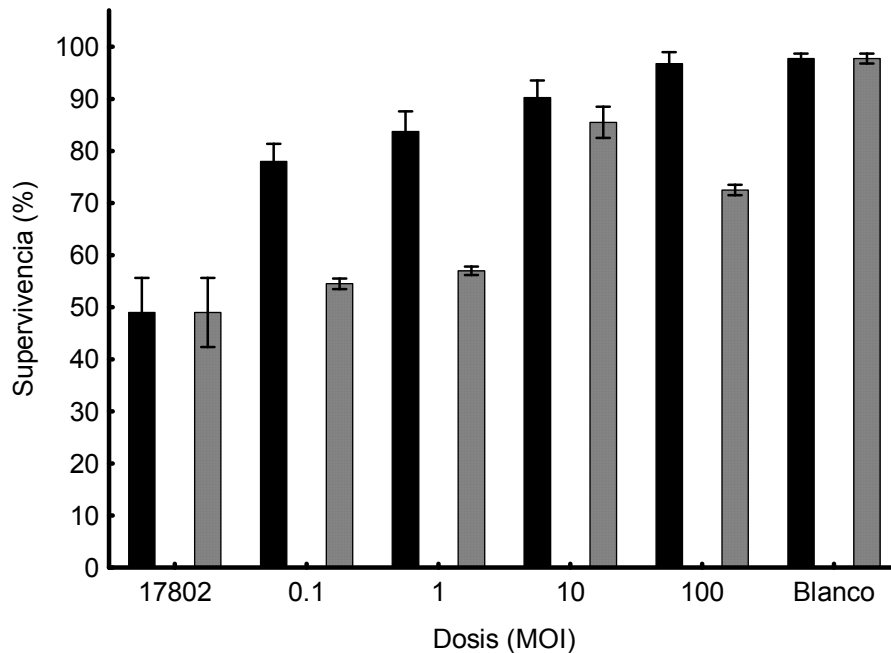
#### 4.5.- Pruebas de reto con *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* en nauplios inoculados con fagos

Las dosis 1, 4, 41 y 411  $\mu$ L (equivalentes a un MOI de 0.1, 1, 10 y 100) para VPMS1P generaron una supervivencia del 70-100% a las 48 h post-infección, respectivamente, de igual forma se observó una mejoría en el nado de los nauplios en comparación con el blanco, además de presentar un mejor desarrollo de los nauplios alcanzando el estadio de Instar III (Figura 23). Sin embargo, con las mismas dosis el fago VPMS1 G no presentó diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) con respecto a las larvas infectadas con la cepa 17802, además de presentar daños en los organismos como: falta de apéndices y nado letárgico, lo cual es similar a los síntomas de los nauplios infectados por 17802.



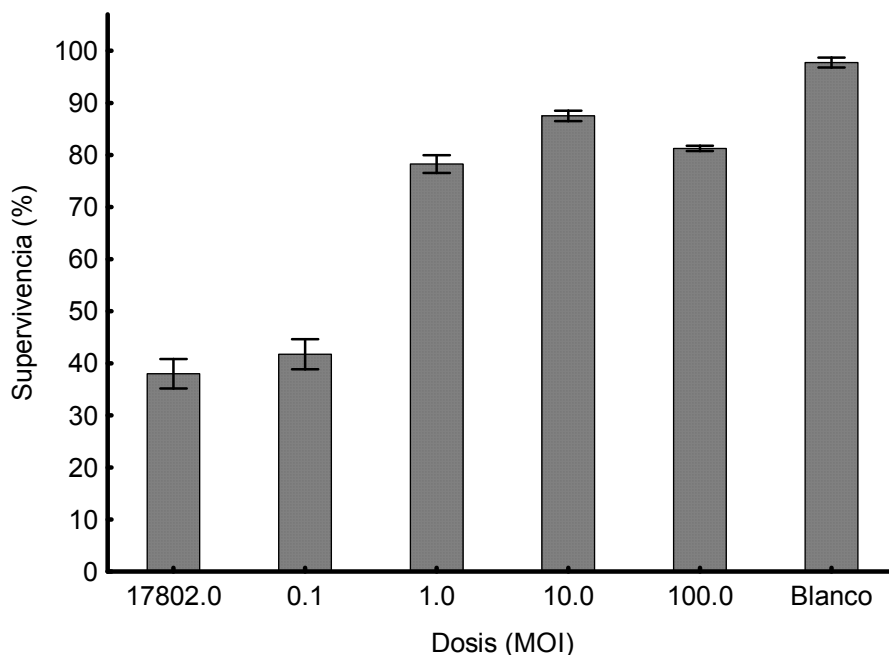
**Figura 23.-** Supervivencia de nauplios de *A. franciscana* infectados con *V. parahaemolyticus* 17802 durante 48 h empleando los vibriófagos vpms1 P (■) y vpms1 G (■) con un MOI de 0.1, 1, 10 y 100 (equivalentes a 1, 4, 41 y 411  $\mu$ L) un de extracto crudo los puntos representan la media  $\pm$  SD n=4

En el caso de los nauplios tratados con los fagos A3SP y G nuevamente se observó un incremento en la supervivencia de los nauplios infectados con 17802 conforme se incrementa la dosis del fago A3SP obteniendo supervivencias del 80% con la dosis de 1  $\mu$ L y del 100% con la dosis de 1000  $\mu$ L. Además, se observó una mejoría en el desarrollo de los organismos y su estado de salud, ya que hasta las 48 horas que duró el experimento alcanzaron un estadio de instar III. Sin embargo, en el caso de los nauplios tratados con el fago A3S G se observó que las dosis de 1 y 15  $\mu$ L no presentaron diferencias significativas respecto las muestras infectadas por 17802 ( $p > 0.05$ ), obteniéndose una supervivencia del 53 y 57% respectivamente. En el caso de las dosis de 151  $\mu$ L (MOI de 10) si hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto a las infectadas obteniendo una supervivencia de 79%. Finalmente, con la dosis de 1000  $\mu$ L, presentaron diferencias significativas con las infectadas, sin embargo, se presentó una supervivencia del 65%, lo cual es menor a la obtenida con la dosis anterior (fig. 24)



**Figura 24.-** Porcentaje de supervivencia de nauplios de *A. franciscana* infectados con *V. parahaemolyticus* 17802 durante 48 h empleando los vibriófagos A3S P (▤) y A3S G (■) empleados como terapia con un MOI de 0.1, 1, 10 y 100 (equivalentes a 1, 15, 151 y 1000  $\mu$ L) los puntos representan la media  $\pm$  SD n=4

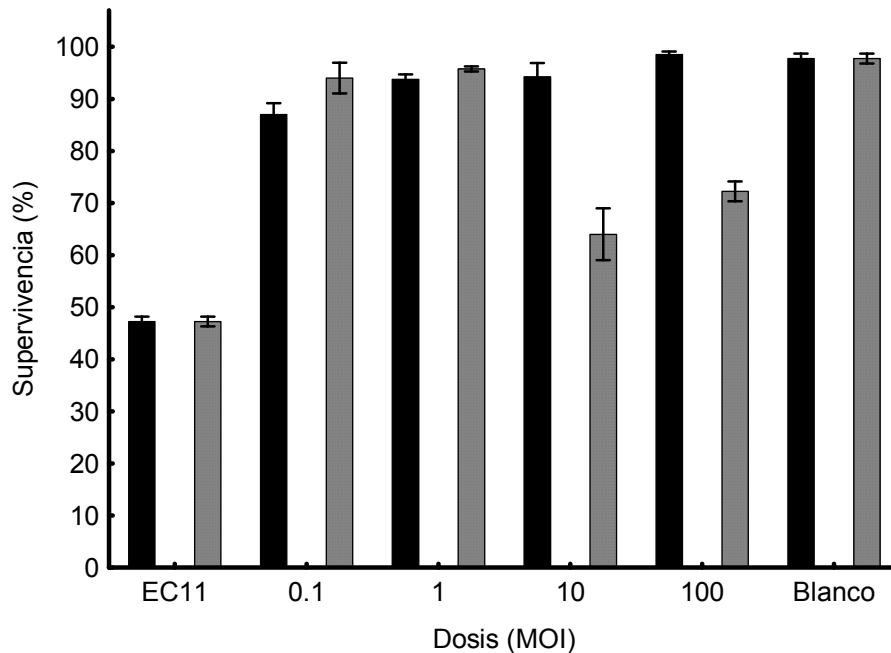
Con el fago Aie se observó un incremento en la supervivencia de los nauplios infectados con 17802 a las 48 h, alcanzando una supervivencia de hasta un 85%; sin embargo, con la dosis de 2000  $\mu$ L, esta presentó una supervivencia de 80%, lo cual es menor a la obtenida con la dosis anterior. Así mismo, estos presentaron mejorías en su desarrollo y nado a diferencia de los nauplios infectados con la cepa patógena (fig. 25)



**Figura 25.-** Porcentaje de supervivencia de nauplios de *A. franciscana* infectados con *V. parahaemolyticus* 17802 durante 48 h empleando el vibriófago Aie empleado como terapia con un MOI de 0.1, 1, 10 y 100 (equivalentes a 2, 28, 248 y 2000  $\mu$ L) los puntos representan la media  $\pm$  SD n=4

En la prueba de reto con *V. harveyi* en nauplios de *A. franciscana*, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) con las dosis empleadas del vibriófago F8 con las cuales se obtuvo una supervivencia del 95%, sin embargo con el vibriófago F12 si se observó una disminución significativa ( $p < 0.01$ ) de la supervivencia con las dosis de 30 y 300  $\mu$ L (Fig. 26).

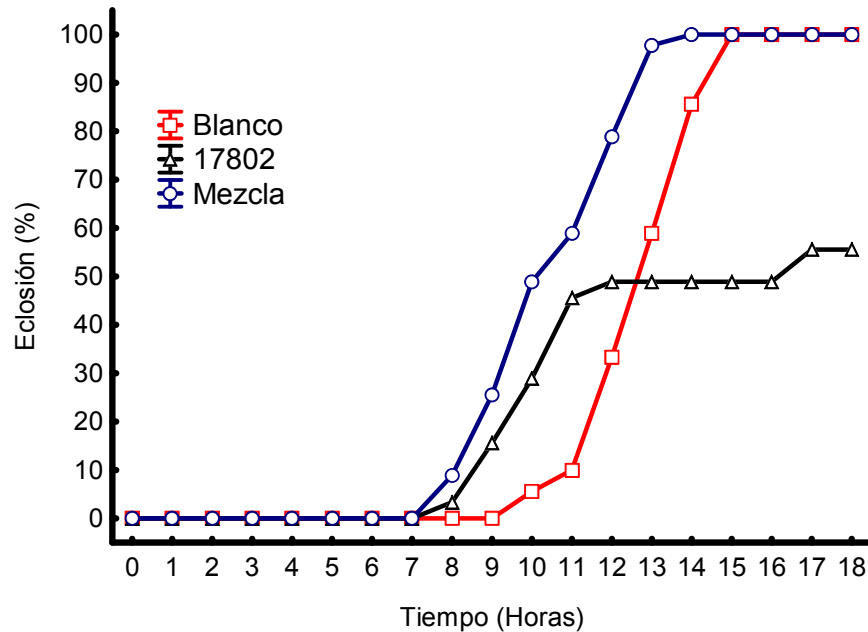
En este caso los nauplios no mostraron daños o cambio de coloración en comparación con los nauplios infectados con EC11 los cuales mostraron letargo en el nado, lesiones (falta de apéndices) y coloración roja a lo largo del cuerpo.



**Figura 26.-** Porcentaje de supervivencia de nauplios de *A. franciscana* infectados con *V. harveyi* durante 48 h empleando los vibriófagos F8 (■) y F12 (▨) como terapia con a un MOI de 0.1, 1, 10 y 100 (equivalentes de 3, 13, 30 y 300  $\mu$ L) de extracto crudo los puntos representan la media  $\pm$  SD n=4

#### **4.6.- Efecto de la mezcla de fagos, en pruebas de reto con *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* durante la eclosión de quistes de *Artemia franciscana***

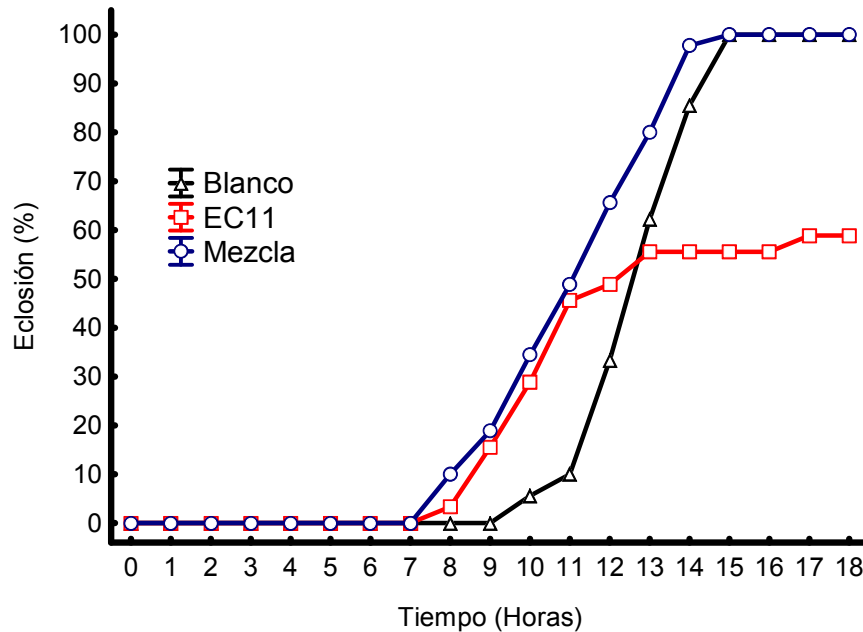
Se observó que en los eclosionadores con quistes de *A. franciscana*, la proliferación de *V. parahaemolyticus* inhibe la eclosión a las 11 h a partir de la eclosión. Con una carga bacteriana en los eclosionadores sin fago fue de  $10^3$  UFC/quiste a las 18 horas, reduciendo la tasa de eclosión en un 50%; mientras que en los eclosionadores con la mezcla de VPMS1, A3S y Aie se observó que esta reduce el tiempo de eclosión a 8 h a diferencia del control que inicia a las 10 h; además de inhibir por completo la proliferación de *V. parahaemolyticus* durante la eclosión, obteniendo una tasa de eclosión del 100 % a las 18 h que duró el experimento (Fig. 27).



**Figura 27.-** Porcentaje de eclosión de quistes infectados experimentalmente con *V. parahaemolyticus* con mezcla de los fagos VPMS1, A3S y Aie y un control axénico los puntos representan la media  $\pm$  SD n=4

En los eclosionadores con *V. harveyi*, se obtuvo una tasa de eclosión del 55% con una carga bacteriana de  $10^4$  UFC/quiste a las 18 horas. En los tratamientos con la mezcla de F8 y F12 se observó que esta, al igual que la mezcla anterior, reduce el tiempo de eclosión a 8 h y de igual forma inhibió por completo la proliferación de *V. harveyi* durante la eclosión, obteniéndose una tasa de eclosión del 100% a las 18 h que duró el experimento (Fig. 28).



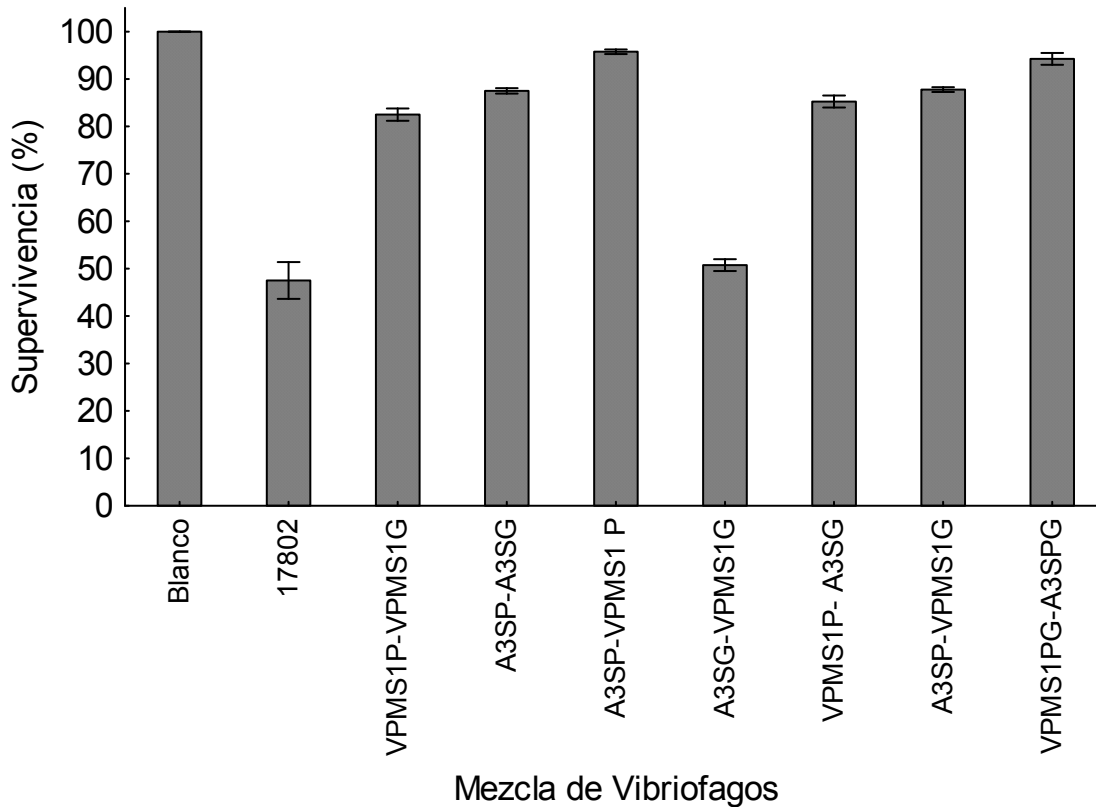


**Figura 28.-** Porcentaje de eclosión de quistes infectados experimentalmente con *V. harveyi* y con mezcla de los fagos F8 y F12 y un control axénico. Los puntos representan la media  $\pm$  SD n=4

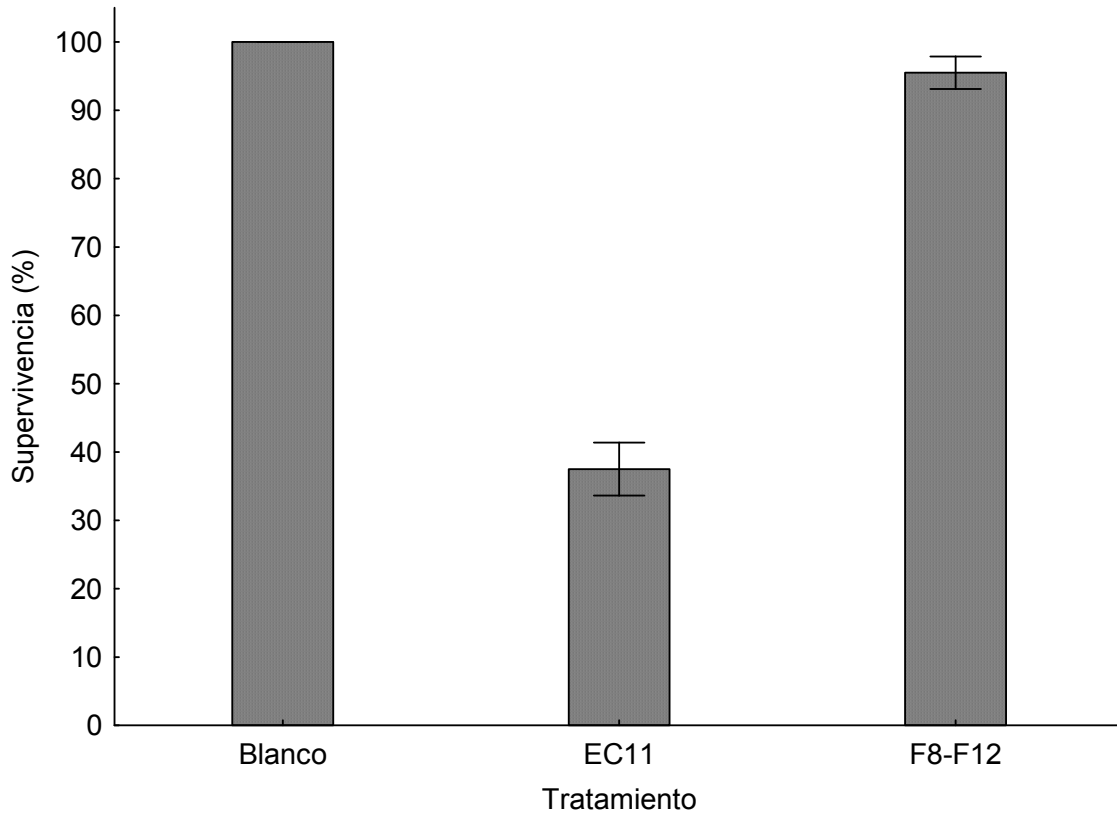
#### 4.7.- Pruebas de reto con *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* en nauplios inoculados con la mezcla de fagos

Hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre la supervivencia obtenida en el control axénico y todos los tratamientos, incluyendo el control de *V. parahaemolyticus*. Sin embargo, la supervivencia en los tratamientos con la mezcla A3SG-VPMS1G fue significativamente menor que el resto, por lo que esta disminución podría sugerir que entre estos fagos existe una interferencia durante la infección ocasionando un incremento en la mortalidad por la infección (Fig. 29). En los nauplios infectados con *V. parahaemolyticus* y la mezcla A3SG-VPMS1G, se observaron daños como pérdida de apéndices, coloración roja y en los que contenía la mezcla se observó una coloración negra y en ambos casos se presentó un letargo en el nado.

En el caso de los organismos infectados con *V. harveyi* existe una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) entre el control y la mezcla de fagos obteniendo una supervivencia del 96% con la mezcla además de que estos no presentaron daño alguno ni letargo durante el nado (Fig. 34).



**Figura 29.-** Efecto de las mezclas de fagos en la supervivencia de nauplios de *A. franciscana* infectados experimentalmente con *V. parahaemolyticus*. En el caso de la mezcla A3SG-VPMS1G ver detalle en el texto los puntos representan la media  $\pm$  SD n=4



**Figura 30.-** Efecto de la mezcla de fagos en la supervivencia de nauplios de *A. franciscana* infectados experimentalmente con *V. harveyi* los puntos representan la media  $\pm$  SD n=4

## 5.- Discusión

En acuicultura se han realizado trabajos de fagoterapia, en la cual se puede poner a punto métodos que permiten evaluar la capacidad de los fagos como agentes terapéuticos (Nakai *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2000). Considerando lo anterior el aislamiento y efecto en los sistemas de cultivo puede ser obicuo (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. Por ello en el presente trabajo se realizó una evaluación de los fagos disponibles en el laboratorio microbiología específicos para cepas de *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* y su comportamiento en diferentes medio en los cuales se trabajaron. Analizando primeramente el ciclo de replicación de los fagos vpms1, Aie y A3S para *V. parahaemolyticus* y los fagos F8 y F12 para *V. harveyi*, observando una mayor disminución en la absorbancia del cultivo de la cepa 17802 y EC11 mediante la adición de fagos, en el agua de eclosión de *A. franciscana* en comparación con el caldo marino y el agua de mar artificial lo cual se interpreta como una disminución de la densidad de la bacteria debido a la lisis generada al final del ciclo de replicación. Baross *et al.* (1978) evaluaron la incidencia de bacteriofagos específicos para *V. parahaemolyticus* y otros vibrios encontrando una alta cantidad de fagos líticos en muestras de ostras. De igual forma se han reportado aislamientos de fagos líticos para estos patógenos en los sistemas de cultivo (Chrisolite *et al.*, 2008; Makarov, 2008; 2010) evaluado su potencial como control biológico en acuicultura (Karunasagar *et al.*, 2005; Vinod *et al.*, 2006).

En la primera evaluación, los extractos crudos de los fagos VPMS1, A3S y Aie y los fagos F8 y F12 generaron un incremento en la tasa de eclosión y una disminución significativa de la mortalidad post- eclosión ( $p < 0.05$ ) y una disminución en la intensidad y cantidad de signos de vibriosis en los nauplios eclosionados. Cabe mencionar que se logró obtener un efecto benéfico por la aplicación del cálculo de número de fagos por célula bacteriana (MOI), que es el valor de la multiplicidad de infección, (Abedon, 2009). El cual 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 los valores de MOI de 0.1 y 1 en la mayoría de los casos y sólo el extracto usado en el tiempo de aplicación presentaron una alta titulación de fagos alcanzando una MOI de 2.18. 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.

Durante las pruebas de pureza de los fagos se observó que los fagos VPMS1 y A3S presentaron la formación de dos zonas de transparencia por lo cual se purificaron y denominaron VPMS1P y G y A3S P y G los cuales mostraron efectos diferentes en los tratamientos de infecciones experimentales durante la eclosión. Lo cual concuerda con lo sugerido por Calendar (2006) quien menciona que es necesaria la realización de pruebas previas de pureza 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.

En la prueba con dosis de fagos durante la producción de nauplios de *A. franciscana* se encontró algo interesante: los extractos de los fagos A3SP y G y VPMS1P y G Aie, F8 y F12 generaron una tasa de eclosión y supervivencia post-eclosión del 100% a partir de dosis de 0.1 de MOI ( $5.84 \cdot 10^6$  UFP·mL<sup>-1</sup>). Lo cual difiere de lo descrito por Lomeli-Ortega (2011) quien empleando los extractos crudos de VPMS1 y A3S a dosis altas (800 µL) obteniendo una mortalidad del 100% en organismos infectados y no infectados experimentalmente. 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).

Como prueba final en la aplicación de la fagoterapia se realizó un coctel de los fagos de 17802 y EC11 durante la producción de nauplios de *A. franciscana* Observando diferencias significativas en la supervivencia cuando se adicionaron fagos a dosis medias (MOI de 10) postinfección, sin embargo es importante señalar que en todos los tratamiento con los diferentes MOI la supervivencia fue mayor al 89 % y diferente significativamente de aquellas expuestas solamente a la bacteria ( $p < 0.05$ ), encontrándose un efecto correctivo y protector en la aplicación de fagos. Lo cual es similar a lo obtenido por Quiroz-Guzmán (2005); Lomeli-Ortega (2011) y Martínez-Díaz & Hipólito-Morales (2013) quienes encuentran que al agregar al inicio de la terapia con fagos o después de la eclosión con los fagos VPMS1, A3S F8 y F12 estos brindaron una protección total en nauplios de *A. franciscana* y larvas de camarón obteniendo una supervivencias del 80 -100% en ambos casos.

En el caso de acuicultura se encontraron pocos trabajos que 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 obtenido en la presente tesis. Finalmente se encontró un efecto benéfico de la fagoterapia sobre infecciones experimentales por *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*. 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 en mezcla es una solución aplicable y segura para el control de vibriosis en acuicultura, 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 y no generar la selección de cepas resistentes.

## Capítulo IV

---

Evaluación del efecto combinado de un consorcio de cepas probióticas y vibriófagos para el control de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio harveyi* durante la producción de nauplios de *Artemia franciscana*

## Resumen

En el presente capítulo se analizó el efecto de una mezcla de un consorcio de cepas probióticas y de vibriófagos durante infecciones experimentales con *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio harveyi* durante la producción de nauplios de *Artemia franciscana*. En cada caso se emplearon dosis mínimas de cada uno de los agentes de control biológico para así resaltar el efecto sinérgico de ambas. Obteniendo como resultado un incremento en la tasa de eclosión, supervivencia post-eclosión del 100 % en cada uno de los tratamientos lo cual resulta ser mayor en comparación con los tratamientos por separado con el cual se obtuvo una eclosión y supervivencia de 80%, además, de presentarse nuevamente la reducción de 3 h en la eclosión; en el caso de los nauplios de *Artemia franciscana* infectados experimentalmente se noto el mismo efecto obteniendo nuevamente 100% de supervivencia en cada uno de los tratamientos a diferencia de los tramientos por separados en los cuales se obtiene una supervivencia del 85%, lo que indica que el uso de la mezcla de estos dos agentes de control biológico durante el proceso de incubación se puede utilizar como una alternativa eficaz ya que la sinergia de estos a dosis menores presenta un beneficio durante la eliminación de la microbiota patógena durante la producción nauplios de *Artemia francisca*.

**Palabras clave:** Vibriófagos, probióticos, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio harveyi*



## 1. Introducción

En los últimos años, varias investigaciones se han encaminado al desarrollo de técnicas preventivas y terapéuticas para reducir o impedir la incidencia de enfermedades en acuicultura. Una de ellas es el uso de probióticos ha probado ser una estrategia eficiente para controlar bacterias patógenas ya que juegan un papel importante en el control de la microbiota intestinal, así como en el mantenimiento de su estado normal (Oksanen *et al.*, 1990). Destacan los efectos que provocan en los organismos en los que son suministrados, estos se engloban dentro de dos grupos según el sitio que estimulan: 1) en el sistema intestinal, 2) en diversos sistemas, tejidos, órganos y células donde contrarrestan un sinnúmero de enfermedades de todo tipo (Smoragiewicz *et al.*, 1993). Sin embargo existen circunstancias en las que no funcionan i) cuando se da resistencia a probióticos ii) cuando no producen sustancias antagónicas que inhiban el crecimiento de los patógenos y iii) cuando hay una baja concentración de ellas en el medio debido a la llamada estrategia r/k, empleada por bacterias oportunistas, incluyendo los patógenos potenciales, los cuales suelen ser estrategias K que crecen rápidamente aprovechando al máximo los recursos inhibiendo por completo a los r que son los probióticos en algunas circunstancias (Vadstein *et al.*, 1993).

Otra alternativa para el control de las bacterias indeseables es la fagoterapia la cual ha sido usada durante décadas, pero actualmente se analiza con mayor interés principalmente por la necesidad de controlar poblaciones de bacterias resistentes a los antibióticos y porque los fagos específicos para dichas cepas pueden ser aislados en pocos días, lo cual es una ventaja ante los antibióticos que tardan más tiempo en desarrollarse (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Sin embargo, existen circunstancias en las que no funcionan; ya sea por la ausencia de la célula blanco, sobre la cual tienen efecto, por el número bajo de multiplicidad de infección óptimo el cual, está dado, por el número de viriones liberados a lo largo del proceso de lisis, y finalmente la resistencia bacteriana a los fagos ya que muchas ocasiones no se dispone de una variedad de fagos suficiente que puedan ser usados para una determinada bacteria.

Por ello, algunos autores han argumentado que la terapia de fagos puede usarse junto con los probióticos pues son muy específicos y no afectarían la actividad de los probióticos. No obstante hasta el momento no se han realizado estudios sobre la posible sinergia que pudieran tener estos dos métodos de control biológico en los sistemas de cultivo acuícola. Pero se puede esperar que la combinación de ambas técnicas será mas efectiva que su uso independiente ya que tienen principios fundamentales de acción que pueden considerarse complementarios.

De manera natural la regulación de las poblaciones microbianas ocurre como el efecto combinado de multiples actores microbianos, *v. gr.* Lo descrito por Hamblly & Suttle (2005), quienes publicaron resultados de una investigación acerca de la virósfera y el intercambio genético entre comunidades de fagos dando mayor importancia a las interacciones fago-hospedero concluyendo que el papel principal de las poblaciones de hospederos en la ecología y evolución de los fagos, es de servir como vectores de intercambio genético. Otro trabajo fue el realizado por Suttle (2007), donde marca la influencia de virus marinos en la composición de las comunidades marinas y en los ciclos biogeoquímicos, especialmente el ciclo de carbono, donde la contribución se debe a los efectos de lisis bacteriana mediada por fagos. Al presentarse un evento de lisis, se liberan cantidades considerables de materia orgánica que es utilizada por otras bacterias y/o depositada en el fondo. Por lo que seria de esperarse que la combinación de varias estrategias redunde en un control, más eficiente dentro de los sistemas de producción acuícola.

Por lo que en el presente capítulo se evalúo la combinación de ambos tratamientos, en combinación bajo circunstancias en los que por si solos no serían eficientes para propiciar un control completo de las bacterias patógenas durante la producción de nauplios de *Artemia farniscana*.

## **2. Métodos.**

### **2.1.- Bacterias probióticas**

Las bacterias probióticas empleadas en el presente estudio fueron usadas en forma de consorcio el cual fue seleccionado como se describió en el capítulo 2. Todas las cepas fueron mantenidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  y cultivadas en placas de AM incubadas a  $35^{\circ}\text{C}$  y cosechadas a las 24 h. Para los experimentos, cada cepa se ajustó en agua de mar a una densidad óptica de 1 a 585 nm ( $\text{DO}_{585} = 1$ ) usando un espectrofotómetro (Spectroquant 1117, Merck, Darmstadt, Germany) y posterior ha esto se realizo la mezcla de las cepas en un tubo esteril.

### **2.2.- Vibriófagos**

Los bacteriófagos líticos de *Vibrio parahaemolyticus* empleados en el presente estudio fueron usados en forma de mezclas de acuerdo a como se describe en el capítulo 3. La mezcla de fagos se preparó tomando 100  $\mu\text{l}$  de cada uno de los vibriófagos los cuales fueron mezclados en tubos esteriles.

### **2.3.- Efecto de la mezcla de cepas probióticas y vibriófagos, en pruebas de reto con *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* durante la eclosión de quistes de *Artemia***

El efecto de la mezcla de cepas probióticas y vibriófagos sobre la eclosión y supervivencia durante la eclosión de *A. franciscana* se evaluó por cuadruplicado en tubos con 10 mL bajo las condiciones previamente descritas en el capítulo 1. Cien quistes libres de bacterias se colocaron en tubos con 10 mL de agua de mar estéril y se inocularon con dosis de 0.1, 1, 10 y 100  $\mu\text{L}$  de las cepas probióticas y 0.01, 0.1, 1 y 10  $\mu\text{L}$  de los vibriófagos y 100  $\mu\text{L}$  de cada uno de los vibrios (que corresponden a la dosis letal al 50% ( $\text{DL}_{50}$ )). Los tubos fueron mantenidos en agitador rotatorio a  $28^{\circ}\text{C}$  con luz continua evaluando el porcentaje de eclosión, supervivencia y reducción de *Vibrio* sp. de los nauplios a las 20 h

(aproximadamente 5 horas post eclosión). Controles axénicos fueron evaluados simultáneamente durante el experimento.

#### **2.4.- Pruebas de reto con *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* en nauplios inoculados con la mezcla de cepas probióticas y vibriófagos.**

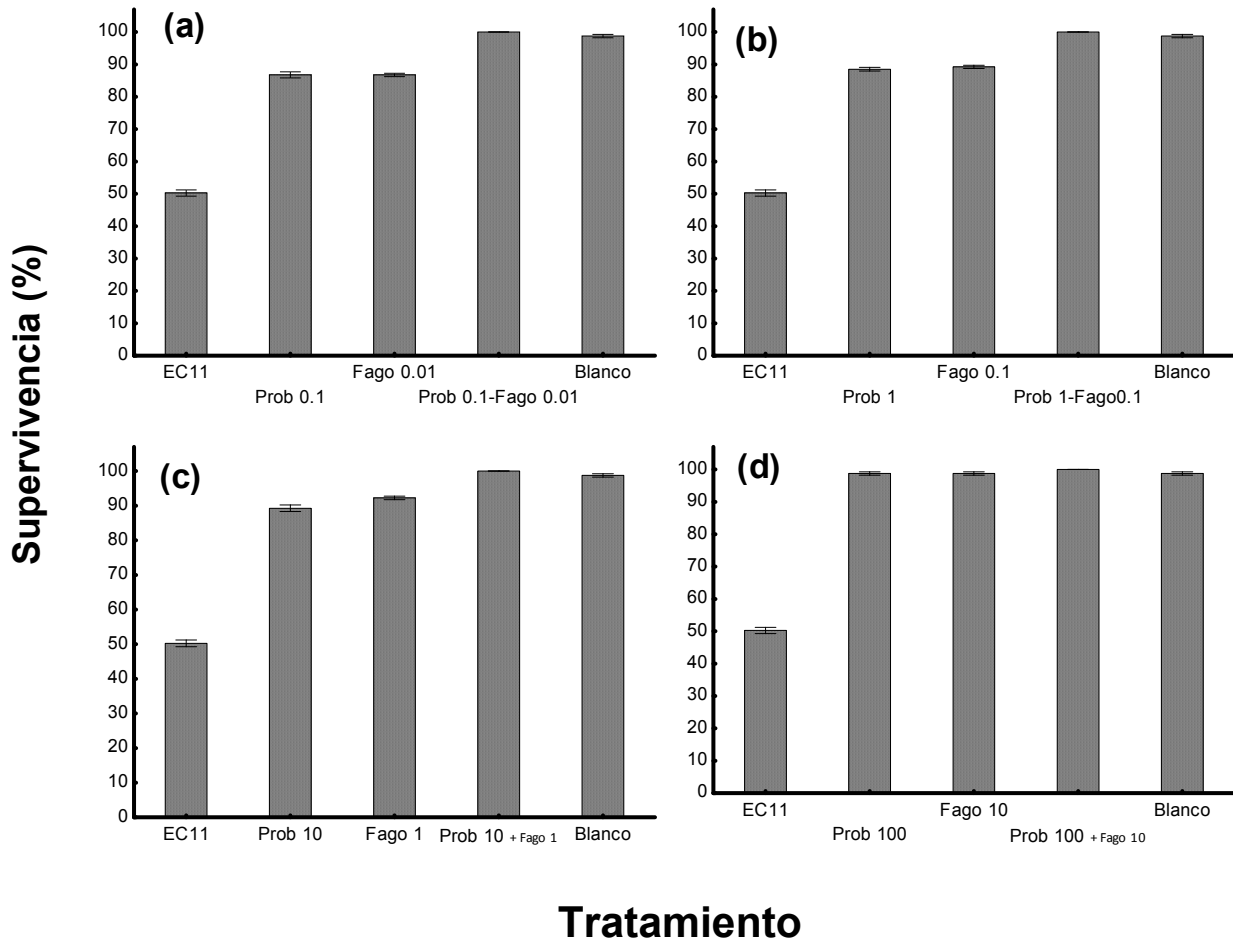
Nauplios axénicos obtenidos como se describe en el capítulo 1 fueron colocados en unidades experimentales con 100 mL de agua de mar estéril a una densidad de 1 nauplio por mL, las unidades fueron inoculadas por triplicado con dosis de 0.1, 1, 10 y 100  $\mu\text{L}$  de las cepas probióticas y 0.01, 0.1, 1 y 10  $\mu\text{L}$  de los vibriófagos 100  $\mu\text{L}$  de una suspensión de *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* ajustadas a una densidad óptica de 1 a 585 nm a las 48 h se registró la reducción de vibrios y la mortandad en cada tratamiento.

### **3. Resultados**

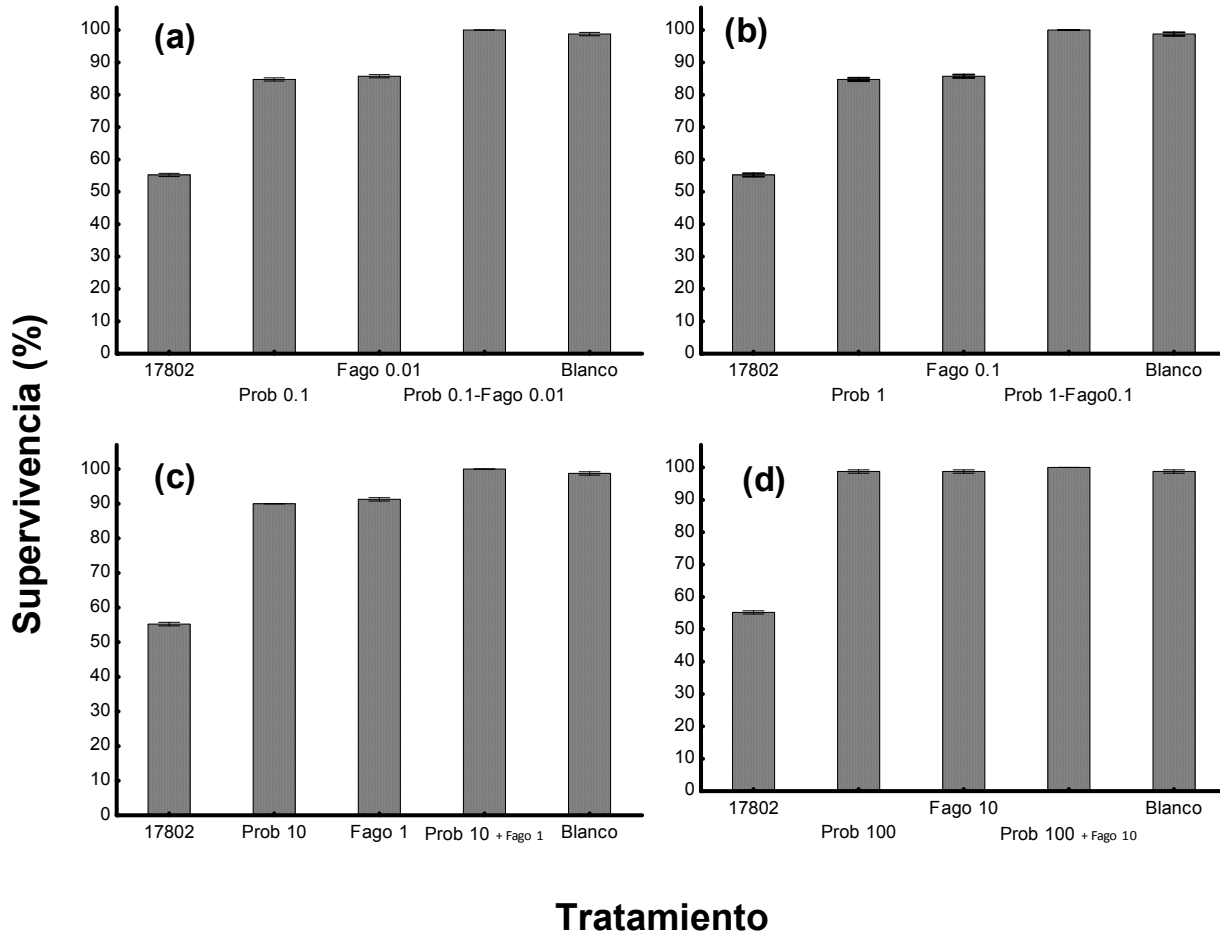
#### **3.1.- Efecto de la mezcla de probióticos sobre la eclosión y supervivencia temprana de *Artemia franciscana*.**

Durante los bioensayos con la mezcla de cepas probióticas y vibriófagos se observó que a diferencia de los experimentos anteriores en los cuales se presentó una dependencia de las dosis para reducir la tasa de eclosión y mortalidad por *V. parahaemolyticus* (Fig. 31) y *V. harveyi* (Fig. 32) no depende de la dosis de la mezcla de bacterias y vibriófagos usadas debido a que la supervivencia con las diferentes concentraciones no fue significativamente diferente del control ( $p>0.05$ ), obteniendo una eclosión y supervivencia pos-eclosión del 100%, evitando por completo el efecto adverso de *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*.

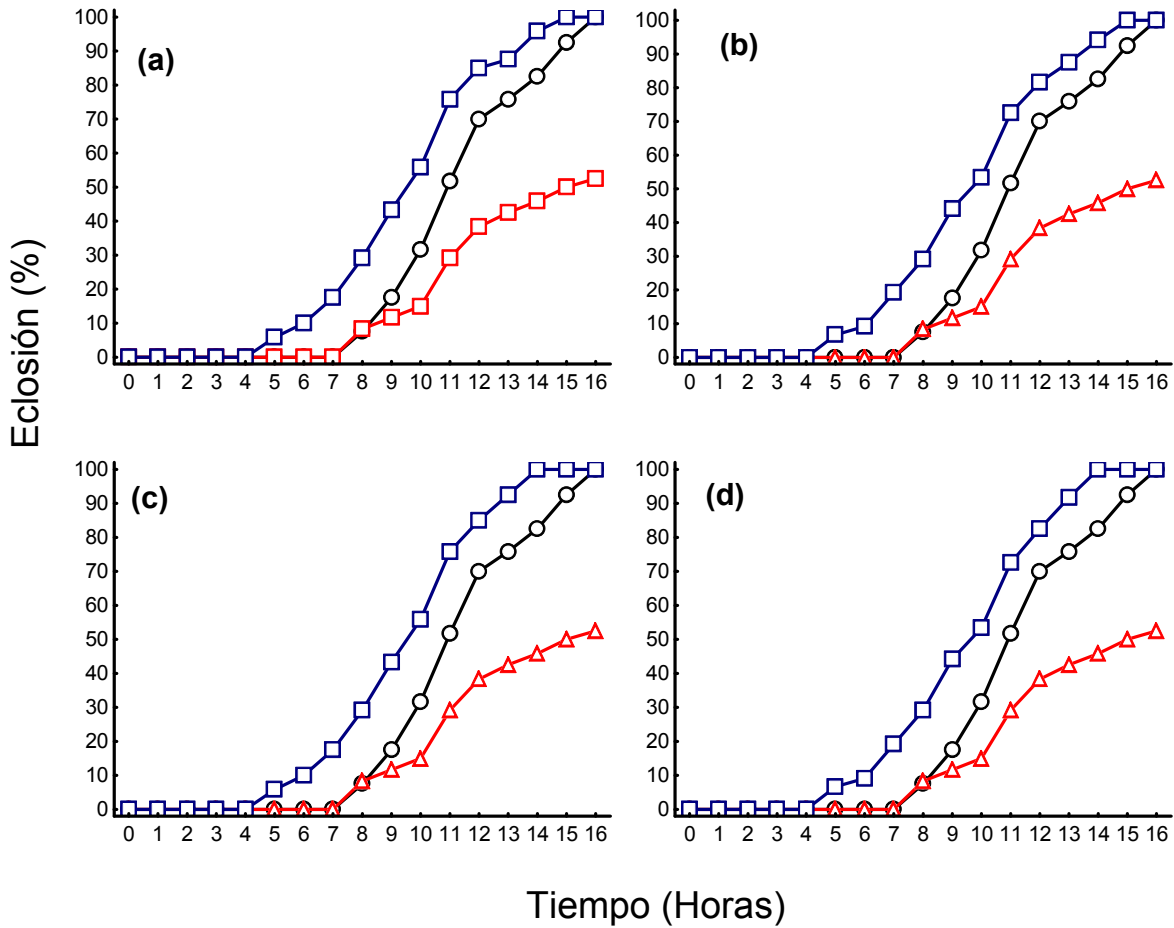
De igual forma nuevamente se observó en todos los tratamientos con la mezcla del consorcio de cepas probióticas y vibriófagos una reducción de dos horas en la eclosión de los quistes a diferencia de los tratamientos control e infectados con *V. parahaemolyticus* (Fig. 33) y *V. harveyi* (Fig.34).



**Figura 31.-** Porcentaje de supervivencia post-eclosión de nauplios de *A. franciscana* infectados experimentalmente con  $5.5 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> de ATCC 17802, tratados con diferentes dosis de la mezcla de cepas probióticas y vibriófagos (a) Prob 0.1  $\mu$ L + Vibriófago 0.01 MOI; (b) Prob 1  $\mu$ L + Vibriófago 0.1 MOI; (c) Prob 10  $\mu$ L+ Vibriófago 1 MOI y (d) Prob 10  $\mu$ L+ 10 MOI. Los datos son la media y desviación estándar n=5

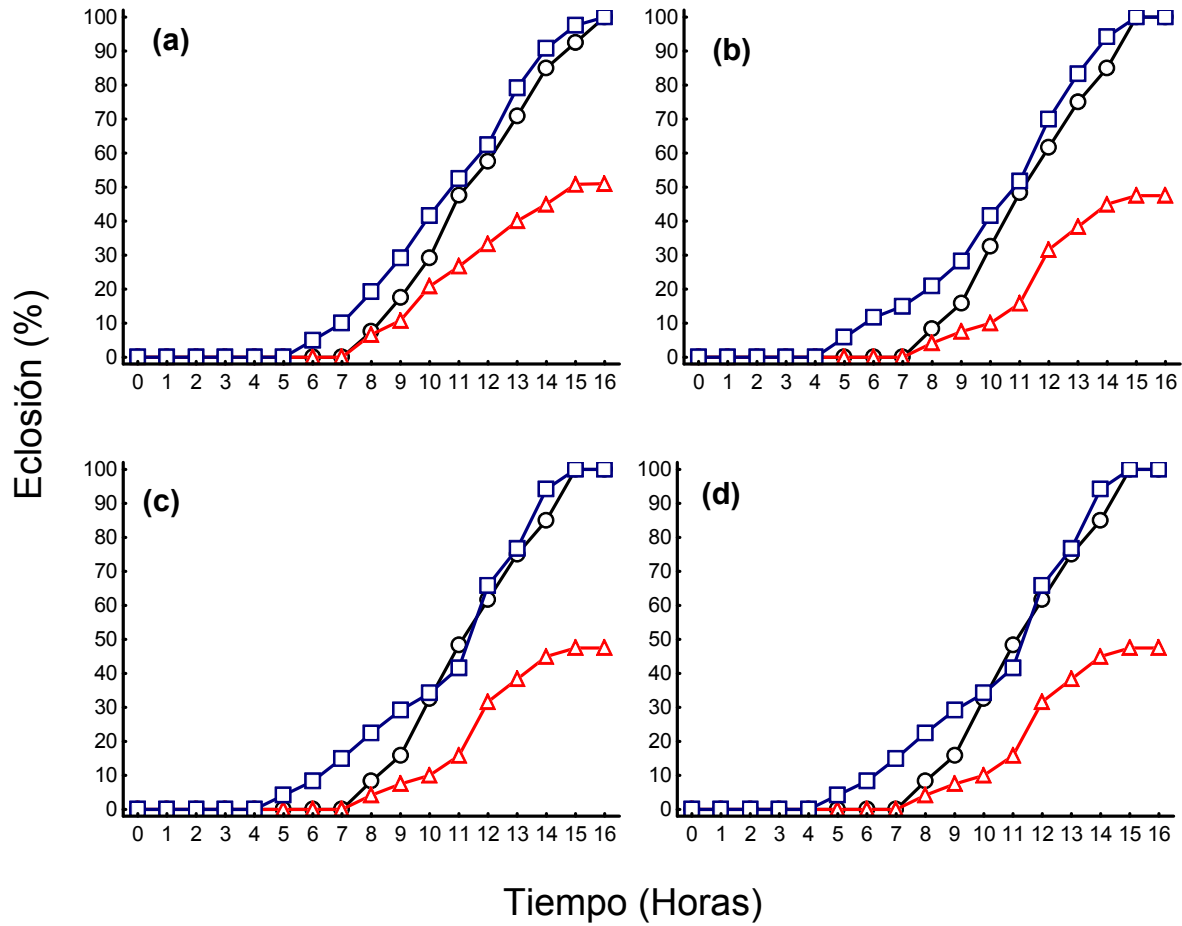


**Figura 32.-** Porcentaje de supervivencia post-eclosión de nauplios de *A. franciscana* infectados experimentalmente con  $5.5 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> de EC11, tratados con diferentes dosis de la mezcla de cepas probióticas y vibriófagos (a) Prob 0.1  $\mu$ L + Vibriófago 0.01 MOI; (b) Prob 1  $\mu$ L + Vibriófago 0.1 MOI; (c) Prob 10  $\mu$ L+ Vibriófago 1 MOI y (d) Prob 10  $\mu$ L+ 10 MOI. Los datos son la media y desviación estándar n=5



**Figura 33.-** Tiempo de eclosión de quistes inoculados con diferentes dosis (a) Prob 0.1-Fago 0.001-0.01; (b) Prob 1-Fago0.1-1; (c) Prob 10 + Fago 0.1-1 y (d) Prob 100 + Fago 1-10 de la mezcla de cepas probióticas y vibriófagos (□) probióticos e infectados experimentalmente con 17802 (Δ) y un control axénico (○). Los datos son la media y desviación estándar n=4

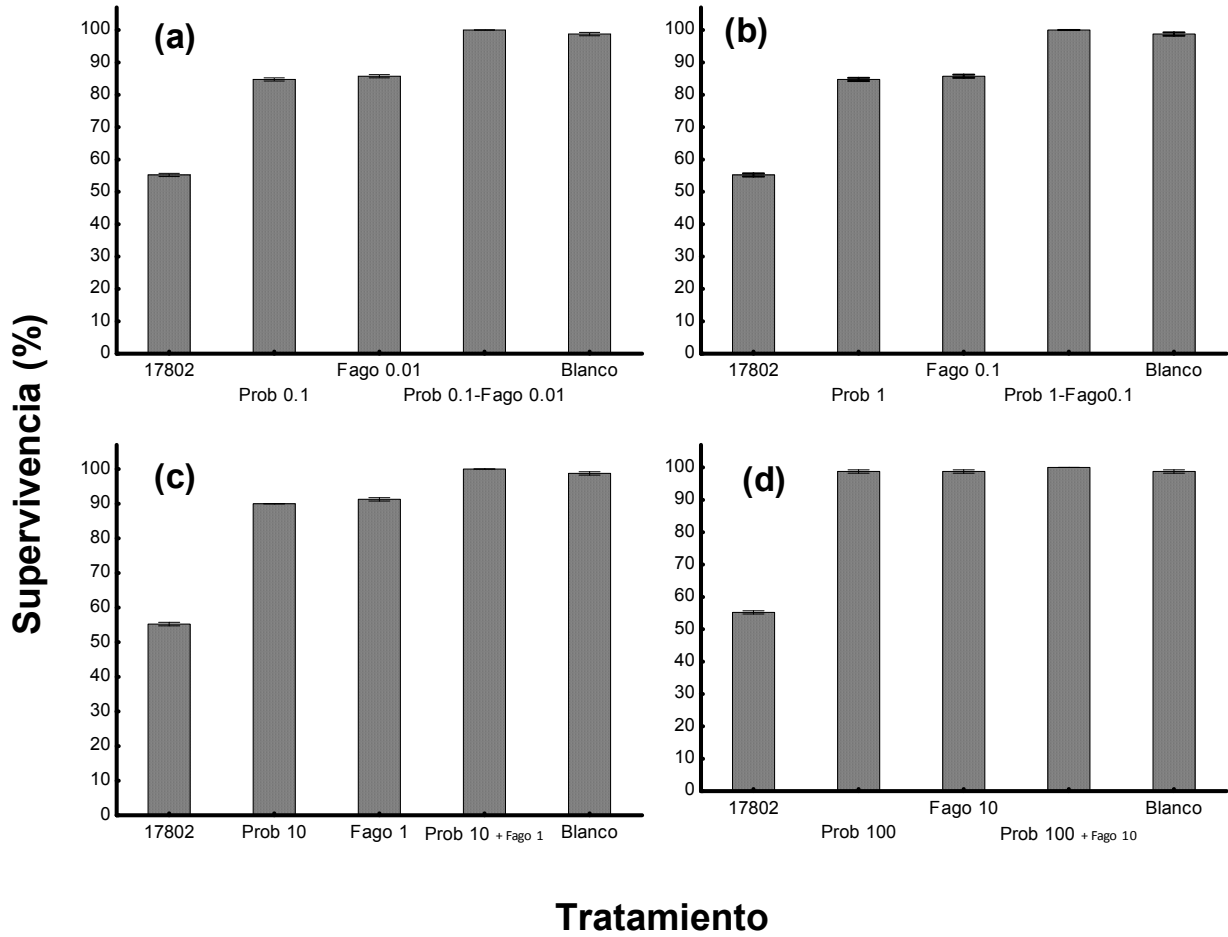




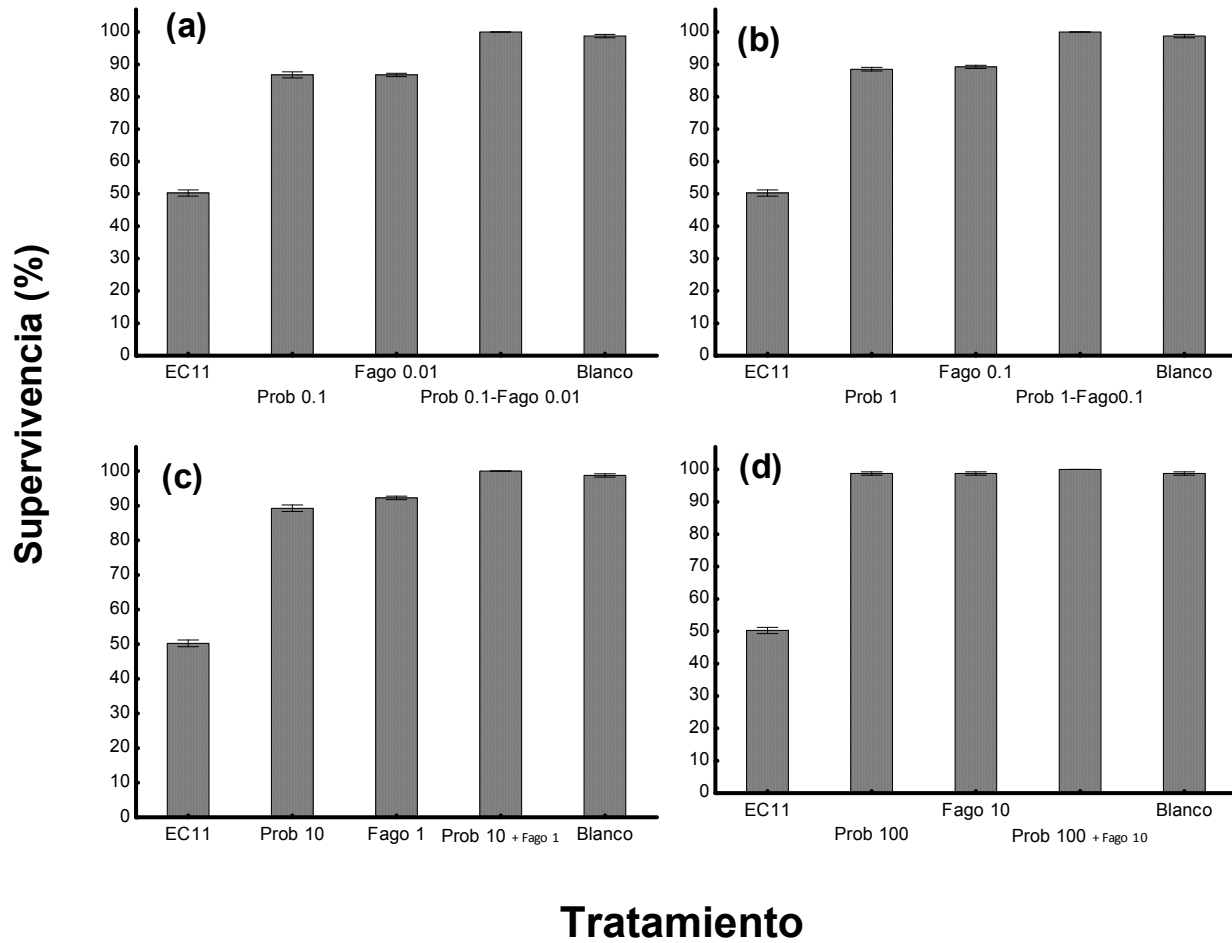
**Figura 34.-** Tiempo de eclosión de quistes inoculados con diferentes dosis (a) Prob 0.1-Fago 0.001-0.01; (b) Prob 1-Fago 0.1-1; (c) Prob 10 + Fago 0.1-1 y (d) Prob 100 + Fago 1-10 de la mezcla de cepas probióticas y vibriófagos (□) probióticos e infectados experimentalmente con EC11 (△) y un control axénico (○). Los datos son la media y desviación estándar n=4

### **3.2.- Pruebas de reto con *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* en nauplios inoculados con la mezcla de cepas probióticas y vibriófagos.**

Nuevamente se observó que a diferencia de los tratamientos con el consorcio y la mezcla de fagos dependió del incremento de las dosis. Con la mezcla de cepas probióticas y vibriófagos la tendencia general fue que, con las diferentes dosis, el porcentaje de supervivencia significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) que en los nauplios infectados con *V. parahaemolyticus* (Fig. 35) y *V. harveyi* (Fig. 36) Sin embargo las supervivencia en las concentraciones no fueron significativamente diferentes del control axénico ( $P > 0.05$ ) con las cuales se obtuvo un 100%.



**Figura 35.-** Efecto de las diferentes dosis de la mezcla de cepas probióticas y vibriófagos en la supervivencia de nauplios de *A. franciscana* infectados experimentalmente con 17802 los puntos representan la media  $\pm$  SD n=4.



**Figura 36.** Efecto de las diferentes dosis de la mezcla de cepas probióticas y vibriófagos en la supervivencia de nauplios de *A. franciscana* infectados experimentalmente con EC11 los puntos representan la media  $\pm$  SD n=4.

#### 4.- Discusión

Las publicaciones científicas existentes en el tema han facilitado el entendimiento de los modos de acción de los probióticos y vibriófagos en el portador, entre ellos la competencia por nutrientes, la modulación de la respuesta inmunitaria no específica, la producción de compuestos antimicrobianos, la competencia por el sitio de fijación en el tracto gastrointestinal y la lisis selectiva de bacterias. Sin embargo, es necesario precisar que la eficiencia *in vitro* de un probiótico y un vibriófago seleccionado pueden cambiar cuando se administra al portador ya que naturalmente, en circunstancias reales, el proceso se puede ser afectado por múltiples factores impredecibles y algunos predecibles. Por ejemplo, para que los probióticos funcionen deben estar presentes en gran número como células viables, y ser capaces de sobrevivir dentro del órgano colonizado, no afectando el crecimiento, ni induciendo resistencia a antibióticos que comprometan la terapia (Fuller, 1989). Lo cual concuerda con el resultados obtenidos en el presente estudio en los que, se observó que, durante los experimentos de reto su eficiencia es dependiente de la dosis, sin embargo, al combinarla con la aplicación de fagos específicos se observó un efecto sinérgico y se redujo por completo la proliferación de *Vibrio* sp. Un efecto adicional es que favorecieron la eclosión y supervivencia post- eclosión. Cuando cada tratamiento se aplicó por separado se vio que a una menor dosis el efecto se veía comprometido. Así mismo se denotó una mayor resistencia a las bacterias patógenas y nuevamente una reducción en el tiempo de eclosión en comparación con los infectados y el control axénico.

En el caso de los tratamiento con nauplios axénicos se observó el mismo comportamiento ya que con los tratamientos del consorcio de cepas probióticas y la mezcla de vibriófagos se denotó una disminución en la supervivencia de los nauplios el cual no fue menor que el control axénico. Sin embargo en contraste con las dosis mínimas de la mezcla de cepas probióticas y vibriófagos estos mantuvieron una supervivencia del 100%. Además de presentar una mejoría en el nado y eliminación de *Vibrios* sp.

El impacto de los resultados presentados aquí, pueden tener un impacto económico muy significativo, ya que la reducción en los volúmenes de probiótico requerido generaría una reducción en los costos de producción. Actualmente la aplicación de probióticos representa un gasto importante y para un laboratorio o granja de producción puede alcanzar el orden de los millones de pesos durante una temporada de producción. Sin embargo como se puede ver en el presente trabajo, la aplicación en conjunto de mezclas de probióticos y vibriófagos, generaría una reducción de hasta un 90%, debido, a que, solo se requieren dosis minimas de cada uno de ellos para tener un control completo sobre las poblaciones de patógenos específicos. Particularmente en el caso de la producción de *Artemia* sp., el control de cepas patógenas específicas, representa una mejor calidad de alimento por la colonización de probióticos y libre de patógenos específicos.

## **Capítulo V**

---

Discusión Final y conclusión

## DISCUSIÓN

La supervivencia es uno de los principales parámetros que se toman en cuenta durante las infecciones experimentales para determinar el valor y significancia de microorganismos a evaluar. Sin embargo, se ha observado que en la mayoría de los estudios ofrecen información poco evidente para calificar el impacto de las infecciones experimentales evaluadas en los cultivos de *Artemia* sp. ya que muchas veces estos no presentan diferencias significativas entre los controles y los tratamientos. Esto muchas veces por que los modelos de reto no se llegan encontrar totalmente axénico y/o la alimentación que es suministrada no es del todo estéril. Sin embargo durante el presente estudio se logró determinar que un manejo adecuado de compuestos antimicrobianos durante la producción de quistes de *Artemia franciscana* nos permitió tener un efecto totalmente favorable durante todos nuestros bioensayos ya que por ser un modelo de infección durante el desarrollo y no en estadios con requerimiento de alimento no se obtuvo interferencia de otro tipo de microbiota. Lo cual puede indicar la gran influencia que tiene la comunidad microbiana en el desarrollo de infecciones experimentales, ya que esta puede estar actuando probablemente de una manera sinérgica donde los diferentes elementos del cultivo interactúan contribuyendo en el desempeño del desarrollo de la comunidad microbiológica en los sistemas experimentales.

Lo cual concuerda con Provasoli y Shiraishi (1959) quienes mencionan que el cultivo de *Artemia* sp. en condiciones axénicas, apoya el crecimiento sólo hasta la tercera etapa de metanauplio, descrita como larva de forma "T", más larga, delgada, vive a expensas de su reserva vitelina logra desarrollarse hasta la segunda etapa de metanauplio la cual es empleada por la mayoría de los acuicultores. De igual forma 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. Lomeli-Ortega (2011) logró reducir la carga



bacteriana asociada a los nauplios de camarón blanco a través del uso del desinfectante ClO<sub>2</sub> eliminando la interferencia observada en las primeras infecciones experimentales.

Por lo que una estrategia clave para estudiar las interacciones portador-microbiota es definir el funcionamiento del portador en ausencia de todos los microorganismos y con ellos evaluar los efectos de una o varias poblaciones definidas de microorganismos o ciertos compuestos, 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, utilizando la mortalidad como el principal criterio de evaluación

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, 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 durante la producción de nauplios de *A. franciscana* el cual permita entender los mecanismos de acción que tienen las poblaciones de *Vibrio* sp. sobre este microcrustáceo.

En los experimentos realizados en la presente tesis se determinó la concentración inicial y final de cada uno de los cultivos de *A. franciscana*; sin embargo, los

valores de UFC/mL obtenidos al inicio del cultivo siempre dependieron de la cepa probiótica y patógena. Esto se explica con base a que se utilizaron de diversos métodos de determinación del número de bacterias. La determinación de la concentración celular en los cultivos bacterianos en los cuales se determinó la curva de crecimiento de las cepas bacterianas y el volumen del inóculo para cada cultivo y/o tratamiento durante la producción de *A. franciscana*, se basó en conteos celulares y la determinación de la concentración bacteriana en cada uno de los tratamientos recuperadas con valores de Unidades Formadoras de colonias (UFC/mL). Ya que la mayoría de los estudios realizados en modelos de infección sugieren una contribución significativa de las bacterias (Cazemier *et al.*, 1997), lo cual concuerda con Schimel (2001), quien señala que los modelos de monitoreo bacteriano son similares al de caja negra ya que permiten hacer dos suposiciones implícitas: **i)** los procesos microbianos pueden ser representados a través de una gama de condiciones ambientales con una función matemática, **ii)** los procesos microbianos no están limitados por la abundancia de cualquier microorganismo. Estas suposiciones son implícitas, porque hay grandes modelos de ecosistemas que incluyen parámetros que representan explícitamente los componentes de la composición de la comunidad microbiana. A lo sumo, algunos modelos incluyen la biomasa microbiana total como parámetro. Por ello la idea de que los microorganismos son resistentes y resilientes es funcionalmente redundante ya que es un fenómeno generalizado en la ecología. Esto debido a que algunos grupos de microorganismos muestran un alto grado de flexibilidad metabólica y tolerancia fisiológica a las condiciones ambientales que podrían resultar en comunidades microbianas que son resistentes al cambio. Estas características y otras relacionadas con los microorganismos, como abundancia, dispersión generalizada, y el potencial para un crecimiento rápido en diversos medios han llevado a la sugerencia de que las comunidades microbianas serán resistentes al cambio. Como las que se denotaron en el presente trabajo en el cual al momento de agregar el consorcio de las bacterias probióticas y vibriófagos por separados permitieron tener una resistencia por parte de los patógenos a dosis menores. Sin embargo al momento de agregar la mezcla del consorcio de cepas bacterianas y la

mezcla de vibriófagos esta no fue dependiente de la dosis ya que si lograron desplazar o romper el equilibrio de los patógenos permitiendo así tener un control sobre estos durante la producción de nauplios de *A. franciscana*.

Las bacterias por naturaleza presentan mecanismos antagónicos que les permiten subsistir en determinados ecosistemas. Así, varios investigadores, en pruebas *in vitro*, han utilizado la propiedad antagónica para la selección de cepas candidatas a control biológico. Sin embargo durante el presente estudio se observó que esta determinación es errónea ya que la mayoría de las cepas bacterianas suelen presentar una mayor actividad y/o liberación de metabolitos secundarios *in vivo* debido en muchas ocasiones a los diferentes medios presentes en diversos medios líquidos. Concordando esto con Dopazo *et al.* (1988), quienes utilizando medios líquidos, observaron que una bacteria marina cepa FP6 inhibió el crecimiento de cepas patógenas como *Aeromona hydrophila* B-32, *Aeromona salmonicida* ATCC 14174 y *V. anguillarum* R-82, por la producción de una sustancia antibiótica. Tal es el caso de las cepas probióticas empleadas durante el presente estudio, las cuales al momento de ser probadas contra *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* se hipotetiza que liberaron una sustancia inhibidora.

De igual manera, se observó que la liberación de sustancia no es igual en todas las bacterias, ya que al momento de agregarlas en mezcla, durante y después de la eclosión de *A. franciscana*, inhibieron por completo el desarrollo de *V. parahemolyticus* y *V. harveyi*, lo cual concuerda con los estudios realizados por Dhont y Lavens (1996), quienes demostraron que el agregar bacterias antagónicas a bacterias patógenas durante los cultivos de *Artemia* sp., en su mayoría permitieron tener una mejor tasa de crecimiento y sobrevivencia dentro de los cultivos axénicos, simultáneamente en un cultivo bajo condiciones no estériles. Douillet (1987), reportó que en estos tipos de cultivos, al igual que los axénicos, la tasa de sobrevivencia y desarrollo es similar, sin embargo, afirmó que el valor nutricional de *Artemia* sp. depende de la colonización espontánea de las bacterias tanto patógenas como probióticas.

Los eventos que precedieron la condición del uso de bacterias probióticas durante y después de la eclosión de *A. franciscana*, apoyan las observaciones en relación a que las bacterias patógenas oportunistas pueden llegar a ser controladas, en especial las del género *Vibrio* sp., las cuales muchas veces se presentan cuando los organismos se encuentran en estadios larvales puesto que en esta etapa de desarrollo sus defensas son bajas debido a la formación de su tracto digestivo.

Diversos estudios han establecido que el mecanismo de colonización, parece estar mediado por la participación de adhesinas específicas y la hidrofobicidad típica de este tipo de células. Actualmente, hay un modelo que propone que las células tienen capacidad para cambiar rápidamente su de superficie celular (hidrofóbico-hidrofílico) en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, lo que les confiere la capacidad de crecer con diversos componentes de la fuente de energía y establecer una relación estrecha a través del reconocimiento específico de ciertos componentes. Naidu et al., (1999), describe a los probióticos como complementos nutricionales a base de microorganismos que favorecen la fisiología del portador modulando la inmunidad sistemática, así como mejorando el equilibrio microbiano al prevenir la colonización de bacterias indeseables. Durante la utilización de bacterias probióticas, la adhesión es importante para que la colonización por parte de estas bacterias se lleve a cabo y de esta manera inhiban la proliferación de bacterias patógenas. Este fenómeno se conoce como exclusión competitiva y si esto no se lleva a cabo, las bacterias benéficas se consideran como microorganismos en tránsito y se eliminan junto con las heces sin haber ejercido su función probiótica de manera adecuada (Gatesoupe, 1999).

Lo cual concuerda con el presente estudio en el cual se observó que tanto probióticos como patógenos tienen la capacidad de adherirse a los quistes en determinadas zonas y que estos al momento de terminar el proceso estaban colonizados en su totalidad, lo cual, podía ser transmitido tanto a los organismos como en el agua de los sistemas de cultivo, permitiendo sufrir varias colonizaciones antes de establecerse una población madura. Por ello es que la temprana exposición a altas densidades bacterianas es importante para una

tolerancia inmunológica y así establecer una microbiota intestinal protectora; la cual, puede servir como suministro exógeno de nutrientes o factores esenciales en la sobrevivencia y crecimiento de fases tempranas del desarrollo larvario, lo cual favorece la formación de la microbiota autóctona en las larvas.

Se ha pronosticado con sobradas razones que es posible que, en ciertas enfermedades en los sistemas acuícolas, hayamos vuelto a la era preantibiótica. En lo que existe acuerdo generalizado es en que, tanto con el empleo de fagos como de alguno de los productos fágicos, estamos ante terapias novedosas y prometedoras que, usadas junto con los probióticos, pueden proporcionar un medio muy eficaz para combatir el preocupante problema de la producción de nauplios de *Artemia* sp. y cultivos larvarios. Todo ello propicia un escenario que garantiza la realización de nuevos estudios en el campo de la terapia fágica. Según Chibani-Chennoufi *et al.* (2004), los fagos líticos estables son comunes en sistemas con microbiota no establecida y que se encuentra en constante competencia lo cual proporciona condiciones adecuadas para la relativamente prolongada presencia de fagos líticos. Esto, según Baros *et al.* (1978); Jiang & Paul (1994), puede significar que estos fagos son altamente específicos, posiblemente con el genoma de tamaño mediano que no contiene regiones que pueden influenciar en la decisión de la ruta lítica/lisogénica pero debido a lo mismo se mantienen solamente durante el tiempo de residencia de la bacteria hospedera y en el caso de no presentarse una mutación que permita la infección de otras bacterias, estos fagos son eliminados del medio. Por ello en el presente trabajo de tesis se desarrolló un modelo el cual permitiera evitar este tipo de problemas de resistencia mediante la mezcla de diversos vibriófagos líticos los cuales tuvieran siempre un efecto durante la presencia de bacterias resistentes a cada uno de los fagos. Lo cual hace suponer que de esta manera se incrementó el rango de especificidad debido a que los vibriófagos en mezcla pudieron presentar o codificar sitios de reconocimiento para las variaciones en la estructura o composición de los receptores en la superficie bacteriana (Kutter *et al.*, 2005; Shivu *et al.*, 2007). De aquí la importancia de generar mezclas de vibriófagos las cuales permitan tener un control sobre

diversas especies de *Vibrio* sp. el cual suele estar presente en todos los sistemas de producción acuícolas, además de la producción de alimento vivo evitando con esto tener dos vías de control **i)** como medida de prevención de ingreso vía alimento vivo y **ii)** una medida de control en los sistemas de producción larvaria.

## CONCLUSIONES.

1. La manipulación de la comunidad bacteriana durante la eclosión de *Artemia franciscana* tiene un impacto directo en la eclosión y supervivencia de nauplios de *A. franciscana*. *Vibrio parahaemolyticus* y *V. harveyi* reducen severamente la eclosión de *A. franciscana* y su supervivencia, ya que éstos presentaron la capacidad de permanecer en el portador como parte de la microbiota.
2. El consorcio de microbiano empleado durante el presente estudio fue integrado por bacterias con potencial probiótico y su aplicación permite manipular el efecto de *Vibrio* sp. y la dominación. Aunque las cepas no mostraron efecto antagónico contra *Vibrio* sp. cuando se utiliza como un consorcio, tuvo un impacto definitivo en la abundancia y la capacidad de *Vibrio* sp. para inducir la mortalidad. Estas características se atribuyen a su capacidad para colonizar la mucosa intestinal, así como para competir por los nutrientes. Además, este cambio en la microbiota puede inducir mejoras en la calidad del agua, la supervivencia y el crecimiento *Artemia* a un nivel que justificara su uso extensivo.
3. Los fagos administrados durante el presente estudio demostraron poder eliminar a *Vibrio* sp., y presentaron la capacidad de reducir la mortalidad y mejorar el rendimiento de la producción de nauplios de *A. franciscana*. No obstante, es preciso aislar un mayor número de fagos para conseguir entidades más agresivas y mejores mezclas que mejoren los resultados terapéuticos obtenidos hasta el momento.

## RECOMENDACIONES

Es importante considerar más factores que puedan aportar información relevante acerca del mejoramiento del alimento vivo para los cultivos. El seguimiento de los cambios en el enriquecimiento de *Artemia franciscana* sería de mucha utilidad para interpretar los resultados de reducción de patógenos oportunistas y su ingreso a los sistemas de larvicultivo. También se recomienda hacer seguimiento detallado de las variaciones de diversas fuentes de probióticos como enriquecedores durante la producción de nauplios de *A. franciscana* para de esta manera tener mayor cantidad de información que pueda ser útil en el caso de un evento de mortalidad.

Además con la experiencia lograda en el presente estudio se recomienda:

- 1) Identificar y caracterizar las cepas probióticas aisladas de organismos sanos.
- 2) Conservarlas como cepas probióticas de referencia.
- 3) Respecto a la naturaleza de los compuestos antagónicos:
  - a) Identificar el grupo químico al que pertenecen los compuestos liberados por las cepas, los cuales pueden ayudar a entender los mecanismos de antagonismo bacteriano.
- 4) Analizar su efecto *in vivo* ya que el hecho de no presentar un efecto *in vitro* no representa que estas no pudieran ser candidatas a ser empleadas como probióticos
- 5) Analizar si estas colonizan el organismos y el tiempo que perduran en el y en los sistemas de larvicultivo.

Se recomienda profundizar estudios acerca de la capacidad de algunos fagos líticos que mejorar los protocolos y procedimientos de selección de fagos. Esto permitirá mejorar la situación y la seguridad de la fagoterapia en acuicultura. Para lo cual es necesario desarrollar más modelos de infección, lo que también implicaría la evaluación del impacto de las descargas de las aguas residuales en cuerpos de agua naturales.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abedon ST. 2009. Bacteriophage evolution and ecology. *Adv Appl Microbiol*;67:1–45.
- Abraham Jawahar T. & Palaniappan R. 2004. Distribution of luminous bacteria in semi-intensive penaeid shrimp hatcheries of Tamil Nadu, India. *Aquaculture* Vol. 232, Issues 1-4 81-90.
- Abraham, T.J., Palaniappan, R., 2004. Distribution of luminous bacteria in semiintensive penaeid shrimp hatcheries of Tamil Nadu, India. *Aquaculture* 232, 81–90.
- Alabi, A.O., Yudiati, E., Jones, D.A. y Latchford, J.W. 1997. Bacterial levels in penaeid larval cultures. 381-388. En: *Diseases in Asian aquaculture III*. (Flegel, T.W. y Macrea, I.H., Eds.). Asian Fisheries Society, Fish Health Section. Manila.
- Alagappan, K.M., B. Deivasigamani, S.T. Somasundaram & S. Kumaran. 2010. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and its specific phages from shrimp ponds in East Coast of India. DOI 10.1007/s00284-010-9599-0.
- Alday-Sanz, V., I. Karunasagar & I. Karunasagar. 2007. Compositions comprising lytic enzymes of bacteriophages for treating bacterial infections. WIPO Patent Application WO2007128348.
- Angulo, F. 2000. Antimicrobial agents in aquaculture: potential impact on public health. *APUA (Alliance Prud. Use Antib.) Newslett.* 18, 1–4.
- Apún-Molina J.P. 2007. Efecto de bacterias con potencial probiótico en el crecimiento y supervivencia de la tilapia *Oreochromis niloticus* (Linneaus 1758), cultivada en laboratorio. Tesis de Maestría. CIIDIR-IPN, Guasave, Sinaloa México.
- Austin, B. & D. A. Allen. 1982. Microbiology of laboratory-hatched brine shrimp (*Artemia*). *Aquaculture* 26 (3-4): 369-383.

- Balcázar JL, De Blas I, Ruiz-Zazuela I, Cunningham D, Vandrell D. & Muzquiz JL. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Vet Microbiol* 114: 173-186.
- Balcázar, J.L. & Rojas-Luna, T. 2007 Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibriospecies* confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Curr. Microbiol.* 55, 409-412.
- 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.
- Balcázar, J.L., Pintado, J. & Planas, M. 2010 *Bacillus galliciensis* sp. nov., isolated from faeces of wild seahorses (*Hippocampus guttulatus*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 892–895.
- Barlocher F. 1981. Fungi on the food and in the faeces of *Gammaruspulex*. *Trans Br Mycol Soc* 76:160-165.
- Baross A. John, Liston John, Morita Y. Richard. 1978. Incidents of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophages and other *Vibrio* bacteriophages in marine samples. *App Environ Microb.* 36: 492-499.
- Baross, J. A., J. Liston, and R. Y. Morita. 1978. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophages and other *Vibrio* bacteriophages in marine samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 492–9.
- Benetti, D. 2001. Proactive health management using probiotics in marine fish hatcheries. *The Advocate* 4: 30.
- Berger, C. 2000. Aportes de la biotecnología a la alimentación y a la inmunestimulación de camarones peneidos. 102-110. En: *Avances en Nutrición Acuicola V.* (Cruz, L., Ricque, D., Tapia, M., Olvera, M. y Civera, R. Eds.), *Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola.* Noviembre 2000. Mérida, Yucatán.

- Biswas, B., Adhya, S., Washart, P., Paul, B., Trostel, A.N., Powell, B. & Carlton, R., 2002. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun* 70: 204–210.
- Bogwald, J., Dalmo, R.A., Leifson, R.M., Stenberg, E. y Gildberg, A. 1996. The stimulatory effect of a muscle protein hydrolysate from Atlantic cod, *Gadus morhua* L., head kidney leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 6: 3-16.
- Boyd, C.E., Massaaut, L., 1999. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquac. Eng.* 20, 113–132.
- Brock, J.A. y Main, K.L. 1994. A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*. *World Aqua Soci.* Baton Rouge. 242.
- Brocks JA & Lea Master B, 1992 A look at the principal bacterial, fungal and parasitic diseases of farmed shrimp. In: Wyban J (Ed) Proceedings of the special session on shrimp farming. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge, LA, p 212-226.
- Bull, J.J., Levin, B.R., DeRouin, T., Walker, N., Bloch, C.A., 2002. Dynamics of success and failure in phage and antibiotic therapy in experimental infections. *BMC Microbiol.* 2, 35.
- Cabello, F.C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.* 8:1137-1144.
- Cai, J., Y. Han & Z. Wang. 2006. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from abalone (*Haliotis diversicolor supertexta* L.) postlarvae associated with mass mortalities. *Aquacult.* 257: 161-166
- Calendar, R. 2006. The bacteriophages. 2nd edition. Oxford University Press, EUA, 746 p.
- Carlson, K., 2005. Working with bacteriophages, common techniques and methodological approaches. In: Kutter, E., Sulakvelidze, A. (Eds.), *Bacteriophages: Biology and Applications*. CRC Press, USA, Washington DC, pp. 437–494.

- 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.
- Carmona-Pérez, R. 2006. Evaluación de una mezcla de bacterias y alimento inerte como alternativas para el cultivo de *Artemia*. Tesis de maestría. CICIMAR-IPN, La Paz, B.C.S., México.
- Carmona-Pérez. 2010. Evaluación de una mezcla de bacterias y alimento inerte como alternativas para el cultivo de *Artemia*. Tesis de maestría. CICIMAR-IPN La Paz BCS.
- Cazemier, A. E., Hackstein J. H., Op den Camp M. J., Rosenberg J. & Van der Drift C. 1997. Bacteria in the intestinal tract of different species of Arthropods. *Microb. Ecol.* 33:189-197.
- Ceballos, F.C., Prado, J. y Freire, A. 1996. Commercial management techniques for the control of vibriosis in South American shrimp farms. World Aquaculture '96. Abstracts. World Aquaculture Society. Baton Rouge.
- Chamberlain, G. 2001. Feed additives. *The Advocate* 4: 61-65.
- Chen, F.R., P.C Liu & K.K. Lee. 2000. Lethal attribute of serine protease secreted by *Vibrio alginolyticus* strains in Kurama Prawn *Penaeus japonicus*. *Zool. Natur.* 55: 94–99.
- Chibani-Chennoufi, S., A. Bruttin, M-L. Dillmann, & H. Brüssow. 2004. Phage-Host Interaction: an Ecological Perspective. *J. Bacteriol.*, 186:3677-3686.
- 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., Karunasagar I & Karunasagar I., 2001 Inhibition of shrimp pathogenic *Vibrios* a marine *Pseudomonas* I-2 strain, *Aquaculture* 208: 1-10.
- Chythanya R., Karunasagar I., Karunasagar I., 2001 Inhibition of shrimp pathogenic *Vibrios* a marine *Pseudomonas* I-2 strain, *Aquaculture* 208: 1-10.
- Coates, M. 1975. Gnotobiotic animals in research: their uses and limitations. *Lab. Anim.* 9: 275-282.
- Coeuret, V., Guwguen, M. y Vernoux, J.P. 2004. Numbers and strain of lactobacilli in some probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* 97: 147–156.
- Coutteau, P., Lavens, P. & Sorgeloos, P., 1990. Baker's yeast as a potential substitute for live algae in aquaculture diets: *Artemia* as a case study. *J. World Aquacult. Soc.* 21, 1 –9.
- D'Agostino, A. 1980. The vital requirements of *Artemia*: physiology and nutrition. En: The brine shrimp *Artemia* D'Agostin Vol 2. Physiology, Biochemistry, Molecular Biology. G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels & E. Jasper (eds), Universa Press, Wetteren, Belgium. Pp. 55-82.
- Dalmin, G., Kathiresan, K. y Purushothaman, A. 2002. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian J. Exp. Biol.* 39: 939-942.
- Danelishvili, L., Young, L.S., Bermudez, L.E., 2006. In vivo efficacy of phage therapy for *Mycobacterium avium* infection as delivered by a nonvirulent mycobacterium. *Microb. Drug Resist.* 12, 1–6.
- Decamp, O., D. J. Moriarty y D. Lavens. 2008. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. *Aquaculture Research*, 39: 334-338.

- Dehasque, M., De Wolf, T., Candreva, P., Coutteau, P. & Sorgeloos, P., 1998. Control of bacterial input through the live food in marine fish hatcheries. In: Grizel, H., Kestemont, P. (Eds.), *Aquaculture and water: fish culture, shellfish culture and water usage*. Abstracts of contributions presented at the International Conference.
- Dehasque, M., Verdonck, L., Sorgeloos, P., Swings, J., Léger, P. & Kersters, K. 1991. Determination of the bacterial contamination in live food production systems in marine fish hatcheries in southern Europe. In *LARVI '91* (Special Publication of the European Aquaculture Society no. 15), pp. 339–402. Edited by P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers & F. Ollevier. Ghent, Belgium: European Aquaculture Society.
- Devresse, B., M. Romdhane, M. Buzzi, J. Rasowo, P. Léger, J. Brown, and P. Sorgeloos. 1990. Improved larviculture outputs in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* fed a diet of *Artemia nauplii* enriched with n3–HUFA and phospholipids. *World Aquaculture* 21(2): 123–125.
- Dhont, J., & P. Lavens. 1996. Tank production and use of on grown *Artemia*, p. 164– 195. In P. Lavens and P. Sorgeloos (ed.), *Manual of the production and use of live food for aquaculture*. Food and Agriculture Organization Fisheries Technical Paper No. 361. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.
- Donlan, R. M. 2001. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Healthcare Epidemiology* 33:1387-1392.
- Dopazo, C., M. Lemos, C. Lodeiros, J. Bolinches, J. Barja, & A. Toranzo (1988). Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *J Appl Bacter.* 65:97-101.

- 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.
- Douillet, P. 1987 Effect of the bacteria on the nutrition of the brine shrimp *Artemia* fed on the dried diets. In P. Sorgeloos, D.A. Bengtson, W. Decler and E. Jaspers (eds), *Artemia* Research and its Applications. Vol 3. Ecology, Culturing Use in Aquaculture. Universa Press. Wetteren, Belgium, 259-308.
- Douillet, P.A. 2000. Bacterial additives that consistently enhance rotifer growth under synxenic culture conditions. 2. Use of single and multiple bacterial probiotics. *Aquaculture*. 182: 241-248.
- Douillet, P.A., and Langdon, C.J. 1994. Use of a probiotic for the culture of larvae of the pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 119: 25–40.
- Douillet, P. 1995. Microbial management in marine fish larviculture. P. Lavens, E. Jasper & I. Roelants (eds), Larvi'95-Fish & Shellfish larviculture symposium, abstracts, European Aquaculture Society, Special Publication 24, Gent, Belgium, pp 477.
- Espinosa-Plascencia, A. & Bermúdez-Almeda, M. C. 2004. Uso de antibióticos y generación de resistencia bacteriana. Industria acuícola. Enlace. Centro de investigación en alimentos y desarrollo. Laboratorio de análisis biológicos. Sonora. México. Pag. 18-19.
- French, N.P., Kelly, L., Jones, R., Clancy, D., 2002. Dose–response relationship for foot and mouth disease in cattle and sheep. *Epidemiol. Infect.* 128, 325–332.
- Fuller R. 1992. Probiotics: History and Development of Probiotics. Chapman & Hall, New York.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66: 365-378.

- García-Rodríguez R. 2003. Relevancia de las bacterias ácido lácticas en los diferentes estadios del cultivo del camarón. Tesis de Ingeniería en pesquerías, UABCS, La Paz, B.C.S., México.
- Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180: 147-165.
- Gatesoupe, F.J., 1982. Nutritional and antibacterial treatments of live food organisms: the influence on survival, growth rate and weaning success of turbot *Scophthalmus maximus*. *Ann. Zootech.* 4, 353–368.
- Gatesoupe, F.J., Arakawa, T., Watanabe, T., 1989. The effect of bacterial additives on the production rate and dietary values of rotifers as food of Japanese flounder *Paralichthys oliíaceus*. *Aquaculture* 83, 39–44.
- Gildberg, A., Mikkelsen, H., Sandaker, E. y Ringo, E. 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia.* 352: 279-285.
- Goebel, W., T. Chakraborty & J. Kreft. 1988. Bacterial hemolysins as virulence factors. *A. van Leeuw.* 54: 453:463.
- Gómez-Gil, B., L. Tron-Mayen, 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.
- Gómez-Gil, B., Roque, A. & Turnbull, J.F., 2000. The use and selection of probiotics bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 19, 259-270.
- Gómez-Gil, B., Thompson, F. L., Thompson C.C., Garcia-Gasca, A., Roque, A. & Swings, J. 2004 *Vibrio hispanicus* sp. nov., isolated from *Artemia* sp. and sea water in Spain. *J. syst evolu Microbiol,* 54, 261-265.



- Gorospe, J. N., Nakamura, K., Abe, M. & Higashi S. 1996a. Nutritional contribution of *Pseudomonas* sp. in *Artemia* culture. *Fish. Sci* 62 (6): 914-918.
- Gorospe, J., & K. Nakamura. 1996b. Associated bacterial microflora in *Artemia*-rice branculture. *Isr. J Aquacul* Bamidgeh 48:99–107.
- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, T.F., 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 969–973.
- Griffith, D. R. W. 1995. Microbiology and the role of probiotics in Ecuadorian shrimp hatcheries. En P. Lavens, E. Jasper & I. Roelants (eds), Larvi'95-Fish & Shelfish larviculture symposium, abstracts, European Aquaculture Society, Special Publication 24, Gent Belgium, 478. pp.
- Gullian, K.M. 2001. Efecto del estudio inmunoestimulante de bacterias prebióticas asociadas al cultivo de *Penaeus vannamei*. Tesis. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. 64.
- Gunther, D.C. & Catena, A., 1980. The interaction of *Vibrio* with *Artemia* nauplii. In: G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels & E. Jaspers (Editors). The Brine Shrimp *Artemia*, 1. Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 213-221.
- Haldar S. Chatterjee. Sugimoto N. Das S. Chowdhury N. Hinenoya A. Asakura M. & Yamasaki S. 2010. Identification of *Vibrio campbellii* isolated from diseased farm shrimps, south India and establishing its pathogenic potential in *Artemia* model. *Microbiology*. DOI 10.1099/mic.0.041475-0.
- Hanlon, G.W. 2007. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30: 118-28.
- Heitmann, G.I., L. Jofré, J.C. Hormázabal, A. Olea, C. Vallebuona & C. Valdés. 2005. Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por *Vibrio parahaemolyticus*. *Rev. Chil. Infect.* 22: 131-140
- Hernández, C., J. Ulloa, J.A. Vergara, R. Espejo & F. Cabello. 2005. Infecciones por *Vibrio parahaemolyticus* e intoxicaciones por algas: problemas emergentes de salud pública en Chile. *Rev. Méd. Chile.* 133: 1081-1088

- Hernández-Serrano, P. 2005. Responsible use of antibiotics in aquaculture. FAO Fish.Tech. Paper. No. 469. Rome, FAO. 97 p.
- Hipolito-Morales, A. 2005. Efecto de las bacterias *Microbacterium* sp. y *Exigobacterium* sp. en la supervivencia y desarrollo larval de *Artemia franciscana* y *Litopenaeus vannamei* en cultivos xénicos. Tesis de Maestría CICIMAR-IPN, La Paz, B.C.S., México
- Hoj Lone. Bourne David & Hall Michael R. 2009. Localization, abundance and community structure of bacteria associated with *Artemia*: Effects of nauplii enrichment and antimicrobial treatment. *Aquaculture* 293, Issues 3-4: 278-285.
- 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.
- Holt, G.U. & F. Sun. 1991. Lipase activity and total lipid content during early development of red drum *Sciaenops acellatus*, p. 30-33. In P. Lavens, P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers & F. Oliver (eds.). Larvi '91. Fish and Crustacean Larviculture Symposium. Gent, Bélgica.
- Hsu C.H., Lo C.Y., Liu J.K., Lin C.S., 2000, Control of the eel *Anguilla japonica* pathogens *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* by bacteriophages, *Journal of the fisheries society of Taiwan*, 27:21-31.
- Igarashi, M. A., Sugita, H. & Deguchi, Y. 1989. Microflora associated with eggs and nauplii of *Artemia salina*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55, 2045.
- Intriago, P. & Jones, D.A., 1993. Bacteria as food for *Artemia*. *Aquaculture* 113, 115–127.
- Irianto A, Robertson PA, Austin B. 2003. Oral administration of formalin-inactivated cells of *Aeromonas hydrophila* A3–51 controls infection by atypical *A. salmonicida* in goldfish, *Carassius auratus* (L.). *J Fish Dis* 26:117–120.
- Irianto, A., and B. Austin, 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, 25: 333-342.

- Jayasree, L., P. Janakiram & R. Madhavi. 2006. Characterization of *Vibrio* spp. Associated with Diseased Shrimp from Culture Ponds of Andhra Pradesh (India). *J. World Aquacult. Soc.* 37: 523-532.
- Jiang, S.C. & J.H. Paul. 1994. Seasonal and diel abundance of viruses and occurrence of lysogeny/bacteriocinogeny in the marine environment. *Mar. Ecol-Prog. Ser.*, 104:163-172.
- Karunasagar I, Pair R, Malathi GR, & Karunasagar I. 1994. Mass mortality of *Penaeus mondon* larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 128:203-209.
- Karunasagar I, Shivu MM & Girisha SK. 2007 Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. *Aquaculture* 268(1-4):288-292.
- Karunasagar, I., M.G. Vinod, M.D. Bob Kennedy, A. Vijay, A. Deepanjali, K.R. Umesh, & I. Karunasagar. 2005. Biocontrol of bacterial pathogens in aquaculture with emphasis on phage therapy. En: Walker, P., R. Lester & M.G. Bondad-Reantaso (Eds). *Diseases in Asian Aquaculture V. Fish Health Section, Asia.*
- Kasman, L.M., Kasman, A., Westwater, C., Dolan, J., Schmidt, M.G., Norris, J.S., 2002. Overcoming the phage replication threshold: a mathematical model with implications for phage therapy. *J. Virol.* 76, 5557-5564.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J., Gibson, L., 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274, 1-14.
- Keynan, A., K., Nealson, H. Sideropoulos, J. W. Hastings. 1974. Marine transducing bacteriophage attacking a luminous bacterium. *Journal Virology.* 14:333-340.
- Kumar, R., Mukherjee, S., Prasad, K.P., Pal, A.K., 2006. Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.). *Aquaculture Research* 37, 1215-1221.

- Kuo-Kau, L., Shu-Ru, Y., Ferng-Ruey, Y., Tun-I, Y y Ping-Chun, L. 1996. Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn *Penaeus monodon*. *Curr. Microbiol.* 66: 225-231.
- Kutter, E. & A. Sulakvelidze. 2005. Bacteriophages: biology and applications. CRC Press, Boca Raton, FL, 510 p.
- Lacey, L.A. & W.M. Brooks. 1997. Initial handling and diagnosis of diseased insects. En: L.A. Lacey (ed). Manual of techniques in insect pathology. Academic Press. San Diego, CA. Rodríguez, M., E. Botero, C.A. Iregui & J. Figueroa. 2005. *Aeromonas hydrophila* extracellular products extraction and its effects on tilapia roja (*Oreochromis spp.*) and cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Acta Biol. Col.* 10: 75-93.
- Lavilla-Pitogo, C.R., E.M. Leano & M.G. Paner. 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp *Penaeus monodon* associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. *Aquacult.* 164: 337–349.
- Leger, P., Naessen, E. and Sorgeloos, P. 1987. International study on Artemia XXXV. Techniques to manipulate the fatty acids profile in Artemia nauplii and the effect on its nutritional effectiveness for the marine crustacean *Mysidopsis bahia* (M). Artemia research and its applications. *Aquaculture.* 3: 411-724..
- Levin, B.R., Bull, J.J., 1996. Phage therapy revisited: the population biology of a bacterial infection and its treatments with bacteriophage and antibiotics. *Am. Nat.* 147, 881–898.
- Leyton, Y. & C. Riquelme. 2008. Vibrios en los sistemas marinos costeros. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 43: 441-456.
- Lightner DV, 1988 *Vibrio* disease of Penaeid shrimp. Disease diagnosis and control in North America marine aquaculture. In: Sinderman CJ, Lightner DV (Eds) *Developments in aquaculture and fishers science.* Elsevier, Amsterdam, p 42-47.

- Lightner, D.V. 1996. Disease of culture penaeid shrimp. En: J.P. McVey (ed). Handbook of Mariculture. Crustacean Aquaculture. 2a Edic. CRC. Press. Boca Raton. Markridis, P., Ø. Bergh, J. Skjermo & O. Vadstein. 2001. Addition of bacteriobioencapsulated in *Artemia metanauplii* to a rearing system for halibut larvae. *Aquacul International* 9: 225-235.
- Lomelí-Ortega, C.O. 2011. La fagoterapia como estrategia para reducir la mortalidad por vibriosis en larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría en ciencias. CICIMAR-IPN. La Paz, B. C. S. 98 pp.
- López-Torres, M. A. & Liza´ rraga-Partida, M. L. 2001. Bacteria isolated on TCBS media associated with hatched Artemia cysts of commercial brands. *Aquaculture* 194, 11–20.
- Maeda, M., K. Nogami, M. Kanematsu & K. Hirayama. 1997 .The concept of biological control methods in aquaculture. *Hydrobiologia*, 358: 285-290.
- 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
- Makridis, P., Bergh, Ø., Skjermo, J. and Vadstein, O. 2001. Addition of bacteria bioencapsulated in *Artemia metanauplii* to a rearing system for halibut larvae. *Aquac Int* 9, 225–235.
- Makridis, P., Fjellheim, A. J., Skjermo, J. & Vadstein, O. 2000. Control of the bacterial flora of *Brachionus plicatilis* and *Artemia franciscana* by incubation in bacterial suspensions. *Aquaculture* 18, 205–216.
- Maldonado-Galdeano. C., De Moreno-De Leblanc, A., Carmuega, E., Weill, R. & Perdigon, G. 2009. Mechanisms involved in the immunostimulation by probiotic fermented milk. *J. Dairy Res.* 76: 446-454.

- Marques A., Ollervier F., Verstrate W., Sorgeloos P., & Bossier P. 2005. Gnotobiotically grown aquatic animals: opportunities to investigate host-microbe interactions. *J appl microbial*. 100 903-918.
- Marques, A., Thanh, T.H., Sorgeloos, P. & Bossier, P., 2006. Use of microalgae and bacteria to enhance protection of gnotobiotic *Artemia* against different pathogens. *Aquaculture* 258, 116–126.
- Martínez-Díaz S.F. & Hipólito-Morales A. 2013. Efficacy phage therapy to prevent mortality during the vibriosis of brine shrimp. *Aquaculture* (400-401) 120-124
- Martínez-Díaz, S.F. & B. Anguas-Vélez. 2002. Incidencia de *Vibrio* durante infecciones dérmicas y sistémicas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus* Steindacher: (1868) en cautiverio. *Cienc. Mar.* 28: 347-356
- Matsuda, T., Freeman, T.A., Hilbert, D.W., Duff, M., Fuortes, M., Stapleton, P.P., Daly, J.M., 2005. Lysis-deficient bacteriophage therapy decreases endotoxin and inflammatory mediator release and improves survival in a murine peritonitis model. *Surgery* 137, 639–646.
- Matsuzaki., M R., Jumpei U., Shingo S., Takako U., Masayuki K., Masahiko I., Toshikazu T. M., Hiroshi W. & Shosuke I. 2005. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J Infect Chemother* 11:211–219.
- Merchie, G., Lavens, P., Dhert, P., Dehasque, M., Neils, H., De Leenheer, A. & Sorgeloos P. 1995. Variation of ascorbic acid content in different live food organisms. *Aquaculture*. 134: 325-337.
- Merril, C.R., Biswas, B., Carlton, R., Jensen, N.C., Creed, G.J., Zullo, S., Adhya, S., 1996. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 3188–3192.
- Metchnikoff, E. 1907. *The prolongation of life. Optimistic studies.* London: Butterworth–Heinemann.
- Moat, A.G., J.W. Foster & M.P. 2002. *Spector. Microbial Physiology.* Wiley-Liss. 4th edition.. New York. 714 p.

- Mohney LL, Lightner DV & Bell TA, 1994. An epizootic of vibriosis in Ecuador pond-reared *Penaeus vannamei* *J World Aquacult Soc.* 25: 116-125.
- Moore M.M & Strom M.S. 2003. Infection and mortality by the yeast *Metschnikowia bicuspidate* var. *bicuspidate* in Chinook salmon fed live adult brine shrimp *Artemia franciscana* *Aquaculture* 220 43-57.
- Moriarty, D.J.W. 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture* 151: 333–349.
- Moriarty, D.J.W. 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. En: Proc. 8th Internat. Symp. Microbial interactions in aquaculture. (Bell, C.R., Brylinsky, M. y Johnson-Green, M., Eds.). Soc. Microb. Ecol. Halifax. [http://aq.arizona.edu/azaqua/tilapia/tilapia\\_shrimp/moriarty](http://aq.arizona.edu/azaqua/tilapia/tilapia_shrimp/moriarty).
- Mulder, R.W., Havenaar, R. y Huis in't Veld, J.H. 1997. Intervention strategies: the use of probiotics and competitive exclusion microfloras against contamination with pathogens in pigs and poultry. 187-207. En: Fuller, R. (Ed.). Probiotics 2: Applications and practical aspects. Chapman and Hall, London.
- Munro, P.D., Henderson, R.J., Barbour, A. & Birkbeck, T.H., 1999. Partial decontamination of rotifers with ultraviolet radiation: the effect of changes in the bacterial load and flora of rotifers on mortalities in start-feeding larval turbot. *Aquaculture* 170, 229–244.
- Musgrove, R. J. 1988. Digestive ability of the freshwater crayfish *Paranephrops zealandicus* (White) (parastacidae) and the role of microbial enzymes. *Freshwater Biol* 20:305-314.
- Naidu, A.S., Bidlack, W.R., Clemens, R.A., 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Food Sci.* 39, 13–126.
- Nakai T. 2010. Application of bacteriophages for control of infectious diseases in aquaculture. In: Sabour PM, Griffiths MW (eds) Bacteriophages in the control of food- and waterborne pathogens. American Society for Microbiology Press, Washington, pp 257–272

- Nakai, T. & Park, S.C. 2002. Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Res Microbiol.* 153: 13–18.
- Nakai, T., R. Sugimoto, K.H. Park, S. Matsuoka, K. Mori, T. Nishioka, & K. Naruyama. 1999. Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garviae* infection in yellowtail. *Dis. Aquat. Org.*, 37:33-41.
- Nakanishi, H., Iida Y., Maeshima K., Teramoto T., Hosaka Y., Ozaki M. 1966. Isolation and properties of bacteriophages of *Vibrio parahaemolyticus*. *Biken Journal* 9:149-157.
- Newman, S. 2000. Prevención de enfermedades del camarón de cultivo. *Panorama Acuicola*. 5: 22-23.
- Olafsen, J.A., Roberts, R.J., 1993. Salmon disease. In: Heen, K., Monahan, R.L., Utter, F. (Eds.), *Salmon Aquaculture*. Fishing News Books, Oxford, pp. 166-186.
- Olsen A.I., Olsen Y., Attramadal, Christine K. Birkbeck T.H., Skjermo J & Vadstein O. 2000. Effects of short term feeding of microalgae on the bacterial flora associated with juvenile *Artemia franciscana* *Aquaculture* 190: 11-25.
- Orozco-Medina, 2001. Manejo bacteriano del cultivo de *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906); aislamiento, caracterización y efecto en el cultivo larvario de *Artemia*, de bacterias heterótrofas aerobias asociadas a quistes comerciales de *Artemia*. Tesis de maestría CIBNOR La Paz BCS.
- Paris, M.E. 2005. Intoxicación por *Vibrio parahaemolyticus*. *Cuad. Méd. Soc.* 45: 43-47.
- Park, S.C. & Nakai, T., 2003. Bacteriophage control of *Pseudomonas plecoglossicida* infection in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis Aquat Organ* 53: 33–39,
- 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.



- Patra, S.K. & Mohamed, K.S., 2003. Enrichment of *Artemia nauplii* with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* and its resistance against a pathogenic *Vibrio*. *Aquacult Int* 11, 505–514.
- Pavlos Makridis, Anders Jon Fjellheim, Jorunn Skjermo, Olav Vadstein. 2000. Control of the bacterial flora of *Brachionus plicatilis* and *Artemia franciscana* by incubation in bacterial suspensions. *Aquaculture* 185: .207–218.
- Payne R. J. H, Phil D, & Jansen V. A. A. 2000. Phage therapy: the peculiar kinetics of self-replicating pharmaceuticals. *Clin Pharmacol Ther* ;68:225–230.
- Payne, M., Oakey, J., Owens, L., 2004. The ability of two different *Vibrio* spp. bacteriophages to infect *Vibrio harveyi*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *J. Appl. Microbiol.* 97, 663–672.
- Payne, R.J., Jansen, V.A., 2001. Understanding bacteriophage therapy as a density-dependent kinetic process. *J. Theor. Biol.* 208, 37–48. Payne, R.J., Phil, D., Jansen, V.A., 2000. Phage therapy: the peculiar kinetics of self-replicating pharmaceuticals. *Clin. Pharm. Ther.* 68, 225–230.
- Phumkhachorn P, & Rattanachaikunsopon P. 2010. Isolation and partial characterization of a bacteriophage infecting the shrimp pathogen *Vibrio harveyi*. *Afr J Microbiol Res* 4(16):1794–1800.
- Provasoli, L. & Shiraishi K. 1959. Axenic cultivation of the brine shrimp *Artemia salina*. *BIOL. Bull.*, 117: 347-355.
- Puente, M.E, Vega-Villasanta, F., Holguin, G. & Bashan, Y 1992. Susceptibility of the brine shrimp *Artemia* and its pathogen *Vibrio parahaemolyticus* to chlorine dioxide in contaminated seawater. *J appl Bacteriol* 73, 465-471.
- Quiroz-Guzmán E., Balcázar J.L., Vázquez-Juárez R., Cruz-Villacorta A.A., Martínez-Díaz S.F. 2013. Proliferation, colonization, and detrimental effect of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* during brine shrimp hatching. *Aquaculture in press*

- Quiroz-Guzmán, E. 2005. Aislamiento de bacterias y fagos para el control biológico de *Vibrio* spp. durante la eclosión de *Artemia*. Tesis de maestría en ciencias. CICIMAR -IPN. La Paz, B.C.S. 88 pp.
- Rico-Mora R, & Voltolina D 1995. Effects of bacterial isolates from *Skeletonema costatum* cultures on the survival of *Artemia franciscana* nauplii. *J Invertebr Pathol* 66:203–204
- Riquelme, C., Araya, R., Escribano, R., 2000. Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. *Aquaculture* 181, 25-36.
- Rodríguez, M., E. Botero, C.A. Iregui & J. Figueroa. 2005. Aeromonas hydrophila extracellular products extraction and its effects on tilapia roja (*Oreochromis* spp.) and cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Acta Biol. Col.* 10: 75-93.
- Ronda C., Vázquez M., López R. 2003. Los bacteriófagos como herramienta para combatir infecciones en acuicultura. *Aquatic*, 18: 3-10.
- Saulnier D., Haffner P., Gaorant C., Levy P. & Ansquer D. 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture* 191: 133-144.
- Saulnier, D., P. Haffner, C. Goarant, P. Levy & D. Ansquer. 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture*, 191:133–144.
- Schimel JP. 2001. In *Global Biogeochem Cycles in the Climate System*, eds Schulze ED, et al. (Academic, San Diego, CA), pp 239–254.
- Schoolnik, G.K., Summers, W.C., Watson, J.D., 2004. Phage offer a real alternative. *Nat. Biotechnol.* 22, 505–506.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C. & Walsh, T.R. 2001. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int. J. Antimicrob. Agents* 17: 431–437.

- Shivu, M.M., B.C. Rajeeva, S.K. Girisha, I. Karunasagar, G. Krohne & I. Karunasagar. 2007. Molecular characterization of *Vibrio harveyi* bacteriophages isolated from aquaculture environments along the coast of India. *Environ. microbiol.*, 9(2):322-331.
- Simões, N., Jones, D., Soto-Rodríguez, S., Roque, A. y Gómez-Gil, B. 2002. 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. En: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia -Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (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.
- Skjermo, J. & O. Vadstein. 1999. Technical for microbial control in the intensiverearing of marine larvae. *Aquaculture* 177: 333-343.
- Skjermo, J., Salvesen, I., Oie, G., Olsen, Y., Vadstein, O., 1997. Microbially matured water: a technique for selection of a non-opportunistic bacterial flora in water that may improve performance of marine larvae. *Aquaculture International*. 5, 13– 28.
- Skurnik M., Pajunen M. & Kiljunen S. 2007. Biotechnological challenges of phage therapy. *Biotechnol Lett* 29:995–1003.
- Smith, H.W., Huggins, M.B., Shaw, K.M., 1987. The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages. *J. Gen. Microbiol.* 133, 1111–1126.
- Sogerloos, P., Dhert, P., & Candevra, P., 2001. Use of brine shrimp, *Artemia* spp. in marine fish larviculture. *Aquaculture* 200, 147–159.
- Sorgelooos, P., Lavens. P., Léger, Ph, & Tackaert. W. 1991. State of the larviculture of fish and shellfish. 3-5 p
- Sorgelooos, P. 1972. The influence of light on the growth rate of larvae of the brine shrimp, *Artemia salina* L. *Biol. Jb. Dodonaea* 40:317-322.

- Sorgeloos, P. 1972. The influence of light on the growth rate of larvae of the brine shrimp, *Artemia salina* L. *Biol. Jb. Dodonaea* 40:317-322.
- Sorgeloos, P., Coutteau, P., Dhert, P., Merchie, G., Lavens, P., 1998. Use of brine shrimp, *Artemia* spp., in larval crustacean nutrition: a review. *Rev. Fish. Sci.* 6, 55–68.
- Sorgeloos, P., Lavens, P., Léger, P., Tackaert, W., & Versichele, D., 1986. Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. The Belgian Administration for Development Cooperation. United Nations Food and Agriculture Organization, Belgium. 319 pp.
- Sotomayor M. y Balcázar J. L. 2003. Inhibición de vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas *Revista AquaTIC*, 19, 9-15. <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=p&c=156>.
- Soto-Rodríguez Sonia A, NunoSimoës, Ana Roque, & Bruno Gomez-Gil, 2006, Pathogenicity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminescent vibrios, *Aquaculture* 258 109-115
- Soto-Rodríguez S., Roque A., Lizarraga-Partida M. L., Guerra-Flores A. L., & Gómez-Gil B., 2003 Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana* nauplii, *Dis aquat organ.* Vol 53: 231-240.
- Straub D.V & Dixon B.A. 1993. Bacterial flora of the brine shrimp *Artemia franciscana* from a hypersaline pond in San Francisco Bay, California. *Aquaculture* 118: 309-313.
- Suginta, W., A. Vongsuwan, C. Songsiriritthigul, H. Prinz, P. Estibeiro, R.R. Duncan, J. Svasti & L.A. Fothergill-Gilmore. 2004. An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: cloning, expression, mass and sequence analyses, and chitin hydrolysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 424: 171:180.
- Sugita H, Shibuya K, Shimooka H, Deguchi Y (1996) Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish. *Aquaculture* 145: 195-203.

- Sulakvelidze, A., A.Z. & J.G. Morris Jr. 2001. Bacteriophage therapy Antimicrobial. *Agents Chemother.* 208, 649-659.
- Thacker, P.D., 2003. Set a microbe to kill a microbe: Drug resistance renews interest in phage therapy. *JAMA* 290: 3183–3185.
- Vadstein, O., Øie, G., Olsen, Y., Salvesen, I., Skjermo, J. and Skjåk-Bræk, G. 1993. A strategy to obtain microbial control during larval development of marine fish. In: *Fish Farming Technology* (eds) H. Reinertsen, L.A. Dahle, L. Jørgensen and K. Tvinnereim) A.A. Balkema, Rotterdam, Netherlands, pp. 69-75.
- Venkat, H.K., Sahu, N.P., & Jain, K.K., 2004. Effect of feeding Lactobacillusbased probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobranchium rosenbergii*. *Aqua Res* 35, 501–507.
- Verdonck, L., Swings, J., Kersters, K., Dehasque, M., Sorgeloos, P. & Leger, P. 1994. Variability of the microbial environment of rotifer *Brachionis plicatilis* and *Artemia* production systems. *J World Aquacult Soc* 25, 55–59.
- Verpraet, R., Chair, M., Le'ger, P., Nelis, H., Sogerloos, P. & De Leenheer, A., 1992. Live-food mediated drugdelivery as a tool for disease treatment in larviculture. The enrichment of therapeutics in rotifers and Artemianauplii. *Aquac. Eng.* 11, 113– 139.
- Verschuere, L., G. Rombaur, P. Soogerloos & W. Verstrate. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev*, 4 (64): 655-671.
- Verschuere, L., G. Rombaut, G. Huys, J. Dhant, P. Sorgeloos, & W. Verstraete 1999. Microbial control of the Culture of *Artemia* Juveniles throughPreemptive Colonization by Selected Bacterial Strains. *Appl Environ Microbiol* 65(6) 2527-2533.
- Verschuere, L., H. Heang, G. R. Criel, P. Sogerloos & W. Verstrate. 2000b. Selected bacterial strains protect *Artemia* spp. from the pathogenic effects of *Vibrio proteoliticus* CW8T2. *Appl. Environ Microbiol.*, 66 : 1139-1146.

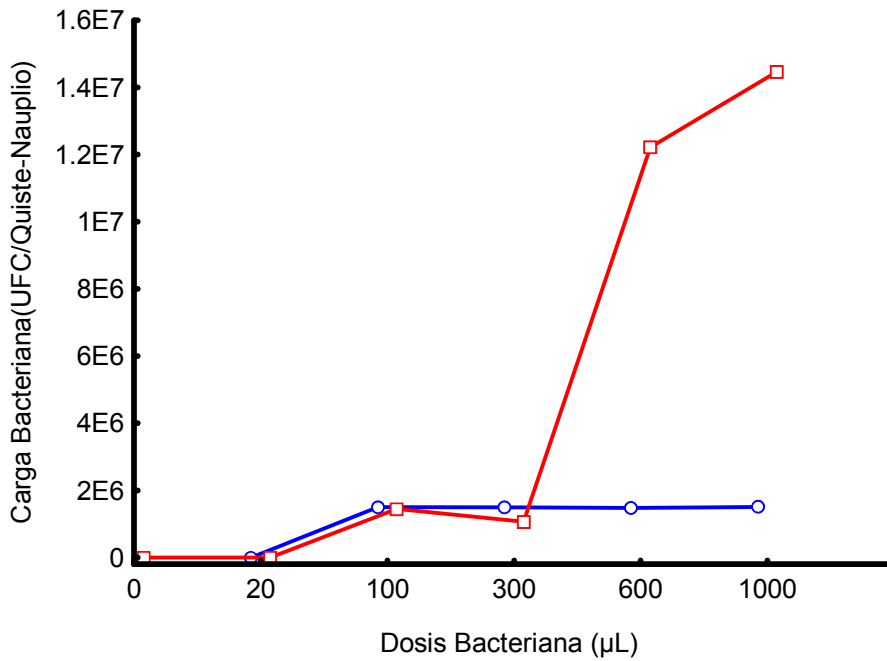
- Verschuere, L., J. Dhont, P. Sogerloos y W. Verstrate. 1997. Monitoring biolog patterns and r/K strategists in the intensive culture of *Artemia* juveniles. *J. Appl. Microbiol.*, 83: 603-612
- Verschuere, L., Rombaut, G., Huys, G., Dhont, J., Sogerloos, P. & Verstrate, W., 1999. Microbial control throughpre-emptive colonization by selected bacterial strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2527– 2533.
- Villamil, L., Figueras, A., Planas, M. & Novoa, B., 2003. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture* 219, 43–56.
- 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.
- Wagenaar, J.A., Van Bergen, M.A., Mueller, M.A., Wassenaar, T.M., Carlton, R.M., 2005. Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. *Vet. Microbiol.* 109, 275–283.
- Wainwright, P.F & Mann, K. H. 1982. Effect of antimicrobial substances on the ability of the mysid shrimp *Mysis stenolepis* to digest cellulose. *Mar Ecol Prog Ser* 7:309-313.
- Wang, Q., L. M. Nunan y D. V. Lightner. 2000. Identification of genomic variations among geographic isolates of white spot syndrome virus using restriction analysis and Southern blot hybridization. *Diseases of Aquatic Organisms* 43:175-181.
- Wang, X., H. Li., X. Zhang, Y. Li, W. Ji, and H. Xu, 2000. Microbial flora in the digestive tract of adult penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*). *J.Ocean. Univ. Qingdao*, 30: 493-498.

- Watanabe, R., Matsumoto, T., Sano, G., Ishii, Y., Tateda, K., Sumiyama, Y., Uchiyama, J., Sakurai, S., Matsuzaki, S., Imai, S., Yamaguchi, K., 2007. Efficacy of bacteriophage therapy against gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 446–452.
- Weiss, R.A. 2002. Virulence and pathogenesis. *Trends Microbiol.* 10: 314-317
- Weld, R.J., Butts, C., Heinemann, J.A., 2004. Models of phage growth and their applicability to phage therapy. *J. Theor. Biol.* 227, 1–11.
- Westerdahl, A., Olsson, J., Kjelleberg, S., Conway, P., 1991. Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*)-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 2223-2228.
- Weston, D.P. 1996. Environmental considerations in the use of antibacterial drugs in aquaculture. 140-165. En: *Aquaculture and water resources management*. (Baird, D., Beveridge, M.V.M., Kelly, L.A. y Muir, J.F. Eds.). Blackwell, Oxford, 214 p.
- Wheeler Ray, Yudin A.I. & Clark W.H. 1979. Hatching events in the cysts of *Artemia salina*. *Aquaculture* 18, 59-67.
- Wietz Matthias, Hall Michael R. & Hoj Lone. 2009. Effects of seawater ozonation on biofilm development in aquaculture tanks. *Syst appl microbial.* Vol.32 Issue 4: 266-277.
- Wouters, R., L. Gómez, P. Lavens y J. Calderón. 1999. Feeding enriched *Artemia* biomass to *Penaeus vannamei* broodstock: its effect on reproductive performance and larval quality. *Journal of Shellfish Research* 18(2):651-656.
- Wu J.L., Chao W.J., 1987, The epizootic of milkfish vibriosis and its biological control by bacteriophages AS10 In Kou K.S., Wu J.L., Hsu Y.L., Chen S.N., Tung M.C., Liao I.C. and Chung H.Y. (eds), *The memoir of virology and pharmacology in fish disease*. 3. Taipei.

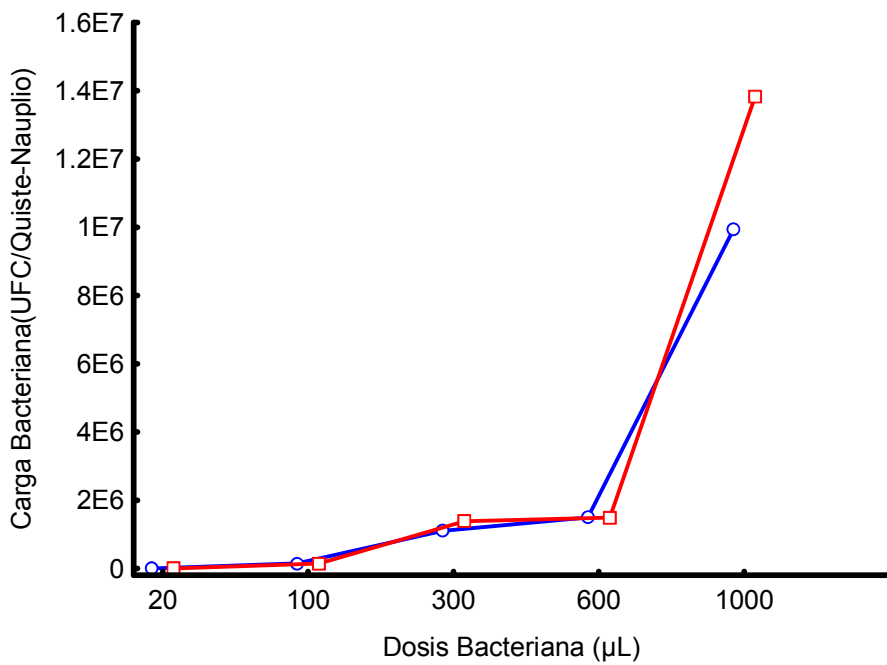
- Wu J.L., Lin H.M., Jan L., Hsu Y.L., Chang L.H., 1981, Biological control of fish bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila* by bacteriophage, *Fish Pathology* 15:271-276.
- Xie, H., Zhuang, X., Kong, J., Ma, G., Zhang, H., 2005. Bacteriophage Esc-A is an efficient therapy for *Escherichia coli* 3-1 caused diarrhea in chickens. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 51, 159–163.
- Yun-Shiang Chang, Chu-Fang Lo, Shao-En Peng, Kuan-Fu Liu, Chung-Hsiung Wang, Guang-Hsiung Kou. 2002. White spot syndrome virus (WSSV) PCR-positive *Artemia* cysts yield PCR-negative nauplii that fail to transmit WSSV when fed to shrimp postlarvae. *Dis aquat organ* 49:1-10.
- Zachary A. 1974 Isolation of bacteriophage of the marine bacterium *Beneckeana natriegens* from coastal SALT marshes. *Applied Microbiology.* 27: 980-992.
- Zamora, P.D. & C. Quiróz. 2005. Un enemigo marino silencioso: *Vibrio parahaemolyticus*. *Rev. Dig. Univ.* 6: 1-9.



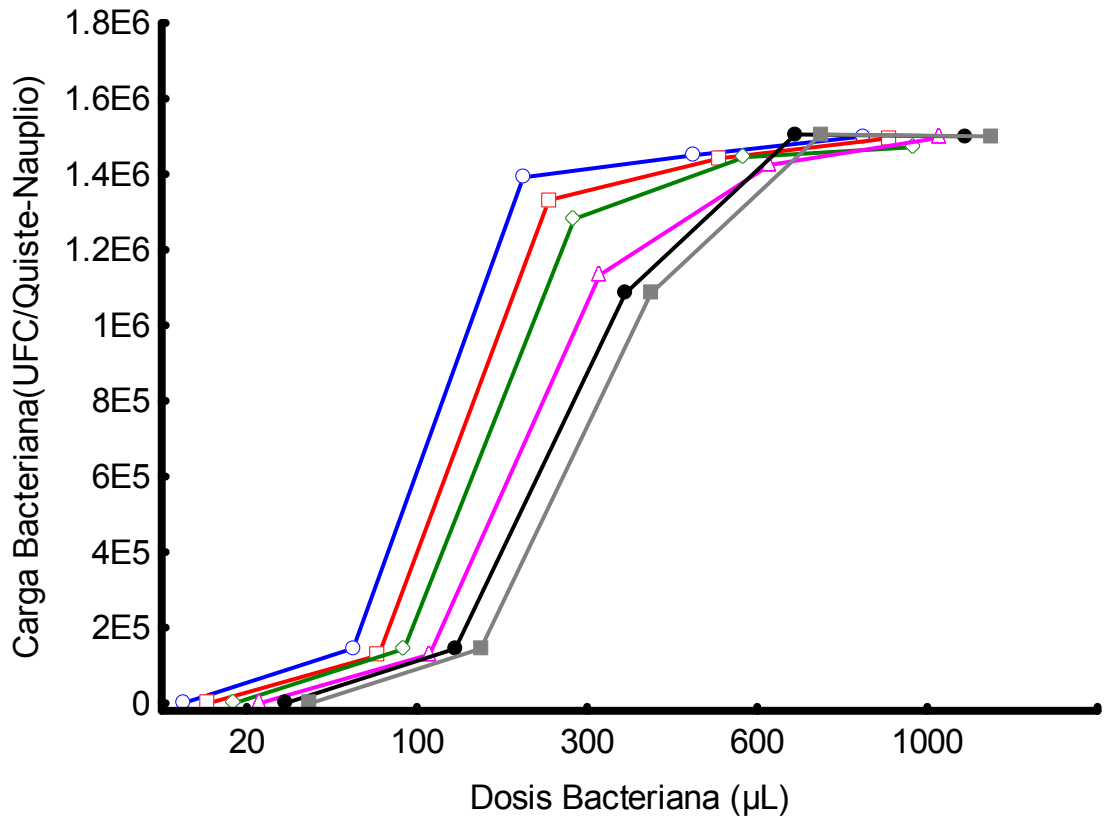
**APENDICE 1 Colonización de cepas probióticas en quistes de *Artemia***



**Figura 37.-** Colonización de quistes de *Artemia* expuestos a diferentes dosis con *Bacillus subtilis*. ATCC 6051○y *Bacillus subtilis* UTM126 □.

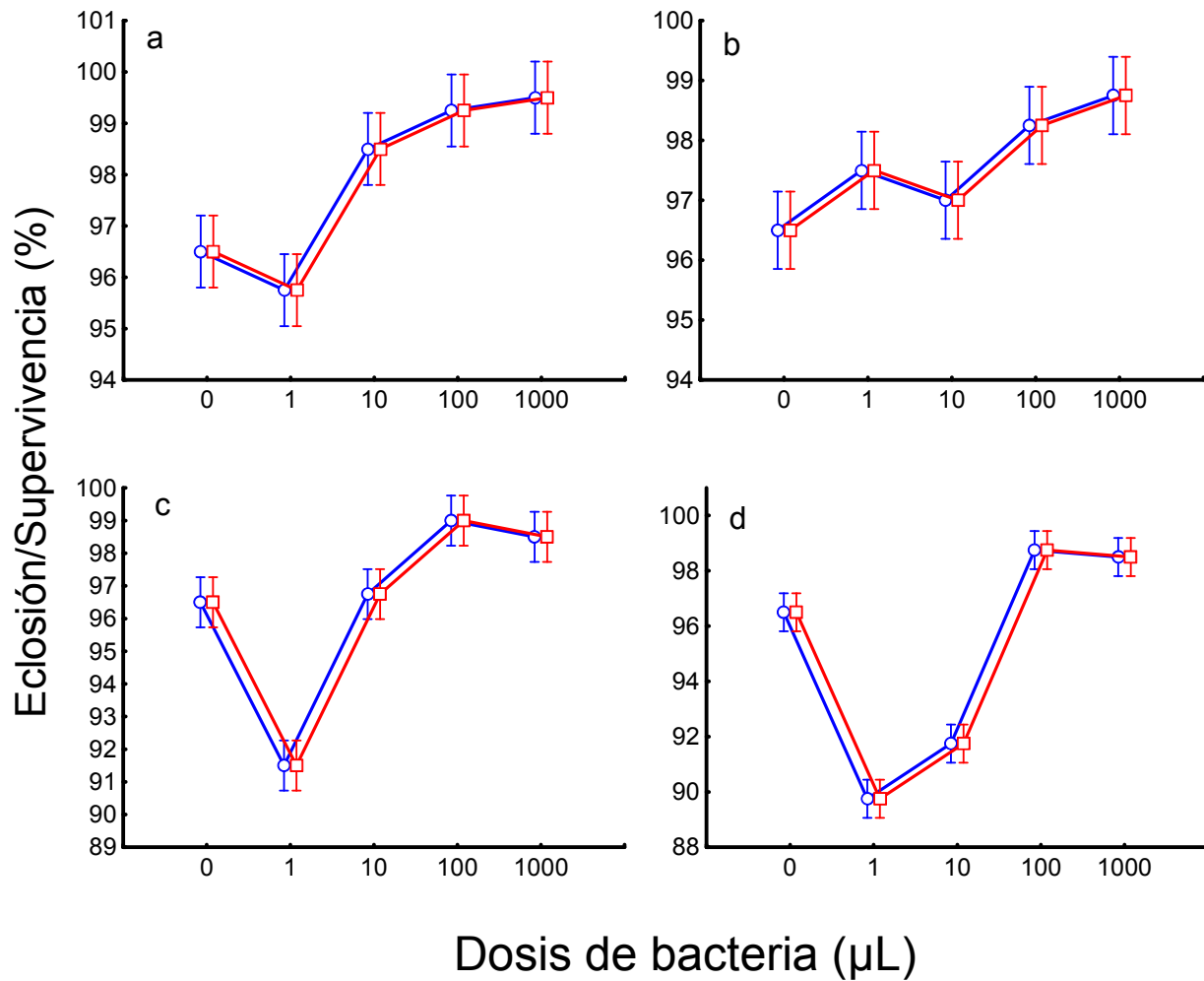


**Figura 38.-** Colonización de quistes de *Artemia* expuestos a diferentes dosis con R8C○y R34C □.

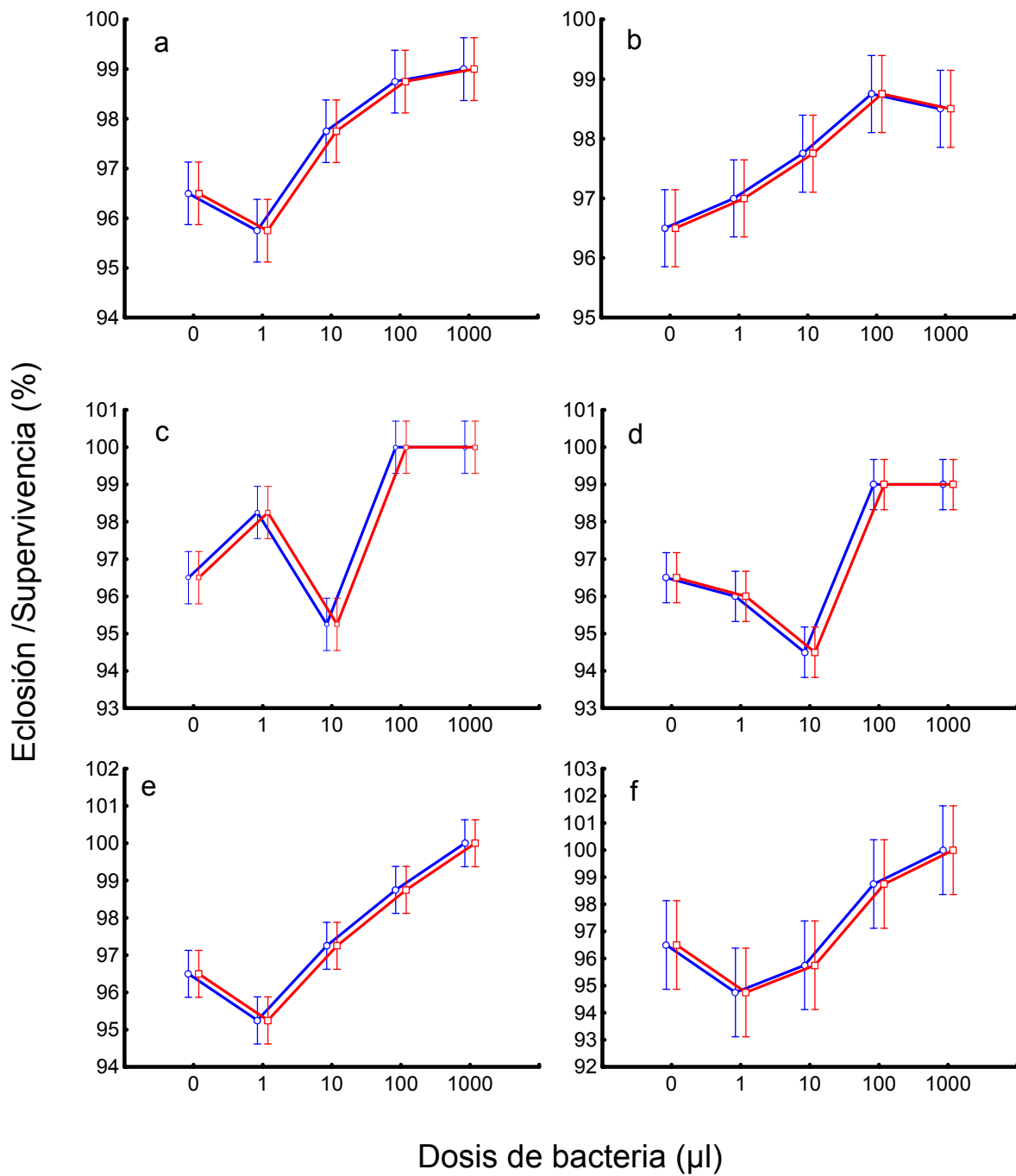


**Figura 39.-** Colonización de quistes de *Artemia* expuestos a diferentes dosis con B10 chica ○, Be 12 chica □, Be 12 grande ◇, C10 Lta chica △, C10 Lta grande ● y Cb Lta ■.

## Apéndice 2 Efecto de probióticos en la eclosión

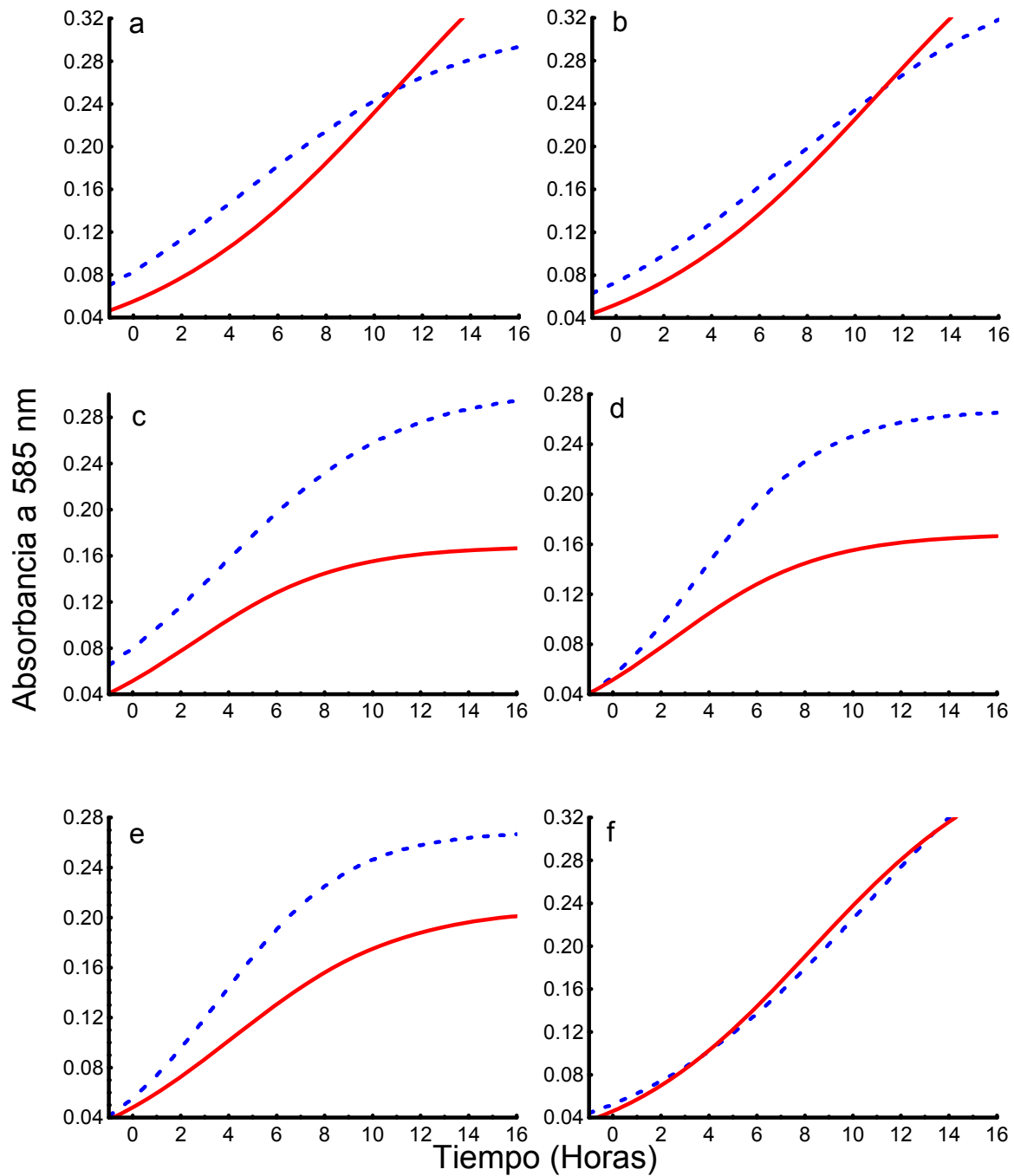


**Figura 40.-** Porcentaje de □ eclosión y ● supervivencia de quistes infectados *Bacillus subtilis* UTM 126 (a), ATCC 6051 (b), *Lactobacillus* R8C (c) y R34C (d).

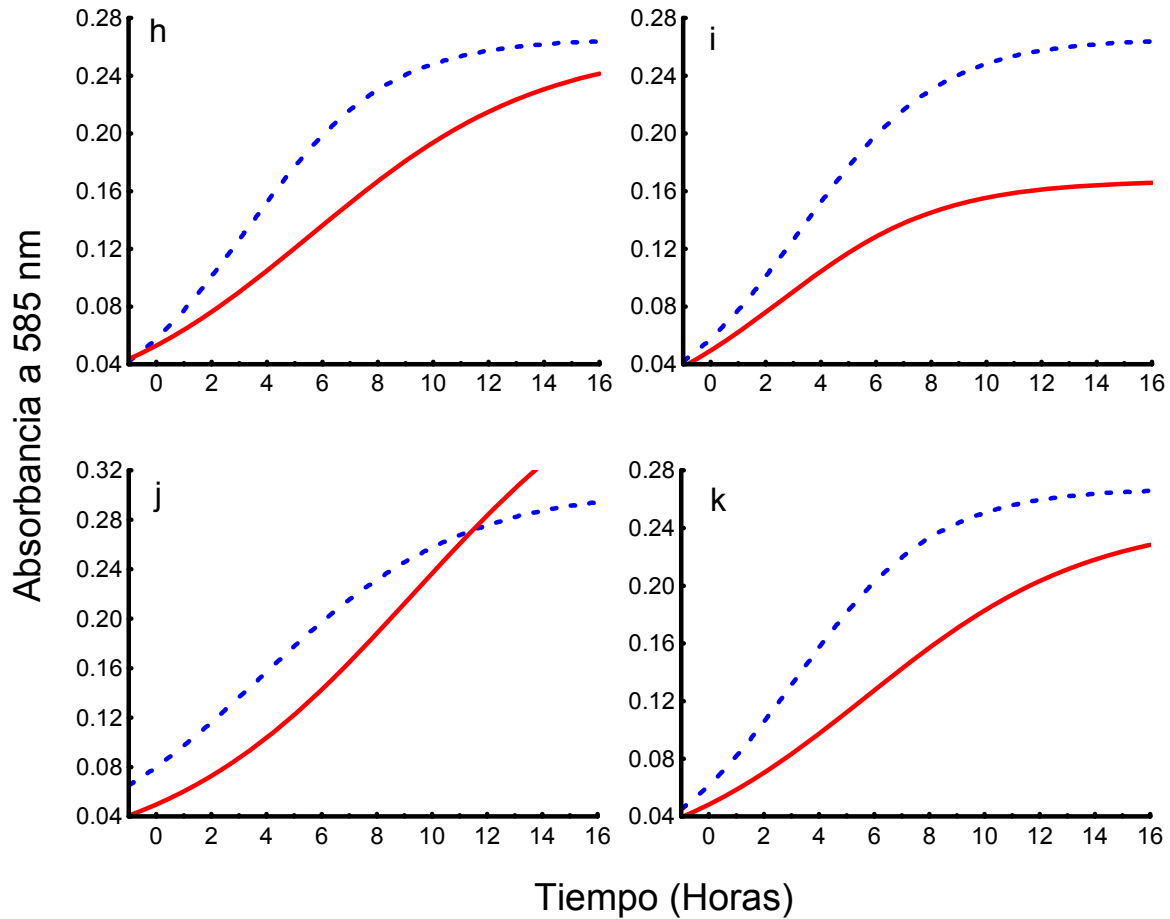


**Figura 41.-** Porcentaje de □ eclosión y ● supervivencia de quistes infectados con *Lactococcus* B10 chica (a), Be12 chica (b), Be12 grande (c), C10 Lta chica (d), C10 Lta grande (e) y Cb Lta (f).

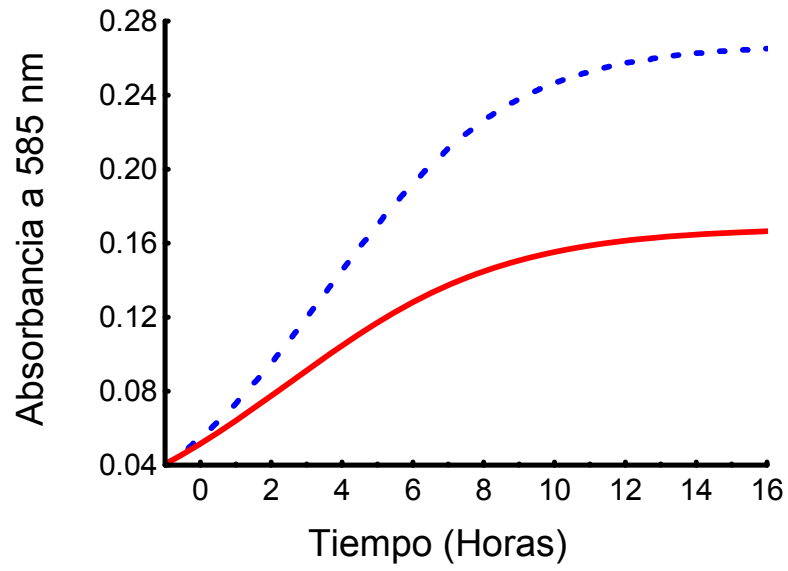
**Apéndice 3.- Crecimiento de probióticos en el agua de eclosión de *Artemia***



**Figura 42.-** Crecimiento de cepas probióticas UTM 126 (a), ATCC 6051 (b), R8C (c), R34 C (d), B10 chica (e) y Be 12 chica (f) en Agua de Eclosión de *Artemia* (----) y Caldo Marino (—), de acuerdo con la absorbancia de 1 a 585 nm ( $DO_{585} = 1$ ).



**Figura 43.-** Crecimiento de cepas probióticas y la mezcla de las 10 cepasBe12 grande (h), C10 Lta chica (i), C10 Lta grande (j) y Cb Lta (k)en agua de eclosión de *Artemia* y en Agua de Eclosión de *Artemia*(---), Caldo Marino (—) de acuerdo con la absorbancia de 1 a 585 nm ( $DO_{585} = 1$ ).



**Figura 44.-** Crecimiento de la mezcla en agua de eclosión de *Artemia* (----) y Caldo Marino (—).

## **Productividad asociada a la tesis**

---



I



**Vibrios In The Environment 2010**

**7-12 November 2010**

**Biloxi, Mississippi, USA**

# Use of a multispecies probiotic to protect *Artemia* from the pathogenic effects of *Vibrio harveyi*

E. Quiroz-Guzman<sup>1</sup>, J.L Balcazar<sup>2</sup>, R. Vázquez-Juarez<sup>3</sup>, Rojas- Contreras M<sup>4</sup>., S.F. Martínez-Díaz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas IPN, La Paz, Baja California Sur, México (CICIMAR-IPN)

(\* [sdiaz@ipn.mx](mailto:sdiaz@ipn.mx))

<sup>2</sup> Instituto Catalán de Investigación del Agua (ICRA).

<sup>3</sup> Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR)

<sup>4</sup> Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS)

## Introduction

*Vibrio harveyi* is an important pathogen for a wide range of marine species, and their effects on the aquaculture industry have been extensively documented (Owens & Busico-Salsedo, 2006). This species has been considered an opportunistic pathogen but has been shown that some strains can cause devastating effects on aquaculture, especially in shrimp production. *Artemia* is considered as the main vector of *Vibrio* in shrimp larvae production, and some *Vibrio* species that proliferate during the hatching process can affect the survival rate of these organisms fed *Artemia*. Several studies have shown the beneficial effect of probiotics on the crops but some of them have failed in controlling the adverse effects of *Vibrio*. Thus, the aim of this study was to investigate whether a multispecies probiotic preparation could inhibit the growth of *V. harveyi* during *Artemia* hatching.

## Methods

Colonization and effect of two *Vibrio harveyi* strains (14126 and EC11) on hatching rate was evaluated under gnotobiotic conditions. Briefly, axenic *Artemia* cysts (INVE<sup>®</sup>) were placed in tubes with 10 ml of sterile seawater and inoculated with different doses of *V. harveyi* (1, 10, 100, 1000 and 2000 µl of a *V. harveyi* suspension at  $6 \times 10^8$  CFU·ml<sup>-1</sup>). The tubes were placed for hatching in a rotator (Barnstead Thermolyne Labquake<sup>®</sup>) at 28 °C under continuous light. The colonization was evaluated by counting the number of colonies on TCBS plates and the hatch and survival were recorded at 24 h.

A mixture of 10 bacterial strains belong to the genera *Bacillus*, *Lactobacillus* and *Lactococcus* (2, 2 and 6, respectively) was selected due to its ability to adhere to the cysts and nauplii during the hatching process. Different concentrations of the bacterial mixture were added during the experimental infection of *Artemia* cysts with *Vibrio harveyi* EC11 strain at numbers close to the LD<sub>50</sub>. The evaluation was performed by triplicate in 100 ml flasks with 100 cysts per flask. Temperature at 28 °C, continuous aeration and light were maintained during the hatching process. The survival of *Artemia* was evaluated at 24 h.

## Results

There were marked differences in colonization ability among different *Vibrio* strains. The strain ATCC 14126 did not colonize the cysts, whereas the strain EC11 effectively colonized *Artemia* cysts, and the intensity of colonization was directly related to the dose used for infection. The highest recorded value was  $1.12 \times 10^9$  CFU·cyst<sup>-1</sup>.

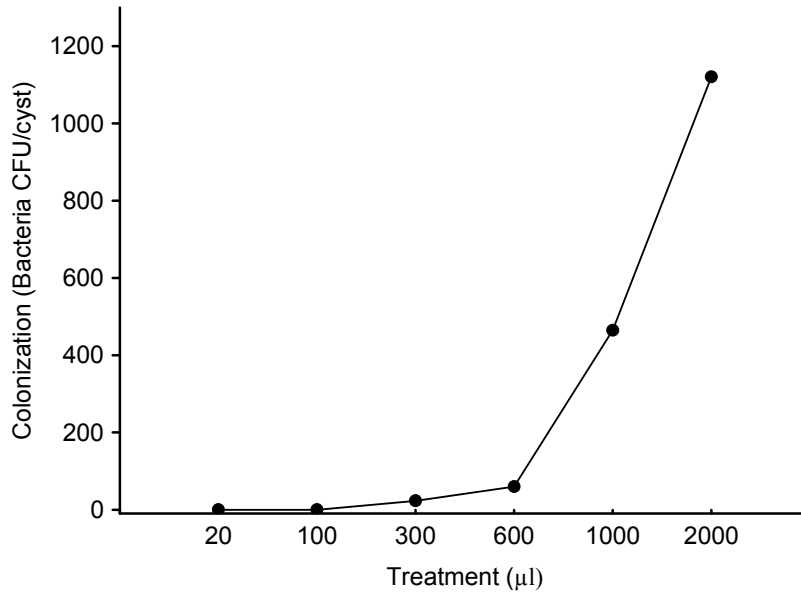


Figure 1. Colonization of *Vibrio harveyi* EC11 for the hatching of *Artemia* cysts from INVE®.

The EC11 dose directly influenced the hatching and survival of *Artemia*. A significant reduction in the hatching and survival was observed at the lowest dose used, and the value of LD50 was estimated between 1 and 10 µl (ca. between  $0.5 \times 10^5$  and  $5.6 \times 10^6$  CFU·ml, respectively). (Fig 2)

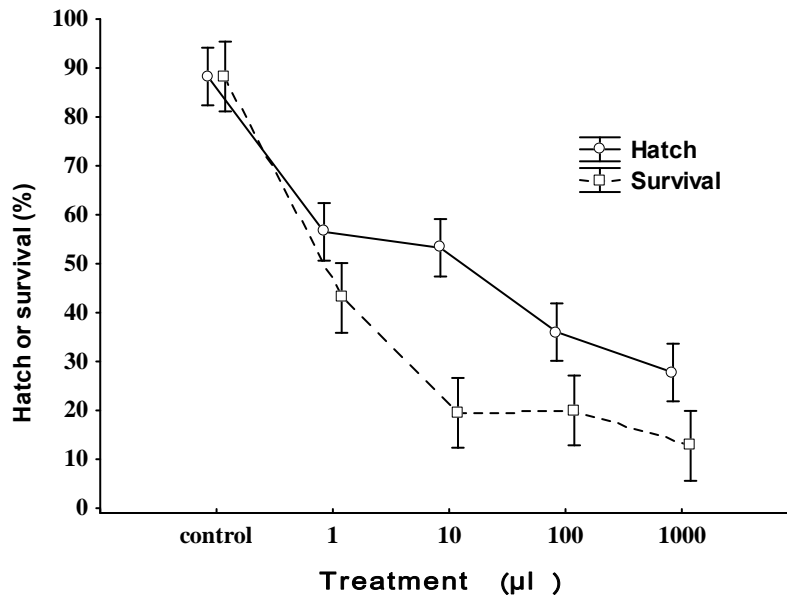


Figure 2 Percentage of hatching and survival of *Artemia franciscana* during experimental infection with different doses of *Vibrio harveyi* strain EC11 at 24h

The results also demonstrated that probiotics were able to reduce the mortality rate and the protective effect was correlated to the dose used. The survival at doses of 1 and 10 µl was not

significantly different from the control infected with *V. harveyi*, while doses of 100 and 1000  $\mu$ l were not significantly different from the axenic controls.

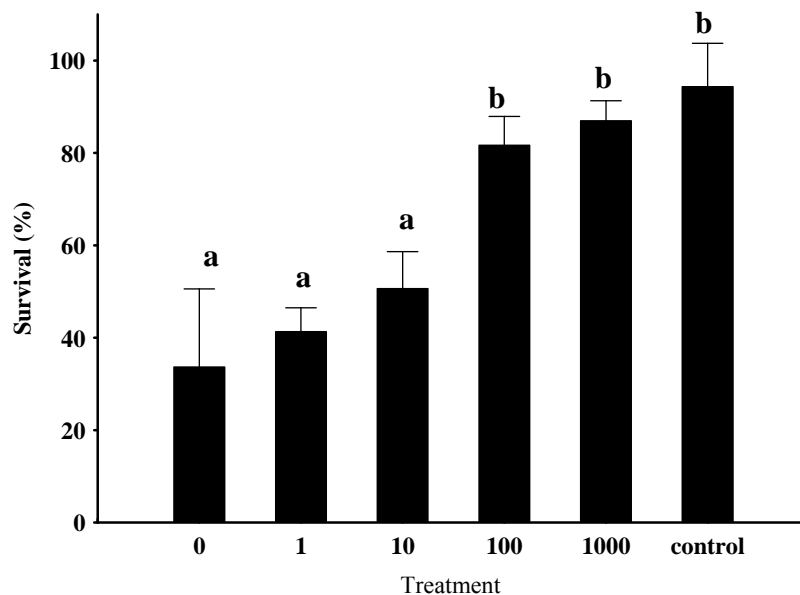


Figure 3. Survival of *Artemia* nauplii infected with *V. harveyi*  $5.5 \times 10^6$  CFU/ml EC11 and treatment with different doses of probiotic (equivalent to  $1 \times 10^7$  CFU/ml) and axenic control.

## Conclusions

Manipulation of the bacterial community during the *Artemia* hatching has a direct impact on the survival rate. *Vibrio harveyi* strain EC11 reduced severely the hatching percentage and the survival of *Artemia*. In contrast, the probiotic bacteria showed competence with *V. harveyi*, because of their ability to replace it and remain as a part of the microbiota, reducing the negative effects of this pathogen. The *Artemia* colonization with probiotic bacteria could be a strategy to break the *Vibrio* transmission from the hatching containers to shrimp tanks.

## Acknowledgements

This research was supported by the projects SIP 20100865 and CONACyT 085033

## References

Owens Leigh and Busico-Salcedo Nancy. 2006. *Vibrio harveyi*: Problems in paradise. In: F.L Thompson, B Austin and J Swings (Eds). The biology of *Vibrios* ASM Pres

**II**



**World  
Aquaculture**

## Controlling the colonization of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* in *Artemia franciscana* by the use of phage therapy

Quiroz-Guzmán Eduardo\* & Martínez-Díaz Sergio F.

Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. Av. Instituto Politécnico Nacional No 1. Col. Palo de Sta. Rita. La Paz B.C.S., México. CP 23094. sdiaz@ipn.mx

*Artemia* is considered an important vector of pathogenic bacteria for fish and shrimp culture. The opportunistic bacteria proliferate during *Artemia* hatching and are transferred to the rearing tanks. A method to reduce the transference of pathogens is the use of antibacterial compounds during the *Artemia* hatching to control the bacterial proliferation. The phage therapy is an alternative that could help to specifically control some dangerous species, without negative effects on the beneficial bacteria. During this study we evaluate lytic phages to control the colonization of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* in *Artemia franciscana* nauplii.

The effect of individual and mixtures lytic phages on the *in vitro* growth of *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi* was used as criteria to select the phages to control the colonization of *Artemia*.

Axenic *Artemia* nauplii were infected with overnight cultures of *Vibrio* and the effect of mixtures of phages on the ability of these bacteria to colonize the *Artemia* surfaces was evaluated during 24-72 hours of exposure.

It was observed that the colonization of *Vibrio parahaemolyticus* was completely inhibited after 6 h (Fig. 1). Apparently the ability of the phage mixture to inhibit the colonization of *V. parahaemolyticus* was mainly influenced by the phages with a higher capacity to kill bacteria, als the co infection effect was similar to those produced separately by these phages.

During the experiments to control the colonization of *Vibrio harveyi* we found differences between the studied phages which apparently reflect the ability of this bacterium to resist the phage infection (Fig. 2). In some cases the complete inhibition of the colonization was recorded at 12 h, while in other cases only a partial inhibition was induced.

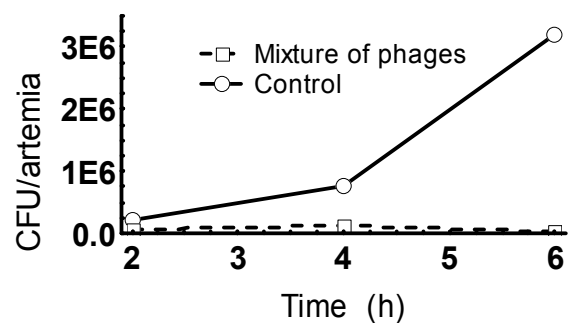


Figure 1. Effect of a mixture of phages on the colonization of *V. parahaemolyticus* in *Artemia* nauplii.

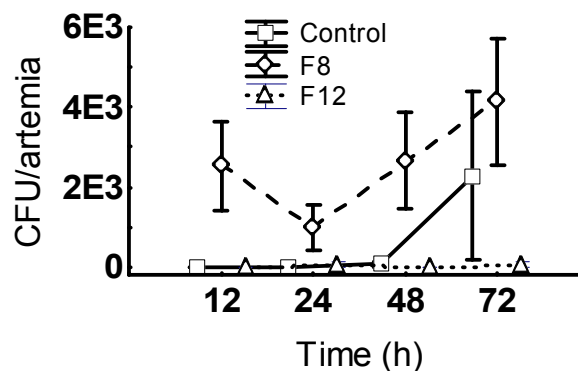


Figure2. Effect of the phages F8 and F12 on the colonization of *Vibrio harveyi* in *Artemia* nauplii.



III



**PROMICROBE COURSE**

**Microbial community management in aquaculture  
(PhD course & Training school)**

**Ghent University, Belgium**

# FROM THEORY TO PRACTICE: AN EXAMPLE OF MICROBIAL MANAGEMENT FOR THE INTENSIVE PRODUCTION OF SHRIMP POST-LARVAE.

Quiroz-Guzmán Eduardo\*and Martínez-Díaz Sergio F.

Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN), La Paz, B.C.S. 23096, México \*equirozg@ipn.mx

## Introduction

En los sistemas de producción de camarón, muchos patógenos potenciales como protozoarios, bacterias, hongos y virus (Páez-Osuna, 2001) co-existen con el camarón sin causar un impacto negativo en la producción (Spann *et al.*, 2000). Sin embargo, algunas infecciones inactivas pueden desarrollarse en enfermedades agudas provocando pérdidas en esta industria (Vidal *et al.*, 2001), siendo la principal amenaza para el desarrollo de la industria camaronera las enfermedades causadas por bacterias. Una alternativa para el control de enfermedades es el empleo de microorganismos benéficos llamados probióticos como control biológico (Balcázar, 2002). Los cuales actúan bajo los mecanismos generales de acción 1) Exclusión competitiva, 2) Mejoramiento de la nutrición 3) Eliminación de la materia orgánica, 4) Producción de sustancias antagónicas (Balcázar, 2002). Por lo anterior el presente trabajo se propone el uso de una mezcla de cepas probióticas formada por bacterias de los géneros de *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Lactococcus* adicionadas a *Artemia* y al agua de cultivo de larvas de camarón para evaluar su efecto en la supervivencia, reducción de patógenos, crecimiento y peso.

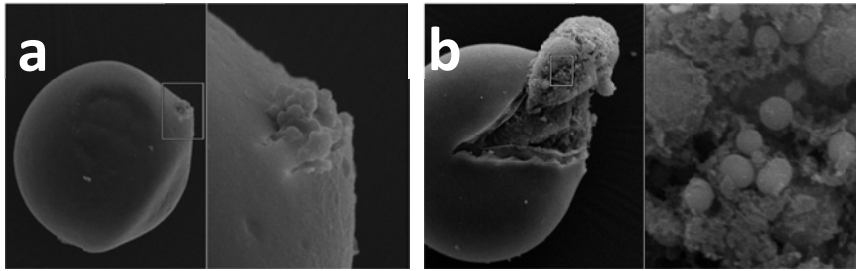
## Material and Methods

La colonización y el efecto sobre la tasa de eclosión de 11 cepas probióticas fue evaluada en condiciones gnotobioticas. Brevemente, quistes axénicos de *Artemia* INVE<sup>®</sup> se colocaron en tubos con 10 ml de agua de mar estéril y fueron inoculados con diferentes dosis (1, 10,100, 1000 y 2000  $\mu$ l) de una suspensión de probióticos a  $2 \times 10^8$  UFC/ml. Los tubos fueron colocados en un Tube Rotators, Barnstead a una temperatura de 28°C con luz (1500 lux) continua para su eclosión. La colonización fue evaluada mediante conteo de unidades formadoras de colonias en placa de TCBS y la supervivencia de los nauplios fue registrada a las 24 h.

De igual forma se realizó una mezcla de las 11 bacterias de los géneros *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Lactococcus* (2, 2 y 7 respectivamente) La evaluación se realizó por cuadruplicado durante la producción larvaria de camarón blanco en tanques de 180 l a una densidad de 180 organismos por litro cada tratamiento conto de larvas alimentadas con nauplios de *Artemia* eclosionadas con la mezcla de probióticos, larvas alimentadas con *Artemia* eclosionadas con la mezcla de probióticos y suministro de probiótico en el agua de los tanques de cultivo, larvas alimentadas con *Artemia* sin tratamiento pero con suministro de probióticos en el agua de cultivo larvario. Así mismo durante los 12 días que duro el experimento no se realizaron recambios de agua a los tanques y al final se evaluó la supervivencia, la carga bacteriana de los organismos y el agua de cultivo el peso y talla de los mismos.

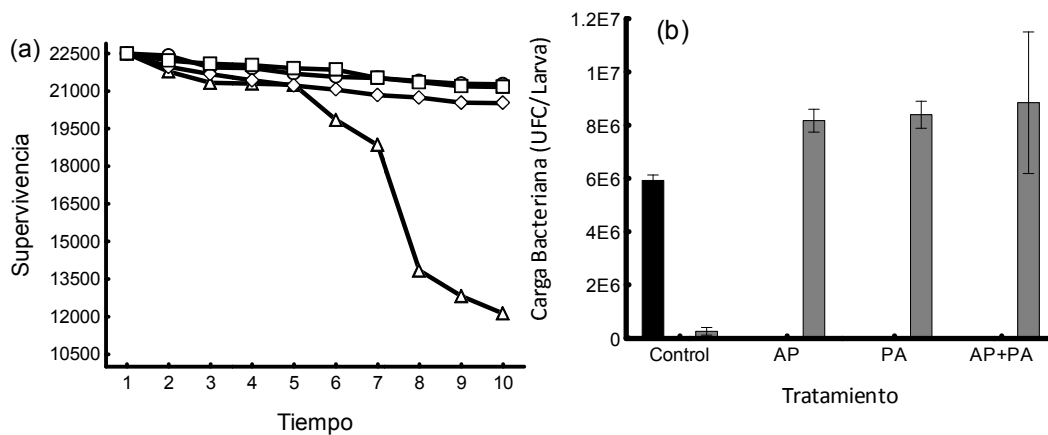
## Results

La adhesión y colonización de cada cepa probiótica y mezcla aparentemente comenzaron en el área de estallamiento (donde se produce la ruptura de la membrana cuticular externa de quistes) (Fig. I a, b). Los números máximos observados en los quistes con las cepas de *Bacillus subtilis* fu de  $1 \times 10^6$  CFU·Quiste, de las cepas de *Lactobacillus* fue de  $1 \times 10^7$  CFU·Quiste, de las cepas de *Lactococcus* fue de  $1 \times 10^7$  CFU·Quiste.



**Figura I** Colonización de quistes y nauplios de *Artemia* en SEM a) Quiste colonizado por bacterias probióticas a las 2 h de la inoculación en la zona de estallido del quiste b) Metanauplio colonizado durante la eclosión.

Durante los experimentos con la mezcla de probióticos en los cultivos de camarón blanco se observó que al ser suministrados en el alimento o en el agua de cultivo estos tienen la capacidad de reducir la mortalidad de los organismos, además de mejorar la calidad de agua notándose una mayor supervivencia en todos los tratamientos a diferencia del control el cual registró una mortalidad mayor al 50%, de igual forma se observó la capacidad de reducir la concentración de vibrios la cual fue de  $6 \times 10^6$  en los controles a nulo en los tratamientos con probióticos.



**Figura II. a)** Supervivencia de larvas de camarón blanco tratados con diferentes dosis de probiótico (equivalente a  $1 \times 10^8$  UFC ml) y un control. (□) *Artemia* con probiótico y Agua con probiótico, (◇) Probiótico en el agua, (○) *Artemia* con probiótico y (Δ) control; **b)** Carga bacteriana en los organismos de cultivo (■) TCBS y (▨) Agar Marino

### Conclusiones

La manipulación de la comunidad bacteriana durante la eclosión de *Artemia* tiene un impacto directo en la eclosión. Mientras que los microorganismos administrados durante el presente estudio demostraron poder competir con *Vibrio*, ya que éstos presentaron la capacidad de sustituirlos y, en el mejor de los casos, permanecer en el hospedador como parte de la microbiota usadas como agentes de control biológico.

### References

Balcázar, J.L. 2002. Uso de probióticos en acuicultura: Aspectos generales. CIVA 2002

Páez-Osuna, F. 2001. Camaronicultura y medio ambiente Primera edición. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología.

Spann, K.M., R.A., Donaldson, J.A., Cowley and Walker P.J. 2000. Differences in the susceptibility of some penaeid prawn species to gill-associated virus (GAV) infection. Dis. Aquat. Org. 42: 221-225.

IV



Instituto Politécnico Nacional



VI CONGRESO NACIONAL  
ESTUDIANTIL DE INVESTIGACIÓN  
VI CONGRESO DE INVESTIGACIÓN POLITÉCNICA  
1ra. JORNADA DE PROTOTIPOS



# VIRULENCIA DE *VIBRIO HARVEYI* Y *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* EN EL DESARROLLO DE ARTEMIA

Quiroz C., Martínez S.

Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas IPN  
Av. Instituto Politécnico Nacional s/n. Col. Palo de Santa Rita C.P. 23096  
Desarrollo de Tecnologías  
Ciencia y Tecnología Alimentaria  
Modalidad Oral  
equirozg@ipn.mx

## Introducción

*Artemia* es ampliamente utilizado para investigar el papel de las bacterias en crustáceos y el efecto de compuestos tóxicos en organismos acuáticos. Varios modelos de infección desarrollados en *Artemia* se basan en el uso de larvas o adultos lo cual podría dar lugar a conclusiones erróneas debido a los parámetros bióticos como es la presencia de patógenos adicionales, la sensibilidad a la infección, el estado fisiológico (edad y muda), y el fracaso de la ruta seleccionada para la administración.

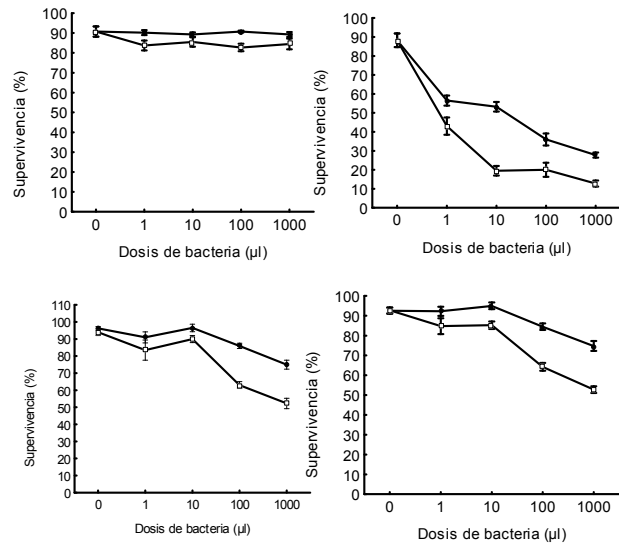
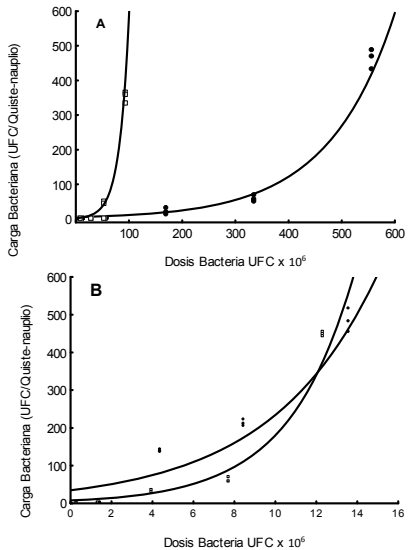
## Objetivo

Desarrollar un modelo para la evaluación de la virulencia del *Vibrio* spp en *Artemia* franciscana durante el proceso de eclosión y comparar los resultados con los obtenidos en nauplios.

## Resultados y conclusiones

Se observaron diferencias marcadas en la capacidad de colonización de las diferentes cepas de *Vibrio* probadas. La cepa ATCC 14126 no colonizó los quistes, mientras que las cepas EC11 (Fig. A), ATCC 17802 y PS-017 (Fig. B) colonizaron los quistes de *Artemia*, la intensidad de colonización estuvo directamente relacionada con la dosis empleada para la infección. El valor más alto registrado fue de  $1.12 \times 10^9$ .

Se determinó una correlación significativa entre la mortalidad causada por cada cepa en la eclosión con la registrada durante las pruebas de reto en nauplios. Por lo que aparentemente el modelo con quistes puede sustituir a los usados actualmente con larvas.



V





## Proliferation, colonization, and detrimental effects of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* during brine shrimp hatching



Eduardo Quiroz-Guzmán<sup>a</sup>, José L. Balcázar<sup>c</sup>, Ricardo Vázquez-Juárez<sup>b</sup>, Ariel A. Cruz-Villacorta<sup>b</sup>, Sergio F. Martínez-Díaz<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN), La Paz, B.C.S. 23096, Mexico

<sup>b</sup> Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), La Paz, B.C.S. 23096, Mexico

<sup>c</sup> Institut Català de Recerca de l'Aigua (ICRA), Parc Científic i Tecnològic de la Universitat de Girona, 17003 Girona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 15 January 2013

Received in revised form 9 March 2013

Accepted 12 March 2013

Available online 6 April 2013

#### Keywords:

*Vibrio parahaemolyticus*

*Vibrio harveyi*

Vibriosis

Brine shrimp cysts

### ABSTRACT

Brine shrimps are a nutritious and easy to raise feed for aquaculture, however, are considered a main vector of pathogenic microbes because they carry opportunistic bacteria that proliferate during their production. Considering that brine shrimp is also susceptible to some of those bacteria, their yield during nauplii production could be reduced by those opportunistic pathogens. In this study we evaluated the effect of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* during cyst incubation. Under gnotobiotic conditions, proliferation, colonization, and ability to kill brine shrimp cysts before, during or after hatching, were examined. We found that nutritional materials released during cyst hatching supported a strong growth of *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi*, at growth rates comparable with those recorded in bacteriological media (between 0.197 and 0.307 generations · h<sup>-1</sup>). Cysts were colonized externally after 2 h of exposure to bacteria, some bacteria crossed the corium barrier and colonized the embryo before hatching. In some cases, brine shrimp yield was reduced to 10% in the presence of vibrios, this reduction was dose- and strain-dependent and was accounted for by the sum of the number of killed cysts and dead organisms during “umbrella” or instar I stages. The effect of each *Vibrio* strain on brine shrimp cysts was directly correlated with the virulence recorded during a standard challenge test using brine shrimp nauplii, indicating that the hatching process can be used as an alternative to assess the virulence of different wild bacterial isolates.

© 2013 Published by Elsevier B.V.

### 1. Introduction

Previous studies have demonstrated that brine shrimp (*Artemia* spp.) is a main vector of microbes for cultured organisms, i.e., cysts are carriers of vibrios (Austin and Allen, 1982; López-Torres and Lizárraga-Partida, 2001), pathogenic yeasts (Moore and Strom, 2003) and viruses (Chang et al., 2002). Most of the cyst-associated microbes are acquired at harvest sites and can change with time (harvest season) and during harvesting processes (Straub and Dixon, 1993). These microbes can proliferate during cyst incubation, colonize the surfaces of newly hatched nauplii, and increase during nauplii enrichment (Austin and Allen, 1982; Høj et al., 2009). Austin and Allen (1982) found no evidence of intimate bacterial colonization on nauplii surfaces; they suggested that, at hatching, nauplii are practically free of bacteria and will be colonized a few hours after hatching. The final bacterial load during massive nauplii production is

unpredictable, partly because it depends, among other factors, on management practices (Høj et al., 2009), water quality, season, and the presence of biofilms in the hatching tanks (Wietz et al., 2009). In some cases, the increase in the numbers of *Vibrio* during incubation has been associated with the release of nutrients (i. e., glycerol) during hatching (Sogerloos et al., 2001). Cysts treated with hypochlorite can be entirely disinfected, and newly hatched nauplii are promptly colonized (Sogerloos et al., 2001). Unfortunately, in some cases, *Vibrio* spp. dominates the bacterial community associated to brine shrimp nauplii, which is considered a risk for hatchery facilities.

In addition, nauplii and juvenile stages of brine shrimp are susceptible to *Vibrio* (Haldar et al., 2010; Rico-Mora and Voltolina, 1995). This susceptibility has been used as a tool to study bacterium–crustacean relationship and to develop mechanisms to control pathogens. Commonly, *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi* are present in commercial stocks of brine shrimp cysts (Austin and Allen, 1982) and are common during brine shrimp production. Potentially these vibrios can impact the brine shrimp yield and produce economic losses. However, the adverse effects on the performance or hatching of brine shrimp have not been evaluated. In the present study, we evaluated the ability of *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi* to proliferate, colonize the surfaces, and reduce brine shrimp yield by killing brine shrimp cysts or at early stages of their development.

\* Corresponding author at: Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN), Av. Instituto Politécnico Nacional s/n, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz, B.C.S. 23096, Mexico. Tel.: +52 612 1234734 and 1234666; fax: +52 612 122 53 22.

E-mail address: [sdiaz@ipn.mx](mailto:sdiaz@ipn.mx) (S.F. Martínez-Díaz).

## 2. Material and methods

### 2.1. Bacterial strains and culture

Two bacterial strains PS-017 and EC11 were used in this study, which were previously isolated during vibriosis outbreaks in larval shrimp cultures from Ecuador (Balcázar and Rojas-Luna, 2007) and identified by 16S rRNA gene sequencing as *V. parahaemolyticus* (GenBank accession KC740491) and *V. harveyi* (GenBank accession KC740490) respectively (Fig. S1-Supplementary material), following the conditions previously described (Balcázar et al., 2010). Two reference strains were also included: *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 and *V. harveyi* ATCC 14126. All strains were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in 50% glycerol. For experiments, bacteria were cultured on marine agar plates (MA; filtered artificial seawater, 1 l (Instant Ocean®); yeast extract, 1 g; peptone, 5 g; BactoAgar, 17 g) at  $35^{\circ}\text{C}$  and harvested after 24 h. For experiments, the optical density of each strain was adjusted in sterile artificial seawater (SASW) to 1 at 585 nm ( $\text{DO}_{585} = 1$ ) in a spectrophotometer (Spectroquant 1117, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The numbers of bacteria were estimated in colony forming units (CFUs) after serial dilution in 2.5% NaCl and plating on MA.

### 2.2. Brine shrimp cysts and nauplii

Commercial brine shrimp cysts (INVE Aquaculture, Salt Lake City, UT) were used in this study. The cysts-associated bacteria were removed by disinfection and hatching was achieved under axenic conditions. Briefly, cysts were hydrated in sterile distilled water for 1 h and unviable cysts (floating ones) were removed. The remaining cysts were decapsulated using sodium hypochlorite ( $60\text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  active chlorine) for 45 s, rinsed thoroughly with sterile distilled water, disinfected for 15 s in 3% benzalkonium chloride to kill the remnant bacteria, and rinsed again with sterile distilled water. The whole procedure was performed under aseptic conditions and all materials were previously sterilized. The absence of bacteria on decapsulated cysts and hatched nauplii was verified by plating on MA and confirmed with scanning electron microscopy. For experiments, cysts were set to hatch in SASW under continuous aeration ( $0.2\text{-}\mu\text{m}$  filtered) and illumination ( $1500\text{ lx}$ ) at  $28^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3. Proliferation of *Vibrio* in brine shrimp hatching water

Brine shrimp hatching water (BSHW) was obtained under axenic conditions; bacteria-free cysts were hatched at a rate of  $0.23\text{ g} \cdot 100\text{ ml}^{-1}$  of SASW at  $28^{\circ}\text{C}$ , under continuous illumination ( $1500\text{ lx}$ ) and aeration ( $0.2\text{-}\mu\text{m}$  filtered). Once hatched (at 18 h), nauplii and debris from hatched cysts were removed under sterile conditions and BSHW was dispensed into sterile tubes (10 ml per tube). Each strain was inoculated in BSHW ( $100\text{ }\mu\text{l}$  of bacterial suspensions at  $\text{DO}_{585} = 1$  per tube) in triplicate and incubated at  $30^{\circ}\text{C}$  under continuous agitation (8 rpm) in a tube shaker (Labquake, Barnstead-Thermolyne, Chestnut Hill, MA). The number of bacteria in each tube was recorded hourly during 14 h by standard culture techniques. Growth of each strain was computed using the  $y = a \cdot (1 + \exp(b - cx))^{-1}$  equation as described by Zwietering et al. (1990) and growth rates were compared to those recorded in marine broth (MB) (filtered artificial seawater, 1 l; yeast extract, 1 g; peptone, 5 g), and ASW controls.

### 2.4. Colonization of *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi* on brine shrimp cysts

The number of colonizing bacteria and colonization sites on the cysts was evaluated by culturing on MA and by scanning electron microscopy (SEM), respectively. Bacteria-free cysts were dispensed into tubes with 10 ml of SASW at a rate of 30 cysts per tube, inoculated with 20, 100, 300, 600, and  $1000\text{ }\mu\text{l}$  of bacterial suspensions at  $\text{DO}_{585} = 1$ , and kept under continuous illumination at  $28^{\circ}\text{C}$  in a tube shaker (Labquake,

Barnstead-Thermolyne). Each bacterial strain and dose were assayed in triplicate. At 15 h, cysts and nauplii were harvested under aseptic conditions and rinsed thoroughly two times with SASW. The number of bacteria was assessed by standard microbiological techniques. Briefly, cysts and nauplii were re-suspended in 3 ml sterile seawater and homogenized using a cell disruptor (Biospec Products, Bartlesville, OK). Ten-fold serial dilutions were plated on thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS; Merck KGaA) and incubated at  $35^{\circ}\text{C}$  for 24 h. The bacterial load was expressed as CFU per organism.

During induced infection, as described above, samples were collected every hour under sterile conditions and fixed with 5% glutaraldehyde in sterile seawater for 4 h at  $4^{\circ}\text{C}$ , dehydrated through ascending ethanol solutions (30, 50, 70, and 100%) for 30 min each and then dried in a critical point drying system (Samdri-PVT-3B, Tousimis, Rockville, MD). Each sample was placed in an aluminum sample holder with double-sided tape and twice coated with palladium ions for 35 s in a metal evaporator (Sputter Coater, Denton Vacuum Desk II, Moorestown, NJ). The coated samples were observed under a scanning electron microscope (S-3000N, Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan) with a secondary electron detector.

### 2.5. Effect of *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi* on cysts and early stages of brine shrimp

The effect on hatching success and early survival was measured by a modification of the method described by Defoirdt et al. (2005). Briefly, bacteria-free cysts (previously described) were placed in tubes with 10 ml sterile seawater and inoculated with 1, 10, 100, and  $1000\text{ }\mu\text{l}$  bacterial suspensions ( $\text{OD}_{585} = 1$ ). The tubes were maintained in a rotary shaker at  $28^{\circ}\text{C}$  under continuous light ( $1500\text{ lx}$ ). Axenic controls were simultaneously examined. At 24 h, mortality was recorded under a stereomicroscope. The stage of development of each organism was recorded and total mortality (TM) was computed as:  $\text{TM} = \text{CM} + \text{HM} + \text{PHM}$ , where CM = cyst mortality or the number of unhatched cysts; HM = hatching mortality, which includes all dead organisms at “umbrella” stage, generally observed dead at the interior of the hatching membrane; and PHM = post-hatching mortality, which includes the dead organisms at instar I stage.

Mortalities at each stage were compared with the mortality of brine shrimp nauplii (NM) recorded during a previously standardized challenge test (Martínez-Díaz and Hipólito-Morales in press); briefly, axenic nauplii (obtained as previously described) were placed in sterile polycarbonate vessels with 100 ml sterile seawater (at 100 nauplii per vessel). The vessels were inoculated with different bacterial doses (1, 10, 100, and  $1000\text{ }\mu\text{l}$  of bacterial suspensions [at  $\text{DO}_{585} = 1$ ]), and were maintained at  $28^{\circ}\text{C}$ . The effect on survival was recorded at 48 h. Each combination dose-strain was assayed in triplicate.

With the recorded mortality (TM), a dose-response approach was used to assess the risk of mortality by *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi* during nauplii production. Data were adjusted to the beta ( $\beta$ )-Poisson model as described by French et al. (2002):

$$P_{\text{death}}(D; \infty, \beta) = 1 - \left(1 + \frac{D}{\beta}\right)^{-\alpha}$$

Since the numbers of dead organisms were included in the model, P describes the probability of death at each *Vibrio* dose. In the model,  $\beta$  and  $\alpha$  describe the assumed heterogeneity in the probability that any organism died due to vibriosis; and D is the dose in  $\text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

For each strain, the highest likelihood of  $\beta$  and  $\alpha$  was obtained by Bayesian methods as described by French et al. (2002). The values obtained per strain were: PS-017 ( $\beta = 0.324$ ,  $\alpha = 0.098$ ), ATCC 17802 ( $\beta = 0.565$ ,  $\alpha = 0.115$ ), EC11 ( $\beta = 0.037$ ,  $\alpha = 0.194$ ), and ATCC 14126 ( $\beta = 0.343$ ,  $\alpha = 0.041$ ); analyses were performed using the Solver tool (Microsoft Excel 2010).

**Table 1**Estimated growth parameters for *Vibrio parahaemolyticus* (strains PS017 and 17802) and *Vibrio harveyi* (strains EC 11 and 14126).

Strains	Medium*	Growth rate (generations/h)			Logistic model parameters			Correlation value R
		K	a	b	c			
<i>V. parahaemolyticus</i> (PS-017)	MB	0.248	0.41	2.02	0.54	0.991		
	BSHW	0.197	0.40	2.01	0.52	0.987		
<i>V. parahaemolyticus</i> (17802)	MB	0.321	0.40	2.03	0.54	0.988		
	BSHW	0.254	0.37	2.08	0.26	0.983		
<i>V. harveyi</i> (EC11)	MB	0.307	0.40	2.03	0.54	0.993		
	BSHW	0.279	0.37	2.08	0.26	0.991		
<i>V. harveyi</i> (14126)	MB	0.351	0.41	2.04	0.57	0.994		
	BSHW	0.307	0.32	1.96	0.27	0.990		

MB = marine broth; and BSHW = brine shrimp hatching water.

### 3. Results

#### 3.1. Proliferation of *Vibrio* in the brine shrimp hatching water

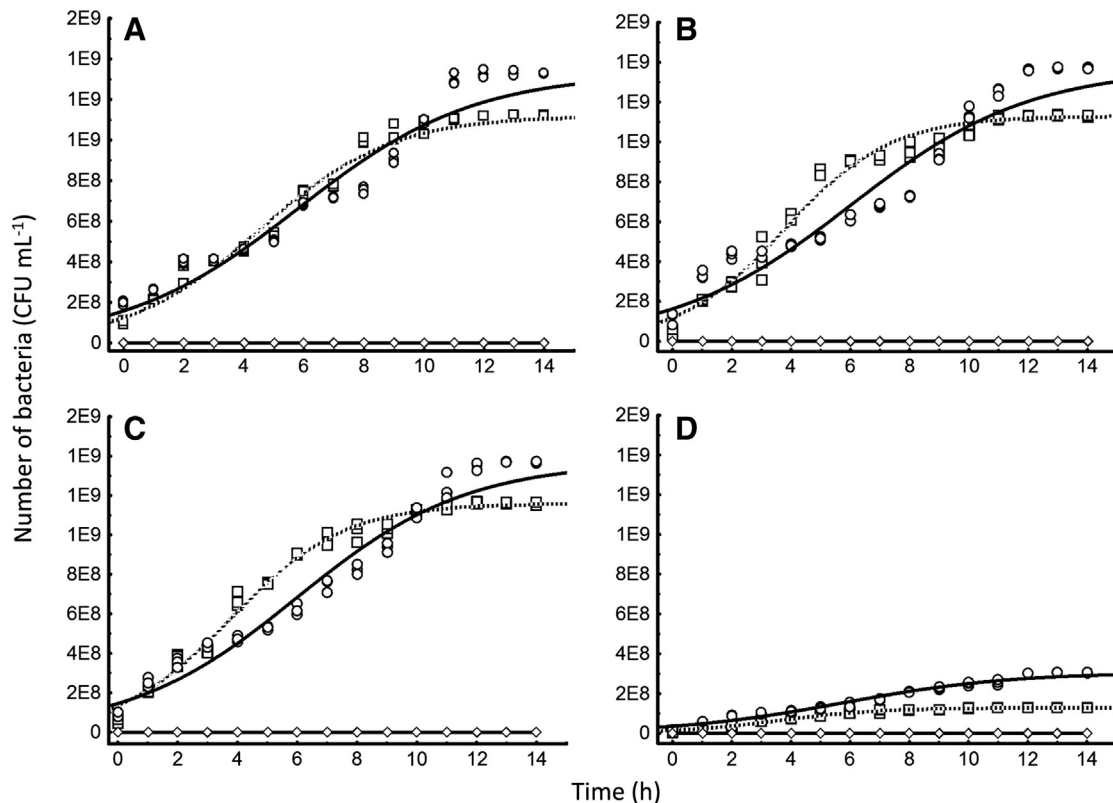
The four strains used in this study proliferated abundantly in BSHW. The recorded growth followed a logistic tendency (the correlation values, R, were always statistically significant) (Table 1). The growth rate in BSHW was estimated between 0.197 and 0.307 generations · h<sup>-1</sup>, and the stationary stage was reached at ca. 12 h with a maximum growth of 3 × 10<sup>8</sup> CFU · ml<sup>-1</sup> for *V. parahaemolyticus* and 1 × 10<sup>9</sup> CFU · ml<sup>-1</sup> for *V. harveyi*. In average, the growth rate (K) and the maximum growth recorded in BSHW were ~15% and ~32% smaller than those recorded in MB, respectively (Fig. 1a, b, c, d). The controls remained unchanged throughout the experiment.

#### 3.2. Colonization of *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi* on brine shrimp cysts

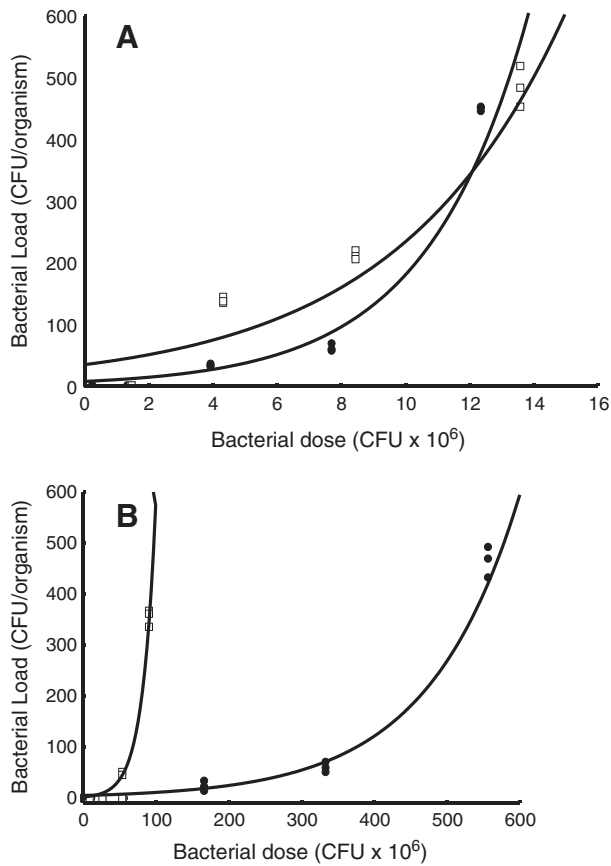
The axenic cysts exposed to different dosages of vibrios were promptly colonized and the final numbers of bacteria on the cyst or

nauplii surfaces were directly correlated with the number of inoculated bacteria, significant correlation values were calculated for all strains: for *V. parahaemolyticus* strain PS-017, R = 0.98, and for strain ATCC 17802, R = 0.89, and for *V. harveyi* strain EC11, R = 0.88, and for strain ATCC 14126, R = 0.86, (in all cases P < 0.05). The relationship between the number of inoculated bacteria (dose) and the number of bacteria per organism (bacterial load) followed exponential tendencies in all cases (Fig. 2). Apparent differences in the colonization ability of the strains were found, i.e., the highest bacterial load was recorded as ca. 500 CFU per organism; however, the required dose to reach this bacterial load was different between strains: for *V. parahaemolyticus* (PS-017 and 17802) the highest bacterial load was recorded at a dose of ca. 14 × 10<sup>6</sup> CFU ml<sup>-1</sup>, whereas *V. harveyi* needed doses between 100 and 600 × 10<sup>6</sup> CFU ml<sup>-1</sup> to reach the same bacterial load.

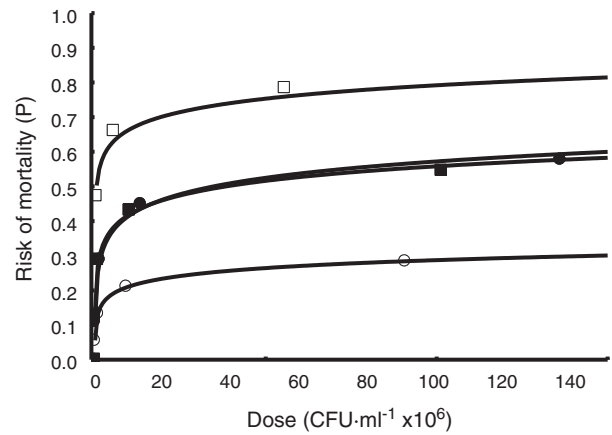
The adhesion and subsequent colonization of the cyst apparently began on the hatching area (where rupture of cysts' outer cuticular membrane occurs). At hatching, nauplii were seen covered with bacteria and, unlike the controls, some organisms had apparent damage, such as erratic swimming and lack of appendages. In some cases, death occurred during hatching or within the first 4 h after hatching.



**Fig. 1.** Growth of *V. parahaemolyticus* strain PS017 (A), and strain 17802 (B); *V. harveyi* strain EC11 (C) and strain 14126 (D) in brine shrimp hatching water BSHW (—), marine broth MB (---), and artificial sea water SASW (.....).



**Fig. 2.** Bacterial load of brine shrimp exposed to different doses of *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi* during hatching: (A) *V. parahaemolyticus* strain PS-017 (□) and strain ATCC 17802 (●) and (B) *V. harveyi* strain EC11 (□) and strain ATCC 14126 (●). For details, see the text.



**Fig. 3.** Probability of mortality in brine shrimp during hatching when exposed to different dosages of *V. parahaemolyticus* strain PS-017 (■) and strain ATCC 17802 (●) and *V. harveyi* strain EC11 (□) and strain ATCC 14126 (○).

### 3.3. Effect of *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi* on the cyst viability and early survival of brine shrimp

*V. parahaemolyticus* and *V. harveyi* induced damage and mortality during brine shrimp hatching. The organisms experimentally infected with PS-017, ATCC-17802, and EC11 showed lethargy, red coloration, and damage or lack of upper appendages. These *Vibrio* strains also produced significant losses in the final yield of brine shrimp cysts ( $P < 0.001$ ), which increased according to dose increases (Table 2). However, differences were observed in the effect of each strain (Fig. 3).

The highest dosage (1000  $\mu\text{l}$ ) of PS-017 induced significant increases in CM, HM, and PHM ( $P < 0.05$ ) whereas the 100  $\mu\text{l}$  dose caused significant increase in HM and PHM ( $P < 0.05$ ) but not in CM (Table 2).

The dosages of 100 and 1000  $\mu\text{l}$  of ATCC 17802 induced significant increases in CM, HM, and PHM ( $P < 0.05$ ) and, in this case, a dosage of

**Table 2**

Effect of the exposure to different dosages of *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi* during brine shrimp hatching. TM = total mortality; CM = cyst mortality (unhatched organism); HM = hatching mortality (organism death during hatching inside the cyst or in the hatching membrane); and PHM = post-hatching mortality (death of free nauplii). (Data are the average obtained of triplicates and standard deviation in parenthesis; different superscripts indicate significant differences when comparing among doses).

Strain	Stage	Bacterial dose ( $\mu\text{l}$ )					P
		0	1	10	100	1000	
<i>V. parahaemolyticus</i> PS017	CM	7.50 (3.11) <sup>ab</sup>	7.75 (4.57) <sup>ab</sup>	5.00 (3.37) <sup>a</sup>	15.50 (3.32) <sup>b</sup>	25.25 (4.99) <sup>c</sup>	***
	HM	3.00 (0.82) <sup>a</sup>	6.25 (4.43) <sup>ab</sup>	8.00 (2.16) <sup>ab</sup>	10.25 (0.96) <sup>b</sup>	10.25 (0.96) <sup>b</sup>	**
	PHM	7.25 (2.99) <sup>a</sup>	15.25 (7.97) <sup>a</sup>	14.75 (3.86) <sup>a</sup>	35.75 (4.03) <sup>b</sup>	47.25 (3.40) <sup>c</sup>	***
	HTM	17.75 (6.85) <sup>a</sup>	29.25 (16.60) <sup>a</sup>	27.75 (4.35) <sup>a</sup>	61.50 (3.11) <sup>b</sup>	82.75 (9.11) <sup>c</sup>	***
	NM	0.25 (0.53) <sup>a</sup>	56.25 (0.53) <sup>b</sup>	67.25 (0.53) <sup>c</sup>	77.50 (0.57) <sup>d</sup>	88.50 (0.57) <sup>e</sup>	***
<i>V. parahaemolyticus</i> 17802	CM	3.25 (2.63) <sup>a</sup>	6.00 (3.00) <sup>ab</sup>	4.33 (4.93) <sup>a</sup>	14.00 (3.16) <sup>b</sup>	25.00 (5.23) <sup>c</sup>	***
	HM	1.25 (0.50) <sup>a</sup>	6.67 (3.21) <sup>b</sup>	6.33 (1.53) <sup>b</sup>	10.25 (0.96) <sup>bc</sup>	12.50 (3.11) <sup>c</sup>	***
	PHM	6.50 (3.11) <sup>a</sup>	10.67 (2.08) <sup>a</sup>	12.00 (1.00) <sup>a</sup>	37.00 (4.08) <sup>b</sup>	47.75 (6.08) <sup>c</sup>	***
	HTM	11.00 (5.83) <sup>a</sup>	23.33 (7.64) <sup>a</sup>	22.67 (4.62) <sup>a</sup>	61.25 (4.11) <sup>b</sup>	85.25 (5.50) <sup>c</sup>	***
	NM	1.00 (0.81) <sup>a</sup>	58.75 (0.53) <sup>b</sup>	68.75 (1.25) <sup>c</sup>	78.50 (0.57) <sup>d</sup>	87.75 (0.53) <sup>e</sup>	***
<i>V. harveyi</i> EC11	CM	3.75 (2.22) <sup>a</sup>	11.00 (0.82) <sup>ab</sup>	13.75 (6.95) <sup>b</sup>	14.25 (1.26) <sup>b</sup>	12.25 (0.96) <sup>b</sup>	**
	HM	2.00 (0.82) <sup>a</sup>	1.50 (0.58) <sup>a</sup>	7.00 (0.82) <sup>c</sup>	3.75 (2.22) <sup>ab</sup>	6.25 (1.50) <sup>bc</sup>	***
	PHM	3.75 (2.22) <sup>a</sup>	57.00 (9.06) <sup>b</sup>	61.00 (6.38) <sup>bc</sup>	62.75 (2.06) <sup>bc</sup>	69.00 (3.27) <sup>c</sup>	***
	HTM	9.50 (5.07) <sup>a</sup>	69.00 (9.93) <sup>b</sup>	81.75 (7.27) <sup>bc</sup>	80.75 (0.96) <sup>bc</sup>	87.50 (1.91) <sup>c</sup>	***
	NM	0.75 (0.57) <sup>a</sup>	56.00 (0.81) <sup>b</sup>	77.50 (0.57) <sup>c</sup>	86.50 (1.00) <sup>d</sup>	90.75 (0.53) <sup>e</sup>	***
<i>V. harveyi</i> 14126	CM	9.25 (5.12)	9.75 (2.50)	10.75 (2.22)	9.25 (0.96)	10.75 (2.50)	ns
	HM	7.25 (4.19) <sup>ab</sup>	9.25 (1.26) <sup>b</sup>	10.25 (0.96) <sup>b</sup>	13.00 (0.82) <sup>bc</sup>	10.50 (1.91) <sup>b</sup>	*
	PHM	9.25 (5.12)	16.25 (4.99)	14.50 (4.80)	17.25 (3.86)	15.50 (5.32)	ns
	HTM	25.75 (14.36)	35.25 (7.50)	35.50 (7.14)	39.50 (4.65)	36.75 (9.22)	ns
	NM	0.25 (0.57) <sup>a</sup>	3.00 (1.41) <sup>b</sup>	10.75 (0.95) <sup>c</sup>	18.50 (1.00) <sup>d</sup>	19.75 (0.53) <sup>d</sup>	***

ns = not significant.

\*  $P < 0.05$ .

\*\*  $P < 0.01$ .

\*\*\*  $P < 0.001$ .



1  $\mu$ l was enough to induce significant increase in HM ( $P < 0.05$ ) (Table 2). The 10- $\mu$ l dosage of EC11 induced significant increases in CM, HM, and PHM ( $P < 0.05$ ) and, apparently, the newly hatched brine shrimps were more susceptible to EC11 than to PS-017 and ATCC 17802, since the smallest dose (1  $\mu$ l) was enough to induce an increase of 53% in PHM ( $P < 0.001$ ) (Table 2). In contrast, no lesions or significant mortality were recorded in the samples infected with *V. harveyi* strain ATCC 14126 ( $P > 0.2$ ).

The mortality values recorded at different dosages during cyst challenge (measured as CM, HM, PHM, or TM) were directly correlated with the effect produced during the standard nauplii challenge (Table 3). With PS-017 and ATCC 17802 (*V. parahaemolyticus*) and EC11 (*V. harveyi*), significant correlation values were found between all recorded values. In contrast, the mortality values induced by the strain ATCC 14126 during cyst challenge were significantly correlated among them, but did not correlate with the effect recorded during nauplii challenge (Table 3).

#### 4. Discussion

In this study, the risk of *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi* infection was evaluated during different events of the hatching process of brine shrimp. Previous studies demonstrated significant effects of microbial communities during early development of brine shrimp (Hipólito-Morales et al., 2009; Orozco-Medina et al., 2002); however, the effect of pathogenic bacteria during reactivation and hatching of brine shrimp has not been documented previously.

Brine shrimp cysts were challenged during incubation with four strains of *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi*. All tested strains colonized the cyst surface during the first 2 h after exposure and, at the end of each experiment (at 15 h), the bacterial load on umbrella and instar I stages was directly correlated with the number of inoculated bacteria (Fig. 2). Contrary to reports by Austin and Allen (1982), these *Vibrio* strains seem to occur intimately associated to brine shrimp surfaces as evidenced by the number of colonizing bacteria obtained after an abundant washing with sterile seawater.

Apparently, *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi* colonize the embryo surfaces before hatching, even causing death. Bacterial growth, generally, is not considered a major factor in the performance of brine shrimp cysts and low hatching rates are generally attributed to poor quality of cyst batches. However, considering that *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi* proliferate during the production of nauplii it is reasonable to assume that they also have an adverse effect on the performance of cysts.

**Table 3**

Correlation matrix between the mortality recorded at different stages of development during the challenge of brine shrimp with different strains of *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi*. CM = cyst mortality; HM = hatching mortality; PHM = post-hatching mortality; TM = total mortality; and NM = nauplii mortality. Asterisk labeled data (\*) are significant at  $P < 0.05$ . For details see the text.

	1	2	3	4	1	2	3	4
	<i>V. parahaemolyticus</i> PS017				<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC17802			
1. CM	–				–			
2. HM	0.581*	–			0.732*	–		
3. PHM	0.901*	0.763*	–		0.897*	0.793*	–	
4. TM	0.939*	0.777*	0.991*	–	0.947*	0.844*	0.985*	–
5. NM	0.537*	0.779*	0.769*	0.738*	0.664*	0.865*	0.752*	0.778*
	<i>V. harveyi</i> EC11				<i>V. harveyi</i> ATCC 14126			
1. CM	–				–			
2. HM	0.441	–			0.595*	–		
3. PHM	0.720*	0.487*	–		0.592*	0.758*	–	
4. TM	0.799*	0.565*	0.989*	–	0.788*	0.879*	0.940*	–
5. NM	0.765*	0.587*	0.954*	0.968*	0.114	0.601*	0.403	0.428

The ability of brine shrimp nauplii to accumulate bacteria has been broadly documented (Gómez-Gil et al., 2004; López-Torres and Lizárraga-Partida, 2001; Soto-Rodríguez et al., 2003). This attribute has been used to produce biocapsule and to induce experimental vibriosis in fish and shellfish larvae. However, brine shrimp nauplii are susceptible to a number of vibrios; in consequence, brine shrimp was adopted recently as a model to evaluate the virulence of different *Vibrio* isolates obtained during outbreaks occurring in other organisms, i.e., shrimp (Darshane et al., 2011; Haldar et al., 2010) or to evaluate innovative strategies to control *Vibrio* infections (Defoirdt et al., 2006; Marques et al., 2006; Subhadra et al., 2010; Yeong et al., 2007).

In the present study, *V. parahaemolyticus* (strains PS-017 and ATCC-17802) and *V. harveyi* (strain EC11) induced significant mortality during all stages of development (CM, HM, and PHM). In fact it is not uncommon for these species of vibrios to cause damage in cysts, because they are generally considered opportunistic pathogens. The most remarkable finding is the correlation between the recorded effect during cyst hatching and the mortality recorded in a standard nauplii challenge model, which suggests that cyst challenge could serve as an indicator of the virulence of different strains. However, it must be taken into account that the mechanisms that determine the virulence of *V. parahaemolyticus*, for each stage of development, are not necessarily the same.

The relationship between the dose of *Vibrio* and the response, in terms of mortality, is an important concept of the model used in this study that is based on the ability of pathogens to colonize and to cause death (Cannon and Garner, 1999; Donaldson, 1997). In this case, the doses of bacteria were used to estimate the likelihood of causing death by each strain. Although these methods are based on probabilistic arguments, and do not provide an estimate of individual value variance of each strain that could be deterministic and, therefore, of limited use in evaluating the stochastic risk analysis. However, the uncertainty around the values obtained in the present study was adjusted to the beta-Poisson model employed by French et al. (2002). In these terms, we calculated that for none of the analyzed strains the probability of death becomes one (Fig. 3); however, considering that these data were obtained under “ideal” conditions, we suppose that the risk of death will increase due to biological or environmental factors different from those used in the present study.

Gnotobiotic models have become an indispensable tool to understand the beneficial or pathogenic role of specific microorganisms in aquaculture because their use eliminates the bias caused by interaction with other microbes (Marques et al., 2005; Martínez-Díaz et al., 2003). The model developed in this study is potentially useful to evaluate specific therapies in crustaceans because the results are very reproducible. Our study included three periods in which *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi* can induce damages to brine shrimp: (1) within the cysts, (2) at hatching, and (3) after hatching. Each stage was susceptible to both bacteria; also there was a high correlation between the recorded mortality at each stage, suggesting that bacterial virulence could be assessed from hatching on, which markedly facilitates the assessment through the reduction of time and labor required. Unfortunately, its use may depend on the species to evaluate, since, in some cases, the damages induced by bacteria are associated with physical obstruction; for example, *V. alginolyticus* hinders swimming of brine shrimp nauplii during dense colonization (Gunther and Catena, 1980). Other investigations will be necessary to determine in which cases the cyst challenge model can replace nauplii models.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.03.008>.

#### Acknowledgments

This research was supported by projects SIP 20100865 and CONACyT 085033. EQG thanks CONACyT for the support through grant number

34984, and the Secretariat for Research and Graduate studies (SIP-IPN) for the support through PIFI grant.

## References

- Austin, B., Allen, D.A., 1982. Microbiology of laboratory-hatched brine shrimp (*Artemia*). *Aquaculture* 26, 369–383.
- Balcázar, J.L., Rojas-Luna, T., 2007. Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Current Microbiology* 55, 409–412.
- Balcázar, J.L., Pintado, J., Planas, M., 2010. *Bacillus galliciensis* sp. nov., isolated from faeces of wild seahorses (*Hippocampus guttulatus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 892–895.
- Cannon, R.M., Garner, M.G., 1999. Assessing the risk of windborne spread of foot-and-mouth disease in Australia. *Environment International* 25, 713–723.
- Chang, Y.S., Lo, C.F., Peng, S.E., Liu, K.F., Wang, C.H., Kou, G.H., 2002. White spot syndrome virus (WSSV) PCR-positive *Artemia* cysts yield PCR-negative nauplii that fail to transmit WSSV when fed to shrimp postlarvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 49, 1–10.
- Darshane, Ruwandeepika, H.A., Paban Bhowmick, Patit, Karunassagar, Indrani, Bossier, Peter, Defoirdt, Tom, 2011. Quorum sensing regulation of virulence gene expression in *Vibrio harveyi* in vitro and in vivo during infection of gnotobiotic brine shrimp larvae. *Environmental Microbiology* 3, 597–602.
- Defoirdt, T., Bossier, P., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2005. The impact of mutations in the quorum sensing systems of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio harveyi* on their virulence towards gnotobiotically cultured *Artemia franciscana*. *Environmental Microbiology* 1239–1247.
- Defoirdt, T., Halet, D., Sorgeloos, P., Bossier, P., Verstraete, W., 2006. Short-chain fatty acids protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbelli*. *Aquaculture* 261, 804–808.
- Donaldson, A.I., 1997. Risks of spreading foot and mouth disease through milk and dairy products. *Rev Sci Tech Of Int Epizoot* 16, 117–124.
- French, N.P., Kelly, L., Jones, R., Clancy, D., 2002. Dose–response relationships for foot and mouth disease in cattle and sheep. *Epidemiology and Infection* 128, 325–332.
- Gómez-Gil, B., Thompson, F.L., Thompson, C.C., García-Gasca, A., Roque, A., Swings, J., 2004. *Vibrio hispanicus* sp. nov., isolated from *Artemia* sp. and sea water in Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 261–265.
- Gunther, D.C., Catena, A., 1980. The interaction of *Vibrio* with *Artemia* nauplii. In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.), *The Brine Shrimp Artemia*. Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 213–221.
- Haldar, S., Chatterjee, S., Sugimoto, N., Das, S., Chowdhury, N., Hinenoya, A., Asakura, M., Yamasaki, S., 2010. Identification of *Vibrio campbellii* isolated from diseased farm shrimps from south India and establishment of its pathogenic potential in an *Artemia* model. *Microbiology* 157, 179–188.
- Hipólito-Morales, A., Maeda-Martínez, A.M., Martínez-Díaz, S.F., 2009. Use of *Microbacterium* sp. and *Exiguobacterium mexicanum* to improve the survival and development of *Artemia* under xenic conditions. *Aquaculture International* 17, 85–90.
- Høj, L., Bourne, D., Hall, M.R., 2009. Localization, abundance and community structure of bacteria associated with *Artemia*: effects of nauplii enrichment and antimicrobial treatment. *Aquaculture* 293, 278–285.
- López-Torres, M.A., Lizárraga-Partida, M.L., 2001. Bacterial isolated on TCBS media associated with hatched *Artemia* cysts of commercial brands. *Aquaculture* 194, 11–20.
- Marques, A., Ollivier, F., Verstrate, W., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2005. Gnotobiotically grown aquatic animals: opportunities to investigate host–microbe interactions. *Journal of Applied Microbiology* 100, 903–918.
- Marques, A., Dhont, J., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2006. Immunostimulatory nature of  $\beta$ -glucans and baker's yeast in gnotobiotic *Artemia* challenge tests. *Fish & Shellfish Immunology* 20, 682–692.
- Martínez-Díaz, S.F., Álvarez-González, C.A., Moreno-Legorreta, M., Vázquez-Juárez, R., Barrios-González, J., 2003. Elimination of the associated microbial community and bioencapsulation of bacteria in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture International* 11, 95–108.
- Moore, M.M., Strom, M.S., 2003. Infection and mortality by the yeast *Metschnikowia bicuspidata* var. *bicuspidata* in Chinook salmon fed live adult brine shrimp *Artemia franciscana*. *Aquaculture* 220, 43–57.
- Orozco-Medina, C., Maeda-Martínez, A.M., López-Cortés, A., 2002. Effect of aerobic Gram-positive heterotrophic bacteria associated with *Artemia franciscana* cysts on the survival and development of its larvae. *Aquaculture* 213, 15–29.
- Rico-Mora, R., Voltolina, D., 1995. Effects of bacterial isolates from *Skeletonema costatum* cultures on the survival of *Artemia franciscana* nauplii. *Journal of Invertebrate Pathology* 66, 203–204.
- Sogerloos, P., Dhert, P., Candevra, P., 2001. Use of brine shrimp, *Artemia* spp. in marine fish larviculture. *Aquaculture* 200, 147–159.
- Soto-Rodríguez, Sonia, Roque, A., Lizárraga-Partida, M.L., Guerra-Flores, A.L., Gómez-Gil, B., 2003. Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana* nauplii. *Diseases of Aquatic Organisms* 53, 231–240.
- Straub, D.V., Dixon, B.A., 1993. Bacterial flora of the brine shrimp *Artemia franciscana* from a hypersaline pond in San Francisco Bay, California. *Aquaculture* 118, 309–313.
- Subhadra, B., Hurwitz, I., Fieck, A., Rao, D.V.S., Subba Rao, G., Durvasula, R., 2010. Development of paratransgenic *Artemia* as a platform for control of infectious diseases in shrimp mariculture. *Journal of Applied Microbiology* 108, 831–840.
- Wietz, M., Hall, M., Høj, L., 2009. Effects of seawater ozonation on biofilm development in aquaculture tanks. *Systematic and Applied Microbiology* 32, 266–277.
- Yeong, Y.S., Van Damme, E., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2007. Non-lethal heat shock protects gnotobiotic *Artemia franciscana* larvae against virulent vibrios. *Fish & Shellfish Immunology* 22, 318–326.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Romboutz, F.M., Riet, K.V., 1990. Modeling the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1875–1881.