

T  
576.162  
CAL



# ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

**“Enriquecimiento de agar Marino y TCBS con caldos de músculo y hepatopáncreas de camarón *Penaeus vannamei*”**

TESIS DE GRADO

Previa la obtención del título de ACUICULTOR



BIBLIOTECA  
ING. MARITIMA

Presentada por

**Gonzalo Calero Vazquez**

GUAYAQUIL-ECUADOR  
1998

## DECLARACION EXPRESA

"La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL":

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL).



BIBLIOTECA  
IAC, ING.  
MARITIMA

A handwritten signature in black ink, which appears to read "Gonzalo Calero Vázquez". The signature is written in a cursive style and is positioned above a horizontal line.

Gonzalo Calero Vázquez



BIBLIOTECA  
F. P. G.  
MAYAGÜEZ

A highly stylized, cursive handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.

Presidente del tribunal

A cursive handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.

Director de Tesis

A cursive handwritten signature in black ink, enclosed within an oval shape, written over a horizontal line.

Miembro del Tribunal

A cursive handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.

Miembro del Tribunal

DEDICATORIA



BIBLIOTECA  
IAC, INC.  
MAGILLIMA

A mis padres

## **Agradecimientos**

Agradezco a mis padres, por su apoyo y dedicación a través de todos mis años de estudio.

Al equipo del área de Bacteriología del CENAIM, Marcelo Muñoz, Mara Zherdmant, Lorena San Miguel, Fanny Panchana y Rosa Malavé por su ayuda y tiempo.

Un agradecimiento muy especial para el Ac. Marcelo Muñoz por haber aceptado el reto de dirigir este trabajo y haberlo hecho de gran manera.

A la M Sc. Virna Cedeño por su colaboración en la edición de este documento.

Al Dr. Eric Mialhe por su invaluable tiempo y gran ayuda durante toda la realización de este trabajo.

A todos los amigos y compañeros del CENAIM.

Al Ing. Raul Coello por sus consejos y guía durante mis años de estudiante en la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias de Mar.

Al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) y a su director General Dr. Jorge Calderón.

A la camaronera Fuentes y las personas que la conforman por su colaboración durante los muestreos en sus piscinas.

Al área de Maduración por haber cooperado con sus camarones para la realización de los caldos de músculo y hepatopáncreas.



BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MARITIMA



BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MANILA

## TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS.....	ii
ABREVIATURAS.....	iii
INDICE DE FIGURAS.....	iv
INDICE DE TABLAS.....	v
INDICE DE FOTOS.....	viii
RESUMEN.....	ix
INTRODUCCION.....	1
1. ANTECEDENTES.....	3
1.1. Enfermedades bacterianas asociadas a cultivo de camarón.....	3
1.2. Crecimiento y metabolismo bacteriano.....	6
1.3. Medios de cultivo.....	13
1.3.1. Agar Marino.....	16
1.3.2. Agar TCBS.....	16
1.3.3. Agares complejos indefinidos (agares enriquecidos).....	17
2. MATERIALES Y METODOS.....	19
2.1. Material biológico.....	19
2.1.1. Animales.....	19
2.1.2. Cepas bacterianas.....	19
2.2. Metodología.....	21
2.2.1. Técnicas de bacteriología.....	21
2.2.1.1. Preparación de caldos.....	21
2.2.1.1.1. Método de centrifugado y filtrado por membrana (Método 1).....	21
2.2.1.1.2. Método de licuado y filtrado por gasa (Método 2).....	21
2.2.1.2. Preparación de los medios de cultivo.....	21

BIBLIOTECA  
FAC. INC.  
MARITIMA

2.2.1.3. Preparación de los medios enriquecidos con caldo de músculo y hepatopáncreas.....	22
2.2.1.4. Siembra y cuantificación del crecimiento bacteriano.....	22
2.2.1.5. Técnicas de pruebas bioquímicas.....	23
2.2.2. Diseño experimental.....	23
2.2.3. Análisis estadístico.....	24
3. RESULTADOS Y DISCUSION.....	25
3.1. Evaluación de aditivos y sustitutos del Agar Marino.....	25
3.1.1. Evaluación del caldo de músculo como aditivo o sustituto del Agar Marino.....	25
3.1.2. Comparación de dos tipos de caldos de músculo.....	31
3.1.3. Evaluación de diferentes suplementos de sales en el medio Mus2-Agar.....	34
3.1.4. Evaluación del caldo de hepatopáncreas como aditivo o sustituto del Agar Marino.....	37
3.2. Evaluación de aditivos en el medio Agar TCBS.....	40
3.2.1. Evaluación de la selectividad "cualitativa" del medio Agar TCBS.....	40
3.2.2. Evaluación del caldo de músculo en el medio Agar TCBS.....	42
3.2.3. Evaluación de diferentes suplementos de sales en el medio TCBS-Mus25%.....	46
3.3. Evaluación clínica de los medios Agar Marino, Mus2-Agar-SS, Agar TCBS y Agar TCBS-Mus25%-SS.....	48
CONCLUSIONES .....	54
RECOMENDACIONES.....	58
BIBLIOGRAFIA.....	59
ANEXOS.....	62

**INDICE DE ABREVIATURAS**

ATP	: Adenosin trifosfato	spp.	: especies
A.M.	: Agar Marino	SZ <sub>22</sub>	: Cepa de <i>Vibrio damsella</i>
B <sub>1158-2</sub>	: Cepa de <i>Pseudomonas spp.</i>	TCBS	: Thiosulfate-citrate-bile-salts
B <sub>1163-1</sub>	: Cepa de <i>Vibrio tubiashii.</i>	TSA	: Tryptic soy agar
C	: Contaminado	UFC	: Unidades formadoras de colonia
D.O.	: Densidad óptica	μL	: Microlitro
E22	: Cepa de <i>Vibrio harvey</i>	μm	: Micrometro
g	: Gramos	V.	: Vibrio
I	: Incontables	v/v	: volumen sobre volumen
Ili	: Cepa de <i>Vibrio alginolyticus</i>		
ml	: Mililitro		
mM	: Milimolar		
nm	: Nanómetro		
p/v	: peso sobre volumen		
Q7	: Cepa bacteriana no identificada		
Q13	: Cepa bacteriana no identificada		
Q16	: Cepa bacteriana no identificada		
Q34	: Cepa bacteriana no identificada		
Qaβ	: Cepa bacteriana no identificada		
R%	: Coeficiente de recuperación		
r.p.m.	: Revoluciones por minuto		
S <sub>2</sub>	: Cepa de <i>Vibrio vulnificus</i>		
SS	: Sea Salts		
sp.	: especie		



BIBLIOTECA  
I.S.I. INC.  
MARQUEA



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Curva de crecimiento bacteriano.....	7
Figura 2: Siembra de las bacterias sobre el agar.....	23
Figura 3: Total de bacterias identificadas sobre los distintos medios de cultivo durante los muestreos.....	51



BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MARITIMA



## INDICE DE TABLAS

BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MAKILLIMA

- Tabla 1: Morfologías y números de UFC aisladas por ml de suspensiones de *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *V. tubiashii*. Los medios corresponden respectivamente a: Agar Marino (medio AM); AM enriquecido con caldo de músculo preparado por el método 1 e incorporado a diferentes concentraciones (25%/50%/75%/100%), adicionando NaCl (2%) (medios AM-Mus X%-NaCl); Caldo de músculo preparado por el método 1 con 2% de Bacto Agar y 2% de NaCl (medio Mus-Agar-NaCl)..... 28
- Tabla 2. Morfologías y números de UFC aisladas por ml de suspensiones de *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *V. tubiashii*. Los medios corresponden respectivamente a: Agar Marino (medio AM); AM enriquecido con caldo de músculo preparado por el método 1 e incorporado a diferentes concentraciones (25%/50%/75%/100%), adicionando NaCl (2%) (medios AM-Mus X%-NaCl); Caldo de músculo preparado por el método 1 con 2% de Bacto Agar y 2% de NaCl (medio Mus-Agar-NaCl)..... 30
- Tabla 3. Morfologías y números de UFC aisladas por ml. de suspensiones de *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *V. tubiashii*. Los medios corresponden respectivamente a: Caldo de músculo preparado por el método 1 y Caldo de músculo preparado por el método 2, ambos con 2% de Bacto Agar y 2% de NaCl (medio Mus-Agar-NaCl)..... 34
- Tabla 4. Morfologías y números de UFC aisladas por ml. de suspensiones de *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *V. tubiashii*. Los medios corresponden respectivamente a: Agar Marino (medio AM); Caldo de músculo preparado por el método 2 con 2% de Bacto Agar y 40g/l de SS.(medio Mus2-Agar-SS.); Caldo de músculo preparado por el método 2 con 2% de Bacto Agar y agua de mar en vez de agua destilada (medio Mus2-Agar-A. mar); Caldo de

músculo preparado por el método 2 con 2% de Bacto Agar y 2% de NaCl (medio Mus2-Agar-NaCl )..... 35

Tabla 5. Morfologías y números de UFC aisladas por ml de suspensiones de *V. damsella* y *Pseudomonas sp.* Los medios corresponden respectivamente a: Agar Marino (medio AM); Caldo de músculo preparado por el método 2 con 2% de Bacto Agar y 40g/l de SS..... 36

Tabla 6. Morfología y números de UFC aisladas por ml de suspensiones de *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *V. tubiashii*. Los medios corresponden respectivamente a: Agar Marino (medio AM); AM enriquecido con caldo de hepatopáncreas preparado por el método 1 e incorporado a diferentes concentraciones (25%/50%/75%/100%), adicionando NaCl (2%) (medios AM-HepX%-NaCl); Caldo de hepatopáncreas preparado por el método 1 con 2% de Bacto Agar y 2% de NaCl (medio Mus-Agar-NaCl)..... 39

Tabla 7. Morfologías y números de UFC aisladas por ml de de *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *V. tubiashii* correspondientes a cuatro diluciones ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) de suspensiones correspondientes a una densidad óptica de 0,17 a 550 nm..... 41

Tabla 8. Morfología y números de UFC aisladas por ml. de suspensiones de *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *V. tubiashii*. Los medios corresponden respectivamente a: Agar TCBS; Agar TCBS enriquecido con caldo de músculo preparado por el método 2 e incorporado a diferentes concentraciones (25%/50%/75%/100%), adicionando NaCl (2%) (medios TCBS-Mus X%-NaCl.); caldo de músculo preparado por el método 2 con 2% de Bacto Agar y 40g/l de SS.(medio Mus-Agar-SS.)..... 45

Tabla 9. Morfología y números de UFC aisladas por ml de suspensiones de *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *V. tubiashii*. Los medios corresponden respectivamente a: Agar TCBS; Agar TCBS enriquecido con 25% de caldo de músculo preparado por el método 2 y con 0.5%

NaCl (medio TCBS-Mus 25%-NaCl); Agar TCBS enriquecido con 25% de caldo de músculo preparado por el método 2 y con 40g/l de SS.(medio TCBS-Mus 25%-SS.)..... 47

Tabla 10. Morfología y números de UFC aisladas por ml de suspensiones de *Pseudomonas sp.* y *V. damsella*. Los medios corresponden respectivamente a: Agar TCBS (TCBS); Agar TCBS enriquecido con 25% de caldo de músculo preparado por el método 2 y 40 g/l de SS (TCBS-Mus 25%-SS)..... 48



BIBLIOTECA  
FAC. INC.  
MARILINA

**INDICE DE FOTOS**

- Foto No. 1. Morfología de las colonias de *V. alginolyticus* aisladas sobre AM, AM-Mus25%-NaCl, AM-Mus50%-NaCl y AM-Mus75%-NaCl (de izquierda a derecha) con su respectiva réplica.....26
- Foto No. 2. Morfología de las colonias de *V. alginolyticus* aisladas sobre AM, AM-Mus50%-NaCl, AM-Mus100%-NaCl y Mus-Agar-NaCl (de izquierda a derecha) con su respectiva réplica.....26
- Foto No. 3. Morfología de las colonias de *V. alginolyticus* aisladas sobre Mus-Agar-NaCl preparado por el método 2 (licuado y filtrado por gasa) (arriba) y Mus-Agar-NaCl preparado por el método 1 (centrifugado y filtrado por membrana 0,45  $\mu$ M) (abajo) con su respectiva réplica.....32
- Foto No. 4. Morfología de las colonias de *V. tubiashii* aisladas sobre Mus-Agar-NaCl preparado por el método 1 (centrifugado y filtrado por membrana 0,45  $\mu$ M) (arriba) y Mus-Agar-NaCl preparado por el método 2 (licuado y filtrado por gasa) (abajo).....33
- Foto No. 5. Morfología de las colonias de *V. alginolyticus* aisladas sobre Mus2-Agar-NaCl (arriba), TCBS (mitad) y TCBS-Mus25%-NaCl (abajo) con su respectiva réplica.....43
- Foto No. 6. Morfología de las colonias de *V. alginolyticus* aisladas sobre TCBS-Mus50%-NaCl (arriba), TCBS-Mus25%-NaCl (mitad) y TCBS (abajo) con su respectiva réplica.....43
- Foto No. 7. Morfología de las colonias de *V. vulnificus* aisladas sobre Agar TCBS (arriba) y TCBS-Mus25%-NaCl (abajo) con su respectiva réplica.....44



BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MANIFIESTA



## RESUMEN

BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MARÍTIMA

En cultivo de camarón, los monitoreos bacteriológicos se realizan en base al uso de medios de aislamiento originalmente concebidos para bacterias de importancia médica. De hecho, la composición de estos medios podría ser inadecuada para aislar las bacterias marinas asociadas con el camarón, en particular aquellas patógenas y adaptadas para aprovechar componentes provenientes de células muertas por toxinas bacterianas. El presente trabajo fue desarrollado con los dos medios clásicamente utilizados, el Agar Marino (AM) y el TCBS, con el objetivo de optimizarlos o reemplazarlos.

Para evaluar cuali y cuantitativamente los cambios en los aislamientos bacterianos en relación con las modificaciones hechas en los medios, fueron utilizadas cinco cepas bacterianas: *Vibrio alginolyticus* (cepa ILI), *Vibrio vulnificus* (cepa S2), *Vibrio tubiashii* (cepa B1163-1), *Vibrio damsella* (cepa SZ22) y *Pseudomonas sp.* (cepa B1158-2). Las dos primeras cepas corresponden a bacterias probióticas y patógenas respectivamente, mientras que se desconoce las propiedades de las tres restantes por falta de estudios profundos en estas. Además, una evaluación clínica fue realizada para complementar las análisis comparativos entre los medios de referencia (AM y TCBS) y los medios desarrollados.

Caldos de músculo (métodos de preparación 1 y 2) o caldo de hepatopáncreas de camarón *Penaeus vannamei* fueron considerados como aditivos (25, 50, 75, 100%) o sustitutos (100% de caldo con 2% agar) para los dos medios de aislamiento (AM y TCBS) y, paralelamente, fueron probadas tres diferentes formulaciones de sales (NaCl, agua de mar, Sea salts®).

El medio Mus2-agar-SS puede constituir un sustituto del medio Agar Marino (AM), aislándose las bacterias en iguales números sin problema de colonias extendidas. Algunos medios derivados del AM con caldo de hepatopáncreas se mostraron más selectivos en términos cuantitativos y también cualitativos, ya que la proporción de bacterias que pueden

crecer fue variable en función de la cepa bacteriana.

En lo concerniente al medio TCBS y su derivados, todos ellos fuertemente selectivos, los aislamientos fueron cuantitativamente similares pero cualitativamente diferentes debido a que la proporción de colonias aisladas sobre los diferentes medios cambió en función de las cepas bacterianas.

Este trabajo abre el camino al desarrollo de una gama de medios especialmente diseñados para el aislamiento de algunos tipos determinados de bacterias, en particular patogénicas, utilizando extractos ya sea de tejidos específicamente destruidos y utilizados por las bacterias, o la hemolinfa que contiene las moléculas normalmente involucradas para destruir a las bacterias septicémicas.



BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MARITIMA

## INTRODUCCION

Las condiciones bajo las que se desarrolla la industria camaronera en el Ecuador han favorecido al elevado crecimiento del índice de enfermedades que afectan a los camarones, siendo los principales agentes causales de éstas los virus y las bacterias, así como los hongos y protozoarios.

Entre este grupo de patógenos, las bacterias representan un gran problema en los sistemas de producción siendo favorecida su proliferación debido a las altas densidades de siembra, suministro de alimento y al uso indebido de antibióticos que permiten la sobrevivencia de cepas bacterianas altamente resistentes a éstos. Entre las bacterias asociadas al cultivo de camarón existen especies de tipo patógenas, inocuas y probióticas. Este último tipo comprende a bacterias capaces de prevenir infecciones ocasionadas por bacterias patógenas probablemente mediante un proceso de competición por la colonización del tracto digestivo (San Miguel, 1996).

La incidencia, ya sea positiva o negativa, de las bacterias en los sistemas de producción de camarón obliga a enfocar los estudios en su aislamiento, caracterización y detección, así como su uso en el caso de las bacterias probióticas y su prevención en el caso de bacterias patógenas. Para este objetivo se vuelve esencial disponer de medios de cultivo que permitan un mejor aislamiento de bacterias en términos cuali y cuantitativo.

Hasta ahora, los medios de cultivo de bacterias comúnmente utilizados por el sector camaronero han sido de hecho desarrollados para bacteriología humana en la detección de bacterias en el agua o productos de consumo humano (TCBS y Agar Marino). Esto induce a pensar que estos medios de cultivo, tradicionalmente utilizados en análisis bacteriológicos de camarones, son más adecuados para el aislamiento de ciertos tipos de bacterias de importancia médica que para las bacterias asociadas al camarón, en particular cuando se trata de bacterias



altamente específicas de sus huéspedes.

El propósito del presente estudio fue desarrollar medios de cultivo más adecuados para el aislamiento de bacterias asociadas al camarón, lo que condujo a analizar enriquecimientos en base a caldos de músculo y hepatopáncreas de camarón *Penaeus vannamei* que podrían favorecer el crecimiento de estas bacterias, tanto del punto de vista cuantitativo como cualitativo. Este estudio fue realizado utilizando diferentes cepas de bacterias aisladas de camarones *P. vannamei* y comparando el número y morfología de las colonias aisladas.

Ulteriormente los medios enriquecidos determinados como los más eficientes fueron evaluados clínicamente con diferentes muestras.



BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MARITIMA



BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MARITIMO

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. ENFERMEDADES BACTERIANAS ASOCIADAS AL CULTIVO DE CAMARON

Desde que la industria camaronera se desarrolló en el país han surgido y se han multiplicado varios problemas asociados a agentes patógenos, afectando en gran medida a este sector. Los virus, bacterias, hongos y protozoarios han encontrado un medio favorable en los sistemas de cultivo principalmente debido al inadecuado manejo de los sistemas de producción y a la falta de una estrategia de control de patógenos.

Entre todos estos agentes patógenos, las enfermedades debidas a infecciones bacterianas han afectado los sistemas de producción de camarón en sus diferentes estadios, presentándose en tres formas generales: erosiones en la cutícula, lesiones localizadas dentro del cuerpo (en especial al nivel del tracto digestivo) y septicemias generalizadas (Lightner, 1985).

Además de los signos anatomorfológicos, los animales presentan diversos tipos de comportamiento tales como letargia, debilidad, conducta hiperactiva, desorientación al nado, reclinación sobre el lado dorsal, ventral o lateral, flexión dorsal de la cola o una posición baja de la cabeza, movimiento lento y continuo de pleópodos y periópodos. La muerte ocasionada por la deshidratación de tipo diarreico o por septicemia en condiciones de producción o de infección experimental puede ser rápida, en particular si se presenta en los primeros estadios larvarios. (Siavichay, 1997).

En estudios realizados por Neder (1989) en postlarvas de camarón se determinó la presencia de bacterias de diferentes grupos tales como *Vibrios spp*, *Pseudomonas spp*, *Aeromonas spp*. y un número menor de *Flavobacterium spp*, *Cytophaga spp*, *Acinetobacter spp.*, *Cromobacterium spp*, y *Micrococos spp*. Considerando la problemática en sistemas de cultivo éstas parecen estar más relacionadas con la presencia de vibrios y pseudomonas.

Otras bacterias que pueden ocasionar problemas en los sistemas de cultivo son las bacterias filamentosas y formadoras de cadenas como *Thithrix spp.*, *Flexibacter spp.*, *Citofaga spp.* y *Flavobacterium spp.*, las cuales colonizan la cutícula y branquias, causando la obstrucción de estas últimas y compitiendo por el oxígeno con el camarón. *Leucotrrix mucor* es una de las bacterias filamentosas más representativas en crustáceos marinos (Lighthner, 1988). Las rickettsias y clamidias son bacterias intracelulares que han sido encontradas tanto en camarones silvestres como de cultivo. Se han reportado infecciones que se consideran causadas por rickettsias en *P. monodon* cultivados en Indonesia y Malasia y en *P. vannamei* cultivados en Texas (Lightner, 1992), siendo las infecciones localizadas en las células del hepatopáncreas.

Entre toda esta diversidad de especies de bacterias que están implicadas como agentes causales de enfermedades en camarones peneidos, las más frecuentes y drásticas en los sistemas de cultivo son las especies de vibrios .

Los miembros del género *Vibrio* son bacilos rectos o curvos Gram-negativos de 0.5-0.8  $\mu\text{m}$  de ancho y 1.4-2.6  $\mu\text{m}$  de longitud. Comúnmente son mótils gracias a uno o más flagelos polares que se encuentran encerrados en una envoltura. No acidifican el medio rápidamente ni forman endoesporas o microcistos. Son anaerobios facultativos y su metabolismo puede ser tanto respiratorio (utilizando oxígeno), como fermentativo. No desnitrifican o fijan nitrógeno molecular. Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 18-37 °C y su pH entre 6.0 y 9.0. Los iones de sodio estimulan el crecimiento de todas las especies, la concentración mínima necesaria de estos iones para un crecimiento óptimo va de 5 a 700 mM. Todas las especies de *Vibrio* fermentan la glucosa y generalmente son oxidasa y catalasa positivas, excepto *Vibrio metschnikovii* (Holt *et al*, 1994).

Algunos vibrios conocidos por causar enfermedades de camarones en diferentes partes del mundo son: *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. damsella*, *V. splendidus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. anguillarum* (Lightner, 1992), *V. penaeicida*, *V. aestuarinus*, *V. pelagicus*, *V. campbelli*, *V. fisherii*, *V. nereis*, *V. tubiashi* (Austin, 1993).

La incidencia de vibrios en los sistemas de cultivo puede ser influenciada por la sobrepoblación, bajas concentraciones de oxígeno disuelto, altas temperaturas del agua y bajos recambios (Solis, 1996).

En nuestro país también se han reportado epidemias causadas por vibrios, como por ejemplo el síndrome de "Gaviotas" y el de "Bolitas".

El síndrome de "Gaviotas" apareció entre Noviembre y Diciembre de 1989 en camaronas aledañas al Estero Salado, la población de las piscinas colapsaba en su totalidad en el transcurso de unos pocos días o una semana. Estudios en los camarones moribundos demostraron que estaban afectados por una septicemia extendida relacionada probablemente con *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* (Monhey, L.L., et al., 1994).

El síndrome de "Bolitas", que fue reportado a finales de 1987, se presenta en los camarones en sus estadios larvales. Su característica principal es una descamación de las células del hepatopáncreas e intestino dando la impresión de tener unas "bolitas" en su interior. Además las larvas presentan luminiscencia en la oscuridad (San Miguel, 1996 y Serrano, 1996). Se reportó como el agente causal a la cepa E22 identificada bioquímicamente como *V. harveyi* (Arauz, com pers).



## 1.2. CRECIMIENTO Y METABOLISMO BACTERIANO

Las bacterias son organismos procarióticos que se multiplican por un proceso llamado fisión binaria. Estos organismos microscópicos no son investigados comúnmente como individuos, sino como una población total y bajo condiciones artificiales para efectos prácticos. Cuando una bacteria es cultivada en un medio artificial los nutrientes existentes van decreciendo mientras que los residuos van aumentando si es que no existe una renovación. El crecimiento de las bacterias puede ser representado como el logaritmo del número de células versus el tiempo de incubación. Este crecimiento se representa con una curva de cuatro fases: latencia, exponencial, estacionaria y decreciente (Prescott, *et al* 1993).

Durante la fase letárgica, las bacterias recién inoculadas en un medio nuevo no empiezan su reproducción inmediatamente, ya que primero necesitan sintetizar compuestos como el ATP, cofactores y ribosomas que le permitan funcionar. Además las bacterias pueden haber sufrido un estrés y deben adaptarse al nuevo entorno, por lo cual necesitan tiempo para recuperarse. El tiempo de duración de esta fase varía dependiendo de la condición de la bacteria y la naturaleza del medio. Cambios significativos en las composiciones de los medios también pueden producir fases letárgicas largas.

La fase exponencial (logarítmica) tiene lugar cuando las bacterias han superado su período de aclimatación y preparación, en esta fase las bacterias crecen y se dividen tan rápido como su potencial genético, la naturaleza y las condiciones del medio se los permiten. La tasa de crecimiento es constante durante esta fase y los individuos se dividen y duplican su número en intervalos regulares. Durante esta fase la población es muy uniforme en lo que respecta a propiedades químicas y fisiológicas.

Durante la fase estacionaria el crecimiento de la población se detiene y la curva se vuelve horizontal. Durante esta fase el número total de bacterias permanece constante como

resultado de un balance entre las células que se dividen y las que mueren. El inicio de la fase estacionaria se debe a la limitación de nutrientes, limitación del oxígeno (en el caso de bacterias aeróbicas) y acumulación de residuos tóxicos (ej. acidificación del medio).

La última fase es la de decrecimiento, esta empieza con la declinación de la población bacteriana debido a la falta de nutrientes y exceso de productos tóxicos. Este decrecimiento, al igual que la fase exponencial, es logarítmico (es decir, proporciones constantes de células mueren cada cierto período de tiempo) (Prescott *et al* 1993).

El crecimiento bacteriano puede ser representado como una curva, que se puede observar en la figura 1:

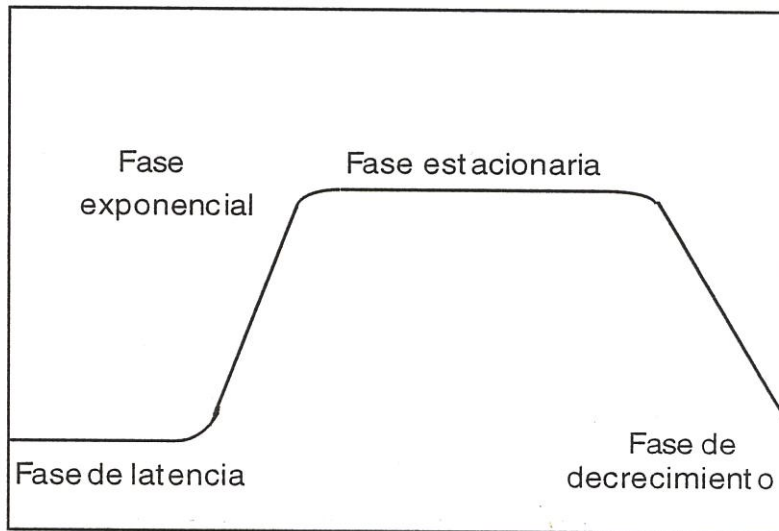


FIGURA No. 1.- Curva de crecimiento bacteriano.

Este crecimiento está íntimamente relacionado con los parámetros físicos y químicos del medio que los rodea, tales como:

#### a) Presión osmótica.-

La presión osmótica es la presión hidrostática requerida para detener el flujo de agua a través de una membrana que separa soluciones de diferentes composiciones (Lodish *et al*, 1995). Así, cuando existen diferentes soluciones separadas por una membrana permeable o semipermeable se produce el flujo de agua de la solución de mayor concentración a la de menor concentración hasta alcanzar un punto de equilibrio. Esta difusión de agua a través de la membrana plasmática semipermeable y selectiva de las células es conocida como ósmosis.

Si la concentración de sales dentro de la célula es mayor que la del exterior de la célula, el agua tenderá a ingresar a la célula a través de la membrana plasmática y diluirá la solución interna de la célula. El influjo de agua llevará a la célula a hincharse, esta fuerza hacia el exterior ocasionada por el agua que ingresó es llamada presión osmótica (Hopson & Wessells, 1990).

Generalmente las bacterias viven en medios hipotónicos, es decir de menor concentración de sales que el interior de la célula, la función de la pared celular es la de mantener la forma e integridad de la célula y evitar su hinchamiento y posible explosión, al contrario, cuando una bacteria es introducida en un medio hipertónico, el agua tiende a salir de la célula y la membrana plasmática se retrae, separándose de la pared. Este proceso se llama plasmólisis. En este proceso la célula se deshidrata, produciéndose daños en la membrana plasmática. Para mantener la concentración osmótica de su protoplasma superior a la del hábitat algunas bacterias utilizan ciertos solutos compatibles para que la membrana plasmática permanezca siempre presionada firmemente sobre la pared celular. Estos solutos compatibles son llamados así porque son compatibles con el metabolismo y crecimiento inclusive a altas concentraciones intracelulares.

Ciertas bacterias pueden resistir altas concentraciones de salinidad, siendo conocidas como halófilas habiéndose adaptado completamente a condiciones salinas que requieren altos niveles de cloruro de sodio para crecer.(Prescott *et al* 1993).

#### b)pH.-

El pH es el valor logarítmico de la concentración de iones de hidrógeno que están presentes en una solución. El pH afecta directamente al crecimiento de las bacterias ya que cada especie tiene un rango definido y un óptimo para su crecimiento. De acuerdo al pH óptimo en el cual se desarrollan, se puede clasificar a las bacterias como: acidófilas las cuales tienen su crecimiento óptimo entre 1-5.5, neutrófilas con un rango entre 5.5-8 y las alcalófilas que crecen entre 8.5-11.5.

Independientemente del pH del medio, la mayoría de las bacterias tienen un pH interno cercano a la neutralidad. Esto es debido a la impermeabilidad de la membrana plasmática a los protones. Variaciones drásticas en los niveles de pH pueden dañar a las bacterias rompiendo la membrana plasmática o inhibiendo la actividad de enzimas y el transporte de proteínas a través de la membrana, también se puede alterar la ionización de las moléculas de nutrientes disminuyendo así su disposición para las bacterias. Frecuentemente el pH del medio es cambiado por los desechos metabólicos de las bacterias, por esta razón se suele adicionar a los medios de cultivo sustancias que mantengan el pH estable (Prescott, *et al* 1993).

#### c)Temperatura.-

El metabolismo bacteriano es afectado directamente por la temperatura, principalmente se ven afectadas las reacciones catalizadas por enzimas. Incrementos drásticos en la temperatura llevan finalmente al colapso de las células debido a la desnaturalización de las proteínas.





Como en cualquier reacción química, un incremento en la temperatura aumentará la velocidad con la que ésta se lleva a cabo hasta llegar a una temperatura límite en la cual estas actividades decrecen en velocidad e inclusive cesan.

Las bacterias tienen rangos óptimos de temperatura en los cuales crecen mejor y dependiendo de esto se las puede clasificar en cuatro grupos. Las psicrófilas, que crecen entre los 0-15°C. Las psicrófilas facultativas pueden crecer a 0°C, pero su crecimiento óptimo es entre 20 a 30°C. Las mesófilas son bacterias que crecen entre un rango óptimo de 20 a 45°C y las termófilas son aquellas que pueden crecer a temperaturas de 55°C hasta inclusive 100°C (Prescott *et al* 1993).

#### d) Oxígeno.-

El oxígeno puede favorecer o inhibir el crecimiento bacteriano dependiendo del tipo de bacteria ya que afecta directamente a su metabolismo. Las bacterias pueden agruparse en anaerobias, aerobias, aerobias facultativas, anaerobias aerotolerantes y microaerófilas.

Las bacterias que pueden crecer en ausencia de oxígeno atmosférico son llamadas anaeróbicas, mientras que las que dependen del oxígeno atmosférico para crecer son llamadas aeróbicas. La mayoría de las bacterias dependen del oxígeno atmosférico para su crecimiento y son conocidas como estrictamente aeróbicas. Las aeróbicas facultativas pueden crecer sin la presencia del oxígeno, pero crecen mejor en su presencia. Las anaeróbicas aerotolerantes crecen de igual manera en la presencia de oxígeno o en su ausencia. Por su lado, los organismos estrictamente anaerobios no toleran la presencia de oxígeno muriendo si son expuestos a éste. Los organismos aerotolerantes y los estrictamente anaerobios, no generan energía a través de la respiración y deben recurrir a métodos como la fermentación. Finalmente, los organismos microaerófilos, no soportan niveles de oxígeno atmosféricos (20%) y requieren de concentraciones menores (2-10%) para vivir (Prescott *et al* 1993).

### e) Nutrientes.-

Los microorganismos se encuentran compuestos principalmente por elementos como el carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, azufre, fósforo, potasio, calcio, hierro y magnesio. Estos son los llamados macroelementos o macronutrientes porque son requeridos por los microorganismos en cantidades relativamente grandes y representan el 95% del peso seco de éstos. El carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre y fósforo son los componentes principales de los carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Los cuatro macroelementos restantes cumplen diversas funciones dentro de la célula. Por ejemplo, el potasio es utilizado para la actividad de diversas enzimas, el calcio contribuye a la resistencia de las endoesporas bacterianas, el magnesio sirve como cofactor para varias enzimas, estabiliza los ribosomas, y la membrana celular, el hierro es cofactor de enzimas y proteínas transportadoras de electrones (Prescott *et al* 1993).

Así mismo los microorganismos requieren de varios elementos traza (llamados también microelementos o micronutrientes). Entre estos elementos traza se encuentran el manganeso, el cobalto, el zinc, el níquel, el molibdeno y el cobre, que son utilizados como parte de enzimas y cofactores y ayudan en la catalisis de reacciones y mantenimiento de la estructura celular (Prescott *et al* , 1993).

Dependiendo de su requerimiento nutricional de carbono, se clasifica a los organismos vivos en dos grupos, autótrofos y heterótrofos.

Los autótrofos son seres vivientes que utilizan el carbono inorgánico, usualmente en forma de dióxido de carbono, como única fuente de carbono. A los autótrofos se los pueden dividir en dos sub-grupos, fotosintéticos y quimiosintéticos.

Los organismos fotosintéticos son capaces de utilizar la energía luminosa para asimilar y convertir las ligaduras oxígeno-carbono de baja energía del dióxido de carbono a ligaduras carbono-hidrógeno de alta energía e intermediarios por medio del proceso llamado fotosíntesis.

Los organismos quimiosintéticos también utilizan el dióxido de carbono para su metabolismo, pero su fuente de energía proviene de la oxidación biológica de substratos inorgánicos, especialmente por parte del oxígeno molecular. Los organismos quimiosintéticos oxidan substratos inorgánicos (como amonio, nitratos, ácido sulfhídrico y oxígeno molecular) para obtener energía.

Los heterótrofos son aquellos organismos que utilizan el carbono de los compuestos orgánicos (carbohidratos, grasas y aminoácidos), para poder efectuar su normal crecimiento y desarrollo.

El nitrógeno es necesario para la síntesis de aminoácidos, carbohidratos, lípidos, cofactores enzimáticos y otras sustancias. Algunos microorganismos pueden obtener el nitrógeno directamente de los aminoácidos, la mayor parte de los fotótrofos y varios microorganismos no-fotosintéticos reducen el nitrato a amonio e incorporan el amonio en una reducción asimilatoria del nitrato. Otras bacterias pueden reducir y asimilar el nitrógeno atmosférico utilizando una enzima llamada nitrogenasa

El fósforo está presente en los ácidos nucleicos, fosfolípidos, nucleótidos como el ATP, varios cofactores, proteínas y varios componentes celulares. La mayor parte de los microorganismos utilizan fosfato inorgánico como fuente de fósforo y lo incorporan directamente.



El azufre es necesario para la síntesis de sustancias como aminoácidos (cisteína y metionina), carbohidratos y tiamina. La mayor parte de los microorganismos utilizan el sulfato como fuente de azufre y posteriormente lo reducen por medio de la reducción asimilatoria del sulfato. En este proceso el sulfato es reducido en primer lugar a sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) y de ahí a sulfuro de hidrógeno ( $\text{SH}_2$ ), a partir de este compuesto la cisteína puede ser ya sintetizada (Prescott *et al*, 1993).

Existen compuestos orgánicos requeridos que son componentes esenciales de las células o precursores que sin embargo por diversos motivos no pueden ser sintetizados por los organismos, estos compuestos son llamados factores de crecimiento. Existen tres clases principales de factores de crecimiento: aminoácidos, bases nitrogenadas (purinas y pirimidinas) y vitaminas. Los aminoácidos son necesarios para la síntesis de proteínas, las purinas y las pirimidinas para la síntesis de los ácidos nucleicos, mientras que las vitaminas actúan como cofactores enzimáticos (Prescott *et al*, 1993).

### 1.3. MEDIOS DE CULTIVO

Las bacterias necesitan de fuentes de energía, carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, oxígeno y varios minerales para mantener su metabolismo normal. La composición exacta para obtener un medio satisfactorio va a depender de las necesidades de la especie a cultivar ya que los requerimientos nutricionales pueden variar en gran medida (Prescott *et al*, 1993). El medio de cultivo no es tan solo una fuente de nutrientes y energía para el microorganismo que se desea cultivar, sino que también representa el medio para su crecimiento. El transporte de minerales desde el medio hacia la célula depende de factores como el grado de disociación iónica, pH, aireación, potencial de óxido-reducción, presión osmótica y otros que son importantes para el crecimiento de las bacterias (Rodina, 1972).

Es importante el conocimiento del habitat natural del microorganismo a cultivar para seleccionar un medio adecuado que contenga todos los nutrientes que este necesita. Frecuentemente un medio es utilizado para aislar selectivamente organismos específicos (medios de aislamiento) o para identificar especies en base a características bioquímicas (medios de identificación). En estos casos la función del medio viene determinada por su composición (Prescott *et al*, 1993).

En general los medios de cultivo dependiendo de su consistencia se los agrupa como sólidos o líquidos. Los medios de cultivo pueden ser además de una composición química simple y definida o pueden contener ingredientes complejos como extractos digeridos de tejidos de plantas o animales (Difco, 1984), finalmente de acuerdo a la utilidad del medio de cultivo se los puede clasificar como generales, selectivos y diferenciales.

Para los organismos autótrofos la composición química del medio puede ser simple, esto es que todos sus componentes son conocidos. Por el contrario los organismos heterótrofos son cultivados en medios complejos que contienen compuestos de los cuales no conocemos su composición química exacta, como peptonas o extractos de carne o levadura. Muchos organismos heterótrofos no pueden sintetizar por su propia cuenta algunos elementos de su protoplasma. Estos compuestos son las vitaminas, aminoácidos y nucleótidos. Debido a ello generalmente se suministra a los medios lisados celulares de levaduras, extractos de diversas índoles y suplementos vitamínicos (Rodina, 1972). Estas mezclas complejas de nutrientes suministran a los microorganismos heterótrofos exigentes de vitaminas y otras sustancias promotoras del crecimiento (Difco, 1984).

Además de una adecuada fórmula de nutrientes, los medios de cultivo líquidos o sólidos deben permitir la recuperación fácil de las bacterias. Los medios líquidos generalmente son utilizados para preparar inóculos de bacterias puras o para enriquecer bacterias antes de ser



sembradas en los medios sólidos. En algunos casos la viscosidad de los medios líquidos van a influenciar la actividad bacteriana como es el caso de la velocidad de nado de *Vibrio alginolyticus* (Tatsuo et al, 1996). Los medios de cultivo sólidos deben su consistencia generalmente a una sustancia conocida como agar. El agar es un polímero sulfatado que está compuesto principalmente de D-galactosa, 3,6-anhydro-L-galactosa y ácido D-glucurónico que es extraído de las algas rojas. El agar es utilizado como agente solidificante debido a la propiedad de disolverse en agua hirviendo además de poder ser llevado hasta 40-42°C antes de solidificarse y no se disolverá nuevamente hasta que se aumente su temperatura hasta 80 o 90°C. El agar es también apropiado para el cultivo de microorganismos ya que éstos no pueden degradarlos. Otros agentes solidificantes también pueden ser utilizados tal es el caso de la sílica gel (Prescott et al, 1993).

Los medios de cultivo generales son medios no selectivos que aíslan una gran variedad de microorganismos exigentes, incluidos *Actinomyces*, *Brucella*, *Clostridium*, *Enterobacteriaceae*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*. Comúnmente éstos son enriquecidos con otras sustancias como sangre, hemoglobina, suero o extractos de vegetales o tejidos animales (Difco, 1984; Rodina, 1984).

Los medios selectivos favorecen el crecimiento de microorganismos particulares, como es el caso de las sales biliares y tintes como la fusina básica y el cristal violeta que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas y permiten el crecimiento de bacterias Gram-negativas. También se pueden seleccionar bacterias mediante el uso de nutrientes que éstas utilicen específicamente como por ejemplo un medio que contenga tan solo celulosa como fuente de carbono y energía que aislará bacterias consumidoras de celulosa.

Los medios diferenciales son medios que distinguen entre diferentes grupos de bacterias y además permiten una identificación tentativa de los microorganismos basados en sus características biológicas. Estos medios diferenciales poseen en su fórmula componentes que han sido definidos considerando las características metabólicas de la bacteria que se desea aislar en particular, como en el caso de los medios diferenciales para *Vibrio proteolyticus* y *Vibrio harveyi* (Muniensa-Pérez *et al*, 1996; Lachlan *et al*, 1996).

En lo que concierne a los medios utilizados en el cultivo de camarón para aislar bacterias está basada en el uso de medios selectivos o enriquecidos, los cuales satisfacen las demandas fisiológicas más o menos específicas de un grupo de microorganismos. Entre los medios utilizados están el TCBS (Thiosulfate, Citrate, Bile Salts and Sucrose Agar), TSA (Tryptic Soy Agar) y el Agar Marino.

#### 1.3.1. Agar Marino

El Agar Marino es un medio recomendado para cultivar bacterias marinas heterótrofas. Este agar, preparado de acuerdo a la fórmula de ZoBell contiene minerales que se asemejan en gran manera a la composición mineral del agua de mar, peptonas y extracto de levadura los cuales son una fuente de nutrientes para bacterias marinas en general.

Este agar fue desarrollado debido al interés en la conservación de la vida marina y la importancia en la industria alimenticia de los recursos marinos (Difco, 1984)

#### 1.3.2. Agar TCBS

El agar TCBS (thiosulfate-citrate-bile-sucrose agar) es utilizado en el aislamiento selectivo y cultivo de *Vibrio cholerae* y otros vibrios enteropatógenos. El agar TCBS es preparado de acuerdo a la fórmula de Kobayashi, Enomoto, Sakasaki y Kuwabara. Fishbein, Mehlman y Pitcher reportaron que *Vibrio parahaemolyticus* crece también en este medio como colonias

azuladas y claras. Este medio permite también el crecimiento de varios vibrios, aunque West Ressek, Brayton y Colwell reportaron aislamientos deficientes de *Vibrios tubiashii* y *V. Vulnificus* ( en Difco, 1984). Otras bacterias entéricas como coliformes y *Proteus* que generalmente contaminan materiales fecales son inhibidos en este medio. Algunas cepas de *Proteus* y enterococos pueden crecer, pero en colonias sin color y pequeñas fácilmente distinguibles (Difco, 1984).

La especificidad del agar TCBS para los vibrios radica en la selección hacia las bacterias Gram-negativas que proporcionan las sales biliares y el elevado pH (8,6) al cual los vibrios están adaptados.

### 1.3.3. Agares complejos indefinidos (agares enriquecidos)

Existen ciertas bacterias heterotróficas que son muy exigentes que no crecen en los medios de cultivo definidos. Por esta razón se tiende a utilizar medios complejos indefinidos conocidos también como agares enriquecidos

Los medios complejos indefinidos son aquellos que en su formulación poseen algún ingrediente de composición química desconocida. Estos medios son utilizados también cuando no se conocen los requerimientos nutricionales de alguna bacteria en particular que ha sido reacia a crecer en medios definidos (Prescot et al, 1993).

Para la preparación de agares complejos indefinidos comúnmente se utiliza sangre, suero, peptonas, extractos de carne, levadura, zanahoria, papa y albúmina de huevo debido a su alto contenido de nutrientes (Rodina, 1972).

Entre todos estos componentes mencionados, las peptonas y los extractos de carne y levadura son encontradas en un gran número de medios de cultivo. Las peptonas son proteínas hidrolisadas preparadas por la digestión proteolítica parcial de carne, caseína, soya.



BIBLIOTECA  
IAC, INC.  
MARITIMA



gelatina y otras fuentes de proteína y sirven como fuente de carbono, energía y nitrógeno. Los extractos de carne y levadura son extractos acuosos que contienen aminoácidos, nucleótidos, ácidos orgánicos, vitaminas y minerales y son una fuente excelente de vitamina B así como de nitrógeno y compuestos de carbono.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

#### 2.1.1. Animales

Para la preparación de los caldos de músculo y hepatopáncreas se utilizaron camarones *Penaeus vannamei* de 40 gramos de peso aproximadamente. Estos fueron capturados entre la zona de Ayangue y San Pedro por pescadores de dichas comunidades y permanecieron en los tanques de maduración del CENAIM.

#### 2.1.2. Cepas bacterianas

Se utilizaron diez cepas bacterianas para determinar la eficiencia de recuperación de UFC de los medios de cultivo bacteriano elaborados. Estas cepas estuvieron conservadas a -80°C en TSB (triptycase soy broth) con 15% (v/v) de glicerol. Las cepas utilizadas fueron:

Ili (*Vibrio alginolyticus*)

S<sub>2</sub> (*Vibrio vulnificus*)

B1158-2 (*Pseudomonas sp.*)

B1163-1 (*Vibrio tubiashii*)

SZ22 (*Vibrio damsella*)

Q7 (No identificada)

Q13 (No identificada)

Q16 (No identificada)

Q34 (No identificada)

Qaβ (No identificada)

La cepa Ili aislada en 1994, de una muestra de agua de mar tomada en el laboratorio de larvas de camarón EBISA fue identificada por Iliana Morales como *Vibrio alginolyticus*. Se demostró por medio de infecciones experimentales que esta cepa poseía características probióticas en los primeros estadios de camarones *P. vannamei* (San Miguel, 1996) (Serrano, 1996).

La cepa S2 fue aislada por Iliana Morales e identificada por medio de pruebas bioquímicas en el CENAIM. Por medio de infecciones experimentales se demostró su relación con el síndrome de "bolitas".

Las cepas B1158-2 y B1163-1 que corresponden a *Pseudomonas sp.* y *V. tubiashii* respectivamente, fueron obtenidas de camarones de la camaronera Fafra, ubicada en la zona de Taura, provincia del Guayas. Estas cepas fueron identificadas utilizando pruebas bioquímicas en el CENAIM.

La cepa SZ22 que corresponde a *V. damsella* fue aislada de larvas de *P. vannamei* provenientes del Laboratorio de larvas cercano a San Pablo, e identificada por medio de pruebas bioquímicas en el CENAIM.

Las cepas Q7, Q13, Q16, Q34 y Qaß fueron aisladas en 1997 de larvas de camarón enfermas con síntomas atribuidos al "Síndrome de Zoea" por Walter Intriago.



BIBLIOTECA  
FAC. INC.  
MARÍTIMA

## 2.2. METODOLOGIA

### 2.2.1. Técnicas de bacteriología

#### 2.2.1.1. Preparación de los caldos

##### 2.2.1.1.1. Método de centrifugado y filtrado por membrana (Método 1):

Se extrajeron el hepatopáncreas y el músculo abdominal del camarón, teniendo cuidado de eliminar tanto el cordón nervioso como el intestino. Se seccionó el tejido y luego se colocaron 10 gr. de éste en 100 ml. de agua destilada (Advantec, Aquarius GS-20R) y se dejó hervir por una hora en una hornilla eléctrica (Sibata Scientific Technology Ltd., modelo 2) teniendo la precaución de recuperar el agua destilada que se evaporaba. Se dejó enfriar el caldo para posteriormente centrifugarlo (Kokusan, H-2000A) a 12.000 rpm. por una hora. Se rescató el sobrenadante y mediante una bomba de vacío, posteriormente se filtró el caldo por una membrana millipore tipo HA de 0,45  $\mu\text{m}$ .

##### 2.2.1.1.2. Método de licuado y filtrado por gasa (Método 2):

Se extrajeron el hepatopáncreas y el músculo abdominal del camarón, teniendo cuidado de eliminar tanto el cordón nervioso y el intestino. Se seccionó el tejido y se colocaron 10 gr. de éste en 100 mL de agua destilada (Advantec, Aquarius GS-20R), a continuación se licuó (Janke & Kunkel Ika®-Labortechnik, Ultra-Turrax T25) hasta que no se presentaran partículas grandes. Posteriormente se llevó hasta ebullición el caldo para aglomerar los residuos de tejido y para eliminarlos se dejó enfriar y se filtró por gasa estéril.

#### 2.2.1.2. Preparación de medios de cultivo

Thiosulfate Citrate Bile Salt, TCBS (Bacto® , DIFCO Laboratories): Se disolvieron 89 g. del agar en un litro de agua destilada y se adicionó un 1% (p/v) más de NaCl (Wako Pure

Chemical Industries, Ltd.). Posteriormente se llevó a ebullición hasta que el medio esté completamente disuelto.

Agar Marino : Se disolvieron 55,1 g. en un litro de agua destilada y se adicionó 0,5% Bacto-Agar (Bacto<sup>®</sup>, DIFCO Laboratories) en relación peso sobre volumen para dar mayor rigidez al medio. Posteriormente se llevó al autoclave (Sibata Scientific Technology Ltd. modelo DS-300) por 15 minutos a 121 °C y 15 libras de presión.

#### 2.2.1.3. Preparación de los medios enriquecidos con caldo de músculo y hepatopáncreas

Se prepararon medios enriquecidos de TCBS y Agar Marino con concentraciones de 25, 50, 75 y 100 por ciento del caldo de los tejidos en relación volumen sobre volumen. Además se preparó un control que contenía cien por ciento de caldo del tejido más 2% de Bacto-Agar (Bacto<sup>®</sup>, DIFCO Laboratories) en relación volumen-volumen. Todos los medios elaborados fueron autoclavados por 15 minutos a 15 libras de presión salvo los que contenían TCBS, que fueron llevados a ebullición.

Los agares enriquecidos con caldo de músculo tienden a formar un coágulo (compuesto por residuos celulares) en el medio después de ser esterilizados en el autoclave, por lo cual se debe evitar la formación de este coágulo.

#### 2.2.1.4. Siembra y cuantificación del crecimiento bacteriano

Se descongelaron las cepas bacterianas y se las sembró directamente en Agar Marino. Al cabo de ocho horas de incubación a 28 °C se tomaron las bacterias y se las colocaron en frascos con solución salina al 0,85%. Posteriormente se realizó la lectura al espectrofotómetro (Shimadzu UV-2100), a 550 nm de longitud de onda para determinar el número de bacterias presentes en la suspensión, considerando que una densidad óptica equivale a 1,2 células por ml. A partir del dato obtenido, se realizaron las diluciones de

manera que se coloquen en cada caja de Petri un número constante de bacterias. Con micropipeta se colocó la suspensión bacteriana sobre los agares y por medio de varillas de vidrio previamente flameadas se esparció sobre la superficie (Figura No. 2). Finalmente se llevó las cajas sembradas a la incubadora a 28°C y después de 12 horas de cultivo se cuantificó el crecimiento en cada una de las cajas de Petri por medio del contador de colonias (SIBATA).

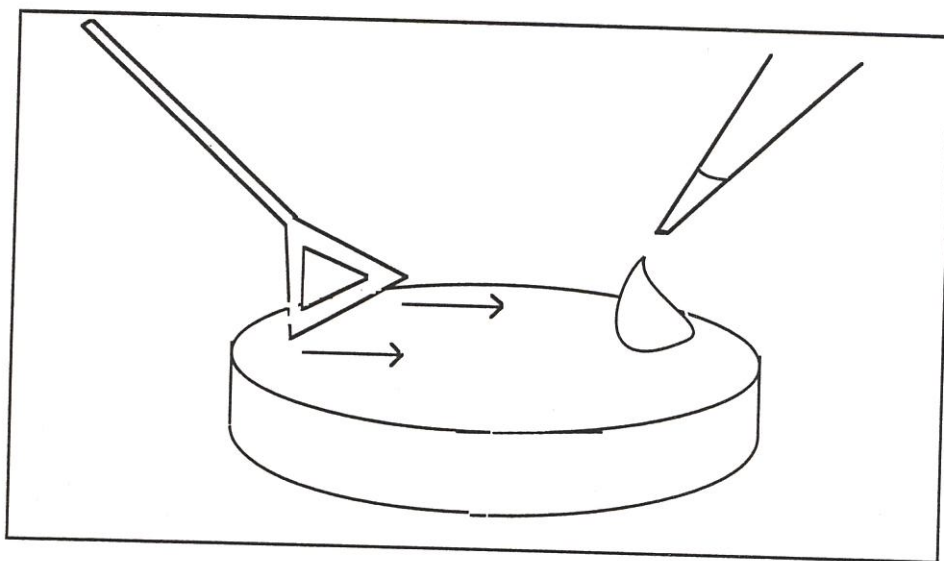


Figura No. 2.- Siembra de las bacterias sobre el agar.



BIBLIOTECA  
TAC. ING.  
MARIQUITA

#### 2.2.1.5. Técnicas de pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas se las realizaron según el protocolo expuesto por Solís en 1996 y para cuya interpretación se utilizó el programa STATISTICA utilizando un análisis cluster empleando la base de datos desarrollada por Solís (1996).

#### 2.2.2. Diseño experimental

Durante el crecimiento de las bacterias, la ubicación de las cajas conteniendo las bacterias en la incubadora fue completamente aleatoria y el orden de siembra de las cepas bacterianas no fue pre-establecido sembrándolas por lotes.

### 2.2.3. Análisis estadístico

Los datos de crecimiento bacteriano fueron analizados por medio de un Análisis de Varianza (ANOVA) con un rango de confianza del 95% y un análisis Scheffe utilizando el programa DataDesk. Se seleccionó el análisis Scheffe dada su rigidez al momento de los calculos, ya que en este trabajo se estaban probando medios nuevos en contraste con los medios tradicionales además de no contar con un gran número de réplicas.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSION**

Por medio de los ensayos que a continuación se detallan, se logró seleccionar medios alternativos más eficientes y, en algunos casos, más económicos que los tradicionalmente utilizados en la bacteriología aplicada al cultivo de camarones *P. vannamei*.

#### **3.1. EVALUACION DE ADITIVOS Y SUSTITUTOS DEL AGAR MARINO.**

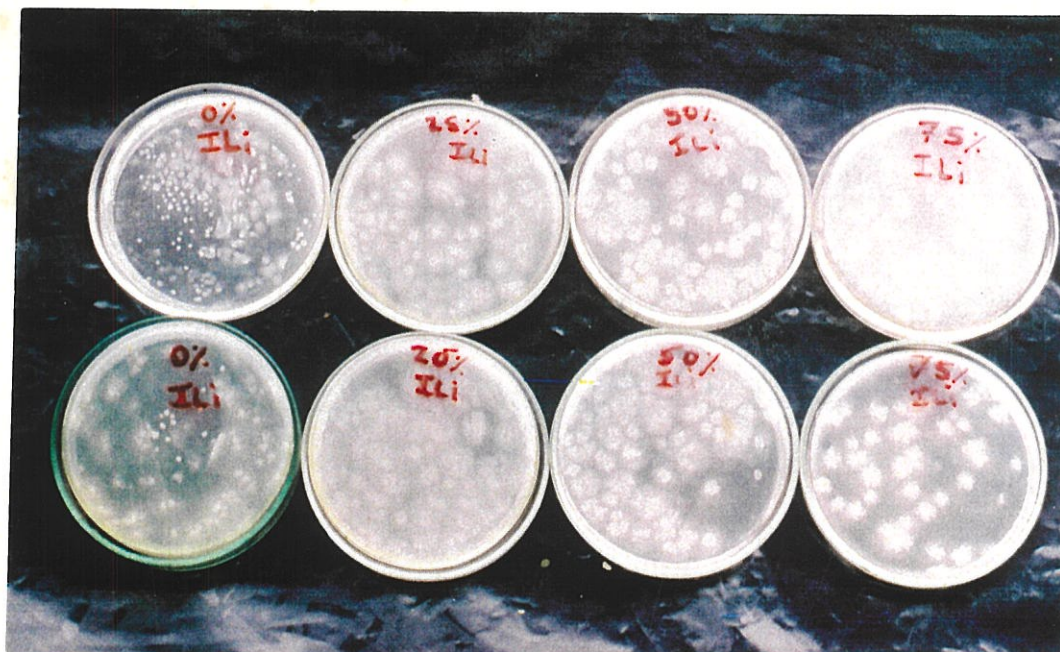
##### **3.1.1. Evaluación del caldo de músculo como aditivo o sustituto del Agar Marino.**

Un primer ensayo tuvo como objetivo analizar el aislamiento de los vibrios *V. alginolyticus* (cepa Ili), *V. vulnificus* (cepa S2) y *V. tubiashii* (cepa B1163-1) sobre el medio Agar Marino (AM) comparativamente con medios derivados enriquecidos con caldo de músculo de camarón *P.vannamei*.

Se sembraron las bacterias en Agar Marino con 25, 50, 75 o 100 % de caldo de músculo, llevándose un control correspondiente a Agar Marino con 0.5% de Bacto Agar. Además se elaboró otro medio constituido de caldo de músculo, 2% de Bacto Agar y 2% de cloruro de sodio (Mus-Agar-NaCl). El caldo de músculo fue preparado por el método 1. Cada tratamiento se realizó por triplicado y en cada caja se sembraron 50 µL de una suspensión diluída 2000 veces correspondiente inicialmente a una D.O.=0,17 a 550 nm.

La cepa de *V.alginolyticus* presentó sobre el Agar Marino un crecimiento tipo "extendido" sin individualización de colonias, mientras que en Mus-Agar-NaCl las colonias se presentaban redondas y convexas. Sobre el Agar Marino con concentraciones bajas de caldo de músculo se podía observar colonias rizoides amplias y colonias rizoides más pequeñas con concentraciones mayores de caldo (Fotos 1 y 2).





BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MARITIMA

Foto No. 1. Morfología de las colonias de *V. alginolyticus* aisladas sobre AM, AM-Mus25%-NaCl, AM-Mus50%-NaCl y AM-Mus75%-NaCl (de izquierda a derecha) con su respectiva réplica.

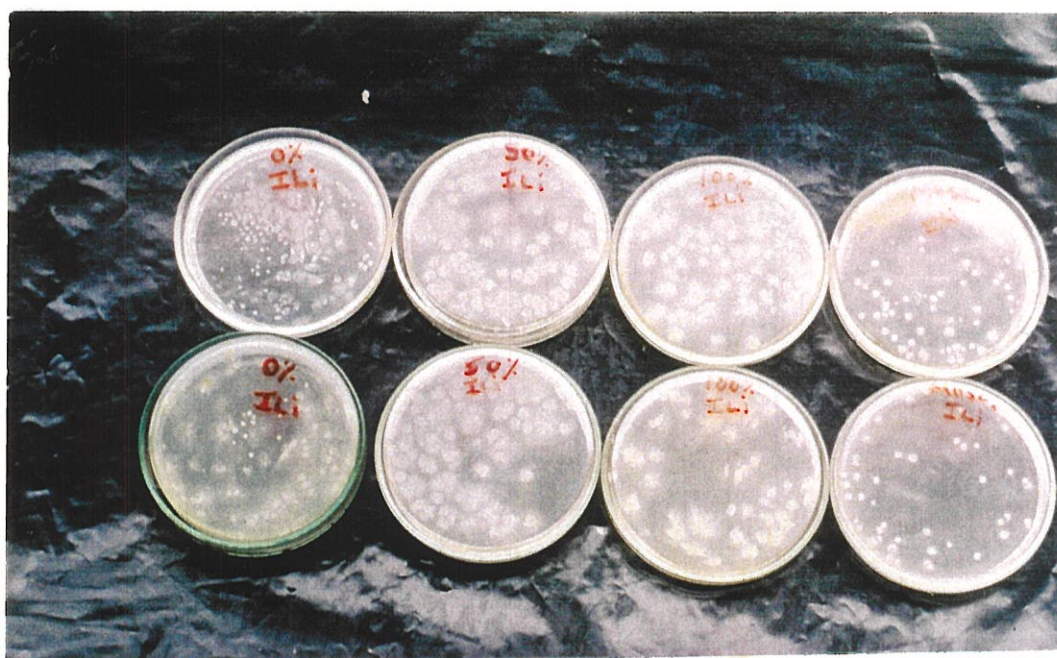


Foto No. 2. Morfología de las colonias de *V. alginolyticus* aisladas sobre AM, AM-Mus50%-NaCl, AM-Mus100%-NaCl y Mus-Agar-NaCl (de izquierda a derecha) con su respectiva réplica.

El cambio de la morfología de las colonias podría ser el resultado de una mayor disponibilidad de factores nutritivos, lo que permitió una multiplicación más focalizada y más individualizada de las colonias bacterianas. Así, el crecimiento de las colonias fue incontable sobre el medio Agar Marino y el medio derivado conteniendo 25 % de caldo, mientras que las colonias fueron fácilmente contadas con los medios derivados conteniendo 50, 75 o 100% de caldo así como con el medio Mus-Agar-NaCl. Por lo tanto, el número de bacterias aisladas fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) con este último medio (Tabla 1)

La cepa S2 de *V.vulnificus* en Agar Marino y concentraciones bajas de caldo de músculo presentó colonias redondas y pequeñas, mientras que en concentraciones más altas de extracto, las colonias se volvían más grandes y opacas. La coloración de las colonias fue siempre de color crema. Estadísticamente no hubieron diferencias significativas entre los aislamientos ( $p > 0,05$ ), ya que se presentaron valores parejos en el número de colonias aisladas (Tabla 1). La presencia de colonias de mayor tamaño en los agares con altas concentraciones de extracto de músculo (75%, 100%, Mus-Agar-NaCl) se puede deber a que la tasa de multiplicación bacteriana aumentó por la disponibilidad de nutrientes asimilables por las bacterias.

El crecimiento de la cepa de *V. tubiashii* tuvo un comportamiento similar al de la cepa S2 de *V.vulnificus*, en términos de morfología de las colonias. En lo que respecta al número de bacterias aisladas no hubieron diferencias significativas entre los medios ( $p > 0,05$ ) (Tabla 1). Las colonias observadas sobre el medio Agar Marino enriquecido con 75% de caldo de músculo se presentaron en número alto considerando la siembra lo cual podría haber correspondido a una contaminación de este medio durante su preparación.

Tabla 1. Morfologías y números de UFC aisladas por ml. de suspensiones de *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *V. tubiashii*. Los medios corresponden respectivamente a: Agar Marino (medio AM); AM enriquecido con caldo de músculo preparado por el método 1 e incorporado a diferentes concentraciones (25%/50%/75%/100%), siendo adicionado NaCl (2%) (medios AM-Mus X%-NaCl); Caldo de músculo preparado por el método 1 con 2% de Bacto Agar y 2% de NaCl (medio Mus-Agar-NaCl).

Medio	<i>V. alginolyticus</i>		<i>V. vulnificus</i>		<i>V. tubiashii</i>	
	morfología	x(S)	morfología	x(S)	morfología	x(S)
AM	extendida tenue	Inc.*	redondas, pequeñas	4633a (±723)	redondas, pequeñas	7753a (±725)
A.M-Mus 25%-NaCl	extendida más tenue	Inc.*	redondas, pequeñas	6420a (±754)	redondas, pequeñas	7353a (±745)
A.M-Mus 50%-NaCl	extendida tenue, con colonias	2106a (±220)	redondas, pequeñas	5580a (±1446)	redondas, medianas	9386a (±1732)
A.M-Mus 75%-NaCl	extendida, tenue colonias	2033a (±50)	redondas, medianas	5726a (±300)	redondas, medianas	-
A.M-Mus 100%NaCl	extendida tenue, colonias	2466a (±271)	redondas, medianas	6913a (±600)	redondas grandes	6830a (±1060)
Mus-Agar-NaCl	colonias puntuales	3920b (±500)	redondas, grandes	6620a (±1631)	redondas, grandes	8113a (±861)

Inc.\* Número de colonias incontable debido al crecimiento extendido.

Valores con la misma letra no presentan diferencias significativas ( $p > 0,05$ )

Considerando, por una parte que el medio Mus-Agar-NaCl fue el más adecuado para el aislamiento de *V. alginolyticus* como colonias individualizadas, y por otra parte que los números de UFC sobre este medio fueron similares comparativamente a los otros, el medio Mus-Agar-NaCl fue tomado en referencia para determinar la correspondencia entre la densidad óptica (550 nm) de las suspensiones de cada cepa bacteriana y el número de UFC. De esta manera se estimó que 1D.O. corresponde a  $4,7 \times 10^7$  UFC por mL para *V. alginolyticus*, a  $7,9 \times 10^7$  UFC para *V. vulnificus*, y a  $9,7 \times 10^7$  UFC por mL para *V. tubiashii*, lo que condujo a considerar para experimentaciones siguientes que 1D.O. (550 nm) corresponde a  $7,4 \times 10^7$  UFC por ml.



BIBLIOTECA  
FAC. INC.  
MANILA

Un segundo ensayo fue realizado para confirmar los resultados previamente obtenidos, considerando cuatro réplicas para una mejor estimación de los números de UFC. Se sembraron 50  $\mu$ L de una suspensión diluída dos veces menos que la anterior correspondiente a una D.O.=0,17 a 550 nm, lo que debía conducir a obtener alrededor de 600 UFC por placa.

Los mismos medios fueron evaluados: AM; A.M-Mus25%-NaCl; A.M-Mus50%-NaCl; A.M-Mus75%-NaCl; A.M-Mus100%-NaCl y Mus-Agar-NaCl. El caldo de músculo fue preparado por el método 1 previamente descrito.

Para la cepa Ili de *V. alginolyticus*, como en la experimentación previa, se observó una diferencia de tipo de crecimiento de las colonias, extendido sobre Agar Marino y focalizado sobre Mus-Agar-NaCl. En lo que concierne a los medios con varias concentraciones de caldo de músculo, la individualización de las colonias fue observada solamente a partir de la concentración de 75%, mientras que previamente tal proceso de individualización fue observado a partir de la concentración 50% de caldo. Este cambio podría resultar de un mayor número de bacterias sembradas, lo que significaría una menor disponibilidad de nutrientes de los medios. Las colonias fueron de manera homogénea de color crema, independientemente del tipo de medio. Del punto de vista de los números de UFC, hubo una diferencia significativa en el crecimiento de colonias ( $p < 0,05$ ) en favor del Mus-Agar-NaCl, comparativamente a los otros medios (Tabla 2).

En las placas sembradas con *V. vulnificus*, se observaron igualmente diferencias en el tamaño y la morfología de las colonias en función de la concentración de caldo de músculo: colonias redondas, pequeñas y claras sobre medio Agar Marino y medios con concentraciones bajas de caldo de músculo; colonias medianas sobre medios con concentraciones intermedias de caldo; colonias grandes y opacas sobre Mus-Agar-NaCl. El color de las colonias permaneció crema en todos los medios. Nuevamente no se presentaron diferencias significativas para los

números de bacterias aisladas sobre los diferentes medios ( $p > 0,05$ ) (Tabla 2).

Los resultados con *V. tubiashii* fueron similares a los de la previa experimentación y a los relacionados con *V. vulnificus*, es decir un aumento del tamaño de las colonias en presencia de caldo en los medios y sin cambios significativos del números de UFC ( $p > 0,05$ ) (Tabla 2).

Tabla 2. Morfologías y números de UFC aisladas por ml de suspensiones de *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *V. tubiashii*. Los medios corresponden respectivamente a: Agar Marino (medio AM); AM enriquecido con caldo de músculo preparado por el método 1 e incorporado a diferentes concentraciones (25%/50%/75%/100%), siendo adiconado NaCl (2%) (medios AM-Mus X%-NaCl); Caldo de músculo preparado por el método 1 con 2% de Bacto Agar y 2% de NaCl (medio Mus-Agar-NaCl).

Medio	<i>V. alginolyticus</i>		<i>V. vulnificus</i>		<i>V. tubiashii</i>	
	morfología	x(S)	morfología	x(S)	morfología	x(S)
AM	extendido parcial	Inc.*	redondas, claras y pequeñas	34510a (±10040)	pequeñas redondas	28040a (±5538)
AM-Mus 25%-NaCl	extendido tenue total	Inc.*	redondas, pequeñas	30360a (±8440)	pequeñas redondas	28380a (±7539)
AM-Mus 50%-NaCl	extendido pocas colonias	Inc.*	redondas, medianas	39240a (±4084)	pequeña, redondas	25420a (±9586)
AM-Mus 75%-NaCl	extendido tenues, rizoides	28420a (±4353)	redondas, medianas	39700a (±3562)	medianas redondas	26840a (±3503)
AM-Mus 100%NaCl	rizoides, medianas	31360a (±2687)	redondas, medianas	39000a (±14173)	mediana, redondas	29540a (±6430)
Mus Agar NaCl	redondas, medianas	43920b (±6586)	grandes, opacas y redondas	42080a (±6044)	medianas redondas	40760a (±4995)

Inc.\* Número de colonias incontable debido al crecimiento extendido.

Valores con la misma letra no presentan diferencias significativas ( $p > 0,05$ )

Se realizó nuevamente el cálculo de la correspondencia entre D.O. y número de UFC por mL en base al promedio del número de colonias recuperadas en Mus-Agar-NaCl. Este nuevo valor fue calculado como: 1 D.O. corresponde a  $2,54 \times 10^8$  UFC por ml. Como se puede apreciar en la tabla 1, a diferencia del primer ensayo, no existen diferencias entre los números de UFC obtenidas para los tres vibrios sembrados sobre el Mus-Agar-NaCl. Así considerando los ensayos 1 y 2, es interesante notar que la siembra de placas con un mismo

volumen de suspensión bacteriana correspondientes a dos concentraciones, X y 2X, condujeron de hecho a números de UFC correspondientes a Y y 6Y, respectivamente. Este cambio entre las proporciones de los inóculos y de los productos puede ser explicado por un fenómeno de "cooperación" entre las bacterias, en términos de explotación metabólica del medio. Así, la proporción de bacterias sembradas sobre un medio y capaces de crecer para formar una colonia parece ser favorecida por la densidad de bacterias sobre la superficie del medio.

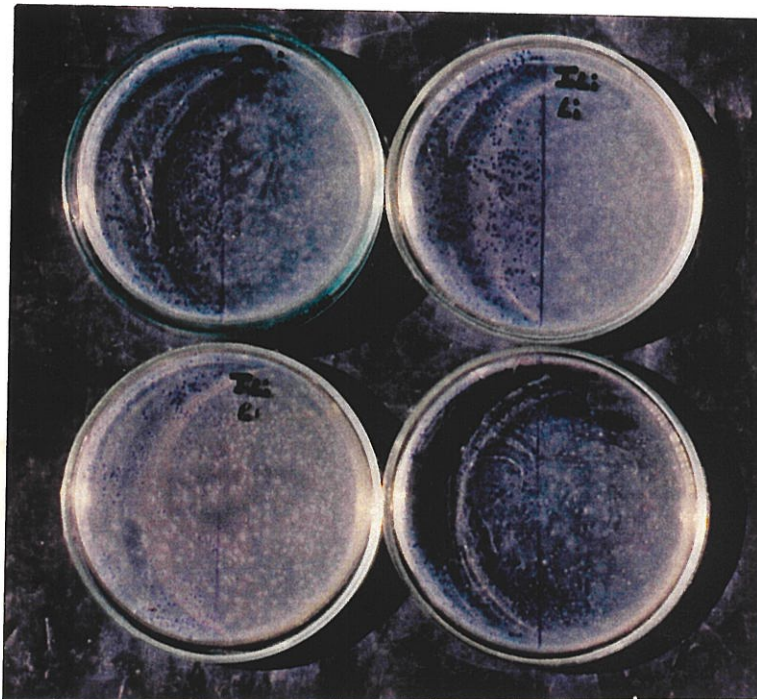
En estos dos primeros ensayos, no existieron diferencias significativas entre los números de UFC obtenidas sobre Agar Marino y sobre Mus-Agar-NaCl, lo que puede conducir a considerar este último como una alternativa al Agar Marino, con la condición de adicionar un suplemento de sales similares a la composición del agua de mar. Consecuentemente, los posteriores ensayos se realizaron con este nuevo medio, Mus-Agar-NaCl.

### **3.1.2. Comparación de dos tipos de caldos de músculo**

En base, por una parte, a la calidad aparente del medio Mus-Agar-NaCl como potencial medio de aislamiento y, por otra parte, a la mejor individualización de las colonias en presencia de caldo de músculo, pareció útil intentar simplificar el método de preparación del caldo. En las primeras experimentaciones, el caldo fue preparado y subsecuentemente centrifugado y filtrado con membrana 0.45  $\mu\text{m}$  (método 1), lo que vuelve fastidiosa la preparación de grandes volúmenes. Un método simplificado consistió en una filtración del caldo a través de varias capas de gasa (método 2). Estos dos tipos de caldos fueron utilizados en la forma de medios Mus1-Agar-NaCl y Mus2-Agar-NaCl, respectivamente.

Cada ensayo tuvo cuatro réplicas, utilizando las mismas tres cepas bacterianas que en los ensayos anteriores (*V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. tubiashii*). Se sembraron 50  $\mu$ L. de una suspensión diluída mil veces correspondiente inicialmente a una D.O.=0,17 a 550 nm.

Las colonias de *V. alginolyticus* que crecieron sobre el medio Mus1-Agar-NaCl fueron de forma redondeada y de tamaño mediano, mientras que en el Mus2-Agar-NaCl las colonias fueron rizoides, medianas y cremas (Foto 3). No se presentaron diferencias significativas en los números de UFC obtenidas entre ambos medios ( $p>0,05$ ) (Tabla 3).



BIBLIOTECA  
ING. MARÍTIMA

Foto No. 3. Morfología de las colonias de *V. alginolyticus* aisladas sobre Mus-Agar-NaCl preparado por el método 2 (licuado y filtrado por gasa) (arriba) y Mus-Agar-NaCl preparado por el método 1 (centrifugado y filtrado por membrana 0,45  $\mu$ M) (abajo) con su respectiva réplica

La cepa de *V. vulnificus* presentó colonias redondeadas, de tamaño mediano y color crema en ambos medios. Tampoco se presentaron diferencias significativas entre los números de colonias aisladas sobre los dos medios ( $p>0,05$ ) (Tabla 3).

Los resultados fueron similares para la cepa de *V. tubiashii* (Foto 4) (Tabla 3).

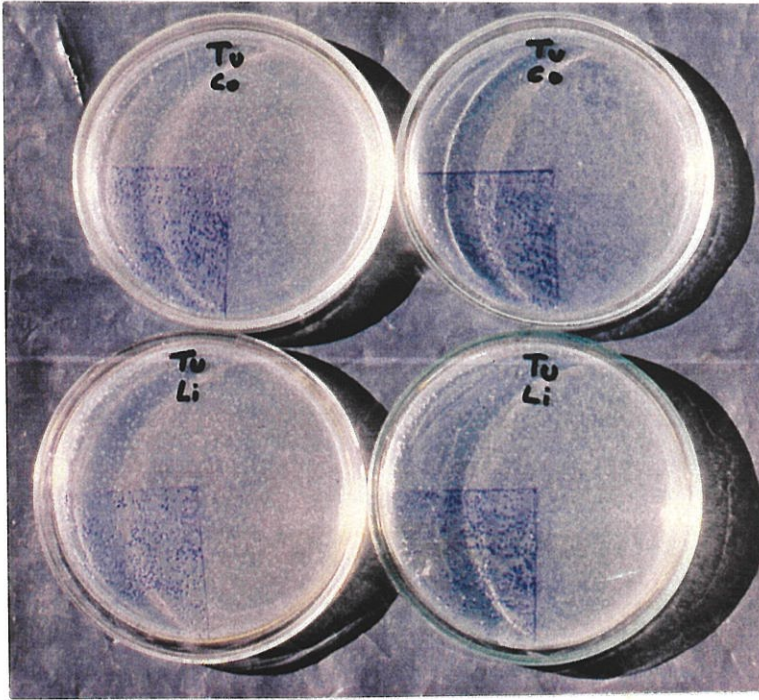


Foto No.4. Morfología de las colonias de *V. tubiashii* aislada sobre Mus-Agar-NaCl preparado por el método 1 (centrifugado y filtrado por membrana 0,45  $\mu\text{m}$ ) (arriba) y Mus-Agar-NaCl preparado por el método 2 (licuado y filtrado por gasa) (abajo) con su respectiva réplica.

En conclusión, pareció que el método de preparación de los caldos de músculo no influyó cuantitativa o cualitativamente en el aislamiento de las bacterias consideradas, lo que condujo a escoger el método 2 con simple filtración a través de gasa, evitándose así las etapas de centrifugación y filtración con membrana (método 1).



Tabla 3. Morfologías y números de UFC aisladas por ml de suspensiones de *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *V. tubiashii*. Los medios corresponden respectivamente a: Caldo de músculo preparado por el método 1 y Caldo de músculo preparado por el método 2, ambos con 2% de Bacto Agar y 2% de NaCl (medio Mus-Agar-NaCl)

Medio	<i>Vibrio alginolyticus</i>		<i>Vibrio vulnificus</i>		<i>Vibrio tubiashii</i>	
	morfología	x(S)	morfología	x(S)	morfología	x(S)
Mus1-Agar-NaCl	redondas, medianas	16130a (±1860)	redondas, medianas	48380a (±8079)	redondas, medianas	45440a (±5409)
Mus2-Agar-NaCl	rizoides, medianas	19740a (±5208)	redondas, medianas	52080a (±11468)	redondas, medianas	42900a (±3426)

Valores con la misma letra no presentan diferencias significativas ( $p > 0,05$ )

Nuevamente, fue determinada la correspondencia entre la D.O. de la suspensiones bacterianas y los números de UFC: 1 D.O. =  $2,2 \times 10^8$  UFC por ml. Este valor es muy cercano al valor previamente estimado,  $2,5 \times 10^8$  UFC por ml.

### 3.1.3. Evaluación de diferentes suplementos de sales en el medio Mus2-Agar

El objetivo de este ensayo fue evaluar la incidencencia sobre el aislamiento bacteriano del tipo de sales utilizadas en la preparación del medio Mus-Agar, siendo el medio Mus2-Agar-NaCl (2%) considerado como referencia. El medio Agar Marino (con 0,5% más de Bacto Agar) fue utilizado como control.

El primer medio (Mus2-Agar-A.mar) correspondió a caldo de músculo preparado con agua de mar previamente esterilizada por UV y autoclave (15 min., 121°C). El segundo medio (Mus2-Agar-S.S.) correspondió a caldo de músculo preparado con agua destilada conteniendo 40 g/L de "Sea Salts", de acuerdo a la recomendación del proveedor (Sigma® Chemical Company).

Las mismas tres cepas bacterianas fueron sembradas con un volumen de 50µL por placa, utilizando una suspensión diluída 1000 veces correspondiente inicialmente a una D.O. = 1.7 (550 nm).



BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MANILA

Como se esperaba, las colonias de *V. alginolyticus* crecieron en "extendido" sobre el medio Agar Marino, mientras que fueron redondeadas y medianas sobre el medio Mus2-Agar-NaCl. Sobre el medio Mus2-Agar-SS, las colonias fueron de tamaño mediano y crecieron de manera yuxtapuesta en mosaico. Sobre el medio Mus2-Agar-A.Mar las colonias fueron rizoides con presencia de colonias extendidas sobre el agar. En lo que concierne los números de UFC, ninguna diferencia significativa fue observada entre los diferentes medios ( $p > 0,05$ ) (Tabla 4).

Para la cepa de *V. vulnificus*, las colonias fueron en todas las condiciones de color crema, de forma redondeada y de pequeño tamaño. No se presentaron diferencias significativas en los números de UFC en relación con los diferentes medios ( $p > 0,05$ ). Fue lo mismo con la cepa de *V. tubiashii*, en términos de morfología y de números de la colonias (Tabla 4).

Tabla 4. Morfologías y números de UFC aisladas por ml. de suspensiones de *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *V. tubiashii*. Los medios corresponden respectivamente a: Agar Marino (medio AM); Caldo de músculo preparado por el método 2 con 2% de Bacto Agar y 40g/L de SS.(medio Mus2-Agar-SS.); Caldo de músculo preparado por el método 2 con 2% de Bacto Agar y agua de mar en vez de agua destilada (medio Mus2-Agar-A. mar); Caldo de músculo preparado por el método 2 con 2% de Bacto Agar y 2% de NaCl (medio Mus2-Agar-NaCl).

Medio	<i>V. alginolyticus</i>		<i>V. vulnificus</i>		<i>V. tubiashii</i>	
	morfología	x(S)	morfología	x(S)	morfología	x(S)
AM	extendido tenue y parcial	Inc*	redondas, pequeñas	62000a (±12539)	redondas, pequeñas	101440a (±30528)
Mus2-Agar-SS	rizoides medianas	17740a (±4913)	redondas, pequeñas	68240a (±11153)	redondas, pequeñas	110320a (±9119)
Mus2-Agar-A. Mar	rizoides y extendido	25340a (±17597)	redondas, pequeñas	78290a (±2471)	redondas, pequeñas	109600a (±2088)
Mus2-Agar-NaCl	redondas, medianas	32940a (±9908)	redondas, pequeñas	68180a (±13492)	redondas, pequeñas	93640a (±13952)

Inc.\* Número de colonias incontable debido al crecimiento extendido.

Valores con la misma letra no presentan diferencias significativas ( $p > 0,05$ )

El uso de agua de mar para la preparación de medios de aislamiento para bacterias marinas correspondería a una composición ideal (dada su variedad de sales y ser el medio donde se desenvuelven estas bacterias), de no existir el inconveniente de la variabilidad de composición en función del tiempo (períodos climáticos) y del sitio de proveniencia del agua. Sin

embargo, frecuentemente se utiliza agua de mar en bacteriología marina, por ejemplo para vibrios luminiscentes (Rodina, 1972).

El uso de NaCl se ha revelado equivalente a las otras sales, pero existe el riesgo de no poder aislar bacterias con requerimientos particulares en iones u oligoelementos.

En base a los presentes resultados, parece que el producto "Sea salts" podría constituir una alternativa ventajosa para una estandarización de la composición de sales en los medios, composición parecida a la del agua de mar.

El valor de correspondencia de D.O. calculado en base al promedio del número de UFC por mL recuperadas para los tres vibrios sobre Mus-Agar-NaCl 2 fue de  $3,9 \times 10^8$  UFC por ml.

Para validar los resultados previos, otras dos cepas bacterianas fueron consideradas, *Pseudomonas sp.* (cepa B1158-2) y *Vibrio damsella* (cepa SZ22), utilizando en paralelo los medios Agar marino (AM) y Mus2-Agar-SS. Se sembraron 50  $\mu$ L de suspensiones correspondientes a una dilución de mil veces en cultivos con D.O. inicial =0,17 (550 nm).

Para la dos cepas de bacterias, no se observó diferencias significativas en los números de colonias aisladas sobre cada tipo de medio ( $p > 0,05$ ) (Tabla 5).

Tabla 5. Morfologías y números de UFC aisladas por ml de suspensiones de *V. damsella* y *Pseudomonas sp.* Los medios corresponden respectivamente a: Agar Marino (medio AM); Caldo de músculo preparado por el método 2 con 2% de Bacto Agar y 40g/L de SS.

Medio	<i>Pseudomonas sp.</i>		<i>V. damsella</i>	
	morfología	x(S)	morfología	x(S)
Agar Marino	cremas, redondas pequeñas	27860a ( $\pm 5947$ )	blancas, redondas pequeñas	20920a ( $\pm 5585$ )
Mus Agar SS	cremas, redondas pequeñas	30160a ( $\pm 6173$ )	blancas, redondas, pequeñas	18570a ( $\pm 4430$ )

Valores con la misma letra no presentan diferencias significativas ( $p > 0,05$ )



BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MARITIMA

### 3.1.4. Evaluación del caldo de hepatopáncreas como aditivo o sustituto del Agar Marino.

Después de la evaluación del caldo de músculo como aditivo o sustituto del medio Agar marino, se consideró el hepatopáncreas debido a que este órgano es colonizado por bacterias y es sensible a bacterias patógenas. Así, los componentes celulares de este órgano podrían ser útiles como aditivo o sustituto del medio Agar Marino, en particular para conferir un carácter selectivo de bacterias adaptadas al hepatopáncreas, ya sea como patógenas, probióticas o simples componente de la flora normal.

Como en el caso anterior, los ensayos fueron realizados con tres cepas de vibrios, *V. alginolyticus* (cepa Ili), *V. vulnificus* (cepa S2) y *V. tubiashii* (cepa B1163-1), siendo las dos primeras probiótica y patógena respectivamente.

Se sembraron las bacterias sobre los medios Agar Marino con 25, 50, 75 o 100% de caldo de hepatopáncreas de camarón *P. vannamei*, llevándose un control con Agar Marino (con 0.5% más de Bacto Agar). Además se elaboraron medios con caldo de músculo con 2% de Bacto Agar y 2% de NaCl (Mus1-Agar-NaCl) y con caldo de hepatopáncreas con 2% de Bacto Agar y 2% de NaCl (Hep-Agar-NaCl). El caldo de hepatopáncreas fue preparado por el método 1. Cada tratamiento tuvo cuatro réplicas y cada caja se sembró con 50  $\mu$ L de una suspensión diluída 1000 veces correspondiente inicialmente a una D.O. = 0.17 (550 nm).

Para *V. alginolyticus*, al igual que con el caldo de músculo, la presencia de caldo de hepatopáncreas en el Agar Marino causó un cambio en la forma de las colonias. En Agar Marino, las colonias fueron extendidas y tenues, mientras que con una adición de 25% de hepatopáncreas formaron mosaicos incontables sobre la superficie del medio. Con

concentraciones de 50% y 75%, la individualización de las colonias fue más marcada con forma rizoide sobre el agar. En Agar Marino enriquecido con 100% de caldo de hepatopáncreas se presentaron colonias grandes tipo rizoide diferenciables entre sí.

Sobre el medio control Hep-Agar-NaCl, las colonias fueron grandes y rizoides como ocurrió para el medio con 100% de caldo, mientras que las colonias fueron compactas sobre el medio Mus-Agar-NaCl. Todas las colonias fueron de color crema independientemente del tipo de medio.

Los números de UFC fueron significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) con el medio Mus-Agar-NaCl (Tabla 6) comparativamente a los medios con caldo de hepatopáncreas, lo que indicó claramente la superioridad del caldo de músculo sobre el caldo de hepatopáncreas..

Para *V. vulnificus*, las colonias fueron pequeñas sobre todos los medios que contenían caldo de hepatopáncreas mientras que sobre el medio Mus-Agar-NaCl las colonias tuvieron un tamaño mayor y un color crema. Sobre este último medio se pudo apreciar un mayor número de colonias en Agar Marino (AM), Agar Marino con 50% de caldo de hepatopáncreas AM-Hep 50%-NaCl y en Mus-Agar-NaCl ( $p < 0,05$ ). Sobre el medio control Hep-Agar-NaCl, ninguna colonia fue aislada.

*V. tubiashii* presentó colonias redondas y pequeñas sobre todos los medios a excepción del Mus-Agar-NaCl, donde las colonias fueron de mayor tamaño. Los números de UFC fueron mayores sobre los medios AM-Hep 25%-NaCl, AM-Hep 50%-NaCl, Agar Marino y Mus1-Agar-NaCl que sobre los medios con altas concentraciones en caldo de hepatopáncreas, AM-Hep 75%-NaCl, AM-Hep 100%-NaCl y Hep-Agar-NaCl ( $p < 0,05$ ) (Tabla 6).

Tabla 6. Morfología y números de UFC aisladas por ml. de suspensiones de *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *V. tubiashii*. Los medios corresponden respectivamente a: Agar Marino (medio AM); AM enriquecido con caldo de hepatopáncreas preparado por el método 1 e incorporado a diferentes concentraciones (25%/50%/75%/100%), siendo adicionado NaCl (2%) (medios AM-HepX%-NaCl); Caldo de hepatopáncreas preparado por el método 1 con 2% de Bacto Agar y 2% de NaCl (medio Mus-Agar-NaCl).

Medio	<i>V. alginolyticus</i>			<i>V. vulnificus</i>			<i>V. tubiashii</i>		
	morfología	x(S)	%R	morfología	x(S)	%R	morfología	x(S)	%R
AM	extendido tenue, parcial	Inc.*	-	pequeñas redondas	18440c (±5218)	98%	pequeñas, redondas	18870b (±11066)	100% **
AM-Hep 25%-NaCl	extendido tipo mosaico	Inc.*	-	pequeña, redondas	1410a (±1380)	7,5%	pequeñas, redondas	12625ab (±3228)	72%
AM-Hep 50%-NaCl	extendido rizoides	Inc.*	-	pequeñas redondas	14900bc (±2883)	79%	pequeñas, redondas	21290b (±6394)	100% **
AM-Hep 75%-NaCl	extendido rizoides	Inc.*	-	pequeñas redondas	5565a (±1975)	30%	pequeñas, redondas	150a (±42)	0,8%
AM-Hep 100%NaCl	extendido rizoides	7590a (±1540)	29%	pequeñas redondas	7360ab (±1386)	39%	pequeñas, redondas	1675a (±650)	9,6%
Hep-Agar NaCl	rizoides, grandes	7060a (±2301)	27%	pequeñas redondas	-	0%	pequeñas, redondas	580a (±235)	3,3%
Mus-Agar NaCl	redondas, medianas	25700b (±3162)		medianas redondas	18826c (±2762)		medianas, redondas	17453ab (±1160)	

Inc.\* Número de colonias incontable debido al crecimiento extendido.

Valores con la misma letra no presentan diferencias significativas ( $p > 0,05$ )

100%\*\* : número de colonias aisladas superior al número sobre el medio de referencia Mus-Agar-NaCl

Además, fueron estimados los porcentajes de recuperación para cada bacteria y cada medio de aislamiento, utilizando el número de UFC de cada bacteria sobre el medio Mus-Agar-NaCl como referencia 100% (tabla 6). Estos porcentajes fueron muy variables en función de la bacteria, lo que sugirió una variabilidad a nivel de la cepa bacteriana para su capacidad de crecer en presencia de caldo de hepatopáncreas. Se puede pensar que las bajas tasas de crecimiento se deban a una susceptibilidad de las bacterias a metabolitos y enzimas extraídos de las células de este órgano.



### 3.2. Evaluación de aditivos en el medio Agar TCBS

#### 3.2.1. Evaluación de la selectividad "cuantitativa" del medio Agar TCBS

Este ensayo tuvo como objetivo evaluar la selectividad "cuantitativa" del medio agar-TCBS. De hecho, este último es utilizado rutinariamente en la mayoría de los laboratorios pero se sospecha que este medio, concebido para aislar vibrios de importancia medica, podría ser demasiado selectivo, no solamente en términos cualitativos pero también en términos cuantitativos. Esta hipótesis resulta en particular de infecciones experimentales en larvas de camarón que fueron realizadas con cepas puras de bacterias, *V. vulnificus* "E22" y *V. alginolyticus* "Ili" y que condujeron frecuentemente a números bajos de colonias aisladas sobre el medio agar-TCBS mientras que los animales presentaron síntomas marcados (San Miguel, 1996 y Serrano, 1996).

Los números de UFC obtenidos para cada cepa bacteriana fueron comparados con el número esperado, considerando la correspondencia entre la D.O. de la suspensión y el número de UFC por mL aisladas sobre los medios Mus-agar-NaCl. En base a los diferentes ensayos previamente descritos, se estimó que para los medios Mus-agar-NaCl, ID.O. corresponde a  $2,9 \times 10^8$  UFC por mL. Así, se puede determinar un coeficiente de recuperación que corresponde a la tasa entre el número de UFC obtenidas sobre el medio agar-TCBS y el número de UFC obtenidas sobre los medios Mus-agar-NaCl.

Sobre el medio agar-TCBS, la cepa Ili de *V. alginolyticus* presentó colonias de color amarillo, con forma redondeada y tamaño pequeño. Las placas sembradas a partir de la suspensión original presentaron un número de colonias incontable por el exceso de bacterias. En las placas correspondientes a las tres otras diluciones, fue posible numerar colonias y, subsecuentemente, determinar el porcentaje de recuperación de UFC sobre agar-TCBS. menor de 1% (Tabla 7).

La cepa S2 de *V. vulnificus* presentó colonias de color verde, con forma redondeada y tamaño pequeño. Al igual que en el caso anterior el número de colonias fue incontable en la suspensión original. Las numeraciones de UFC aisladas a partir de las otras tres diluciones condujeron a determinar porcentajes de recuperación de 1%, 5% y 14%, respectivamente (Tabla 7).

Las colonias de *V. tubiashii* fueron de color verde, forma redondeada y de tamaño pequeño. Nuevamente en la primera dilución el número de colonias fue incontable. Al igual que lo ocurrido con la cepa Ili de *V. alginolyticus*, los porcentajes de recuperación de UFC para las tres diluciones fueron bajos, .1.7%, 1.1% y 0.5%, respectivamente (Tabla 7).

Tabla 7. Morfologías y números de UFC aisladas por ml de de *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *V. tubiashii* correspondientes a cuatro diluciones ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) de suspensiones correspondiente a una densidad óptica de 0,17 a 550 nm.

Dilución	<i>V. alginolyticus</i>			<i>V. vulnificus</i>			<i>V. tubiashii</i>		
	morfología	x(S)	%R	morfología	x(S)	%R	morfología	x(S)	%R
$10^{-3}$	amarillas, pequeñas	273 (±166)	0,6%	verdes, pequeñas	6466 (±4660)	14 %	verdes, pequeñas,	233 (±117)	0.5%
$10^{-2}$	amarillas, pequeñas	4206 (±1126)	0,9%	verdes, pequeñas	23666 (±12794)	5%	verdes, pequeñas,	5033 (±4303)	1,1%
$10^{-1}$	amarillas, pequeñas	22053 (±9479)	0.5%	verdes, pequeñas	43000 (±8202)	1%	verdes, pequeñas,	79560 (±23815)	1.7%
$10^0$	amarillas, pequeñas	Inc*	-	verdes, pequeñas	Inc*	-	verdes, pequeñas,	Inc*	-

Inc.\* Número de colonias incontable debido al exceso de bacterias.

Esta selectividad cuantitativa para cepas de bacterias obtenidas de una colonia es difícil de explicar en términos de biología bacteriana. De hecho, ¿cuáles son los mecanismos moleculares y metabólicos que pueden permitir a algunas bacterias sembradas sobre un medio multiplicarse mientras que las otras del mismo origen no pueden desarrollarse?



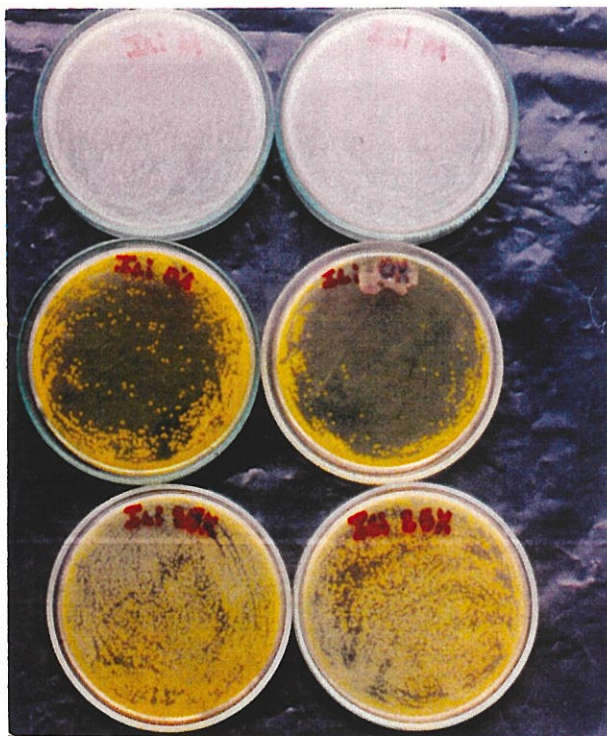
Estos resultados parecen indicar también que el carácter selectivo del medio agar-TCBS es también cualitativo ya que los porcentajes de recuperación son variables en función de la cepa de *Vibrio*. Tal selectividad cualitativa a nivel infra-genérico es importante de considerar en el contexto de la bacteriología del camarón, haciendo necesario poder aislar todas las cepas de vibrios asociadas a camarones sanos o enfermos, siendo preferible que este aislamiento sea proporcional con la presencia de las bacterias en la muestra.

La selectividad cuantitativa y cualitativa del agar-TCBS podría parecer de hecho incompatible con su uso en cultivo de camarón, lo que condujo a evaluar el efecto de un enriquecimiento con caldo de músculo aunque esta doble selectividad podría ser debida a la presencia de sales biliares o a la carencia de ciertas sales.

### **3.2.2. Evaluación del caldo de músculo en el medio Agar TCBS.**

En este ensayo fueron comparados los medios Agar-TCBS (1% más de NaCl y 0,5% más de Bacto Agar) y Agar-TCBS-Mus-NaCl con diferentes concentraciones (25, 50, 75 y 100%) de caldo de músculo de camarón *P.vannamei*, utilizando las tres mismas cepas de *Vibrio*, *V. alginolyticus* (cepa Ili), *V. vulnificus* (cepa S2) y *V.tubiashii* (cepa B1163-1). Los medios fueron sembrados con 50 µL de suspensión diluida 10 veces y correspondiente inicialmente a una D.O. = 0.17 (550 nm).

Con *V. alginolyticus* se pudo apreciar un mayor número de colonias sobre el medio TCBS-Mus-NaCl con 25% de caldo de músculo comparativamente a los otros medios ( $p < 0,05$ ) (Tabla 8) sobre los cuales los números de UFC fueron similares. Las colonias fueron amarillas sobre todos los medios (Fotos 5 y 6). Sobre el medio de referencia Mus2-Agar-SS, las colonias fueron cremas, redondas, pequeñas e incontables.



BIBLIOTECA  
 FAC. ING.  
 MARIJMA

Foto No. 5. Morfología de las colonias de *V. alginolyticus* aisladas sobre Mus2-Agar-SS (arriba), TCBS (mitad) y TCBS-Mus25%-NaCl y Mus-Agar-NaCl (abajo) con sus respectivas réplicas.

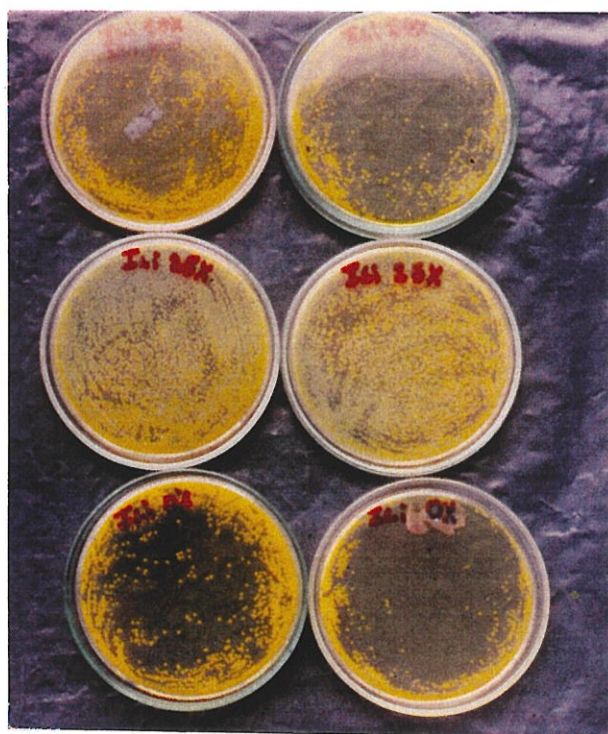


Foto No. 6. Morfología de las colonias de *V. alginolyticus* aisladas sobre TCBS-Mus50%-NaCl (arriba), TCBS-Mus25%-NaCl (mitad) y TCBS (abajo) con sus respectivas réplicas.

*V. vulnificus* presentó un mayor número de colonias en los medios TCBS-Mus 25%-NaCl y TCBS-Mus 50%-NaCl ( $p < 0,05$ ) (Tabla 8). Las colonias fueron redondas y verdes, más grandes sobre los medios enriquecidos con 25% y 50% de caldo de músculo que sobre los otros medios. Las colonias fueron incontables sobre el medio Mus2-Agar-SS.

Para *V. tubiashii*, no hubo diferencias significativas entre los número de colonias aisladas sobre los agares TCBS enriquecidos con caldo de músculo ( $p > 0,05$ ), a excepción del enriquecido con 75% de caldo que presentó un número menor de colonias ( $p < 0,05$ ) (Tabla 8). Como para *V. vulnificus*, las colonias fueron redondas y verdes, más grandes sobre los medios enriquecidos con 25% y 50% de caldo de músculo que sobre los otros medios. Las colonias fueron incontable sobre el medio Mus2-agar-SS.

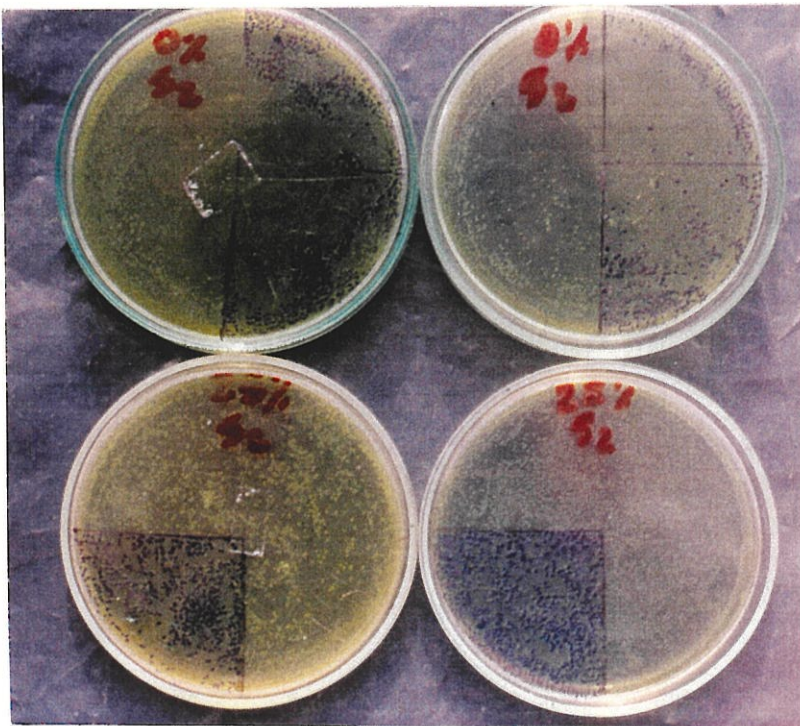


Foto No. 7. Morfología de las colonias de *V. vulnificus* aisladas sobre Agar TCBS (arriba) y TCBS-Mus25%-NaCl (abajo) con su respectiva réplica

Tabla 8. Morfología y números de UFC aisladas por ml. de suspensiones de *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *V. tubiashii*. Los medios corresponden respectivamente a: Agar TCBS; Agar TCBS enriquecido con caldo de músculo preparado por el método 2 e incorporado a diferentes concentraciones (25%/50%/75%/100%), siendo adicionado NaCl (2%) (medios TCBS-Mus X%-NaCl.); Caldo de músculo preparado por el método 2 con 2% de Bacto Agar y 40g/L de SS.(medio Mus-Agar-SS.).

Medio	<i>V. alginolyticus</i>			<i>V. vulnificus</i>			<i>V. tubiashii</i>		
	morfología	x(S)	%R	morfología	x(S)	%R	morfología	x(S)	%R
Agar TCBS	amarillas, pequeñas	23720a (±7295)	0,5%	verdes, pequeñas	29635ab (±8423)	0,6%	medianas verdes	13590ab (±2714)	0,3%
TCBS-Mus 25%	amarillas, pequeñas	93890b (±5676)	1,2%	verdes, grandes	54890b (±15566)	1,2%	grandes, verdes	22170b (±10323)	0,5%
TCBS-Mus 50%	amarillas, pequeñas	47370a (±24987)	1%	verdes, grandes	53520b (±5227)	1,1%	grandes, verdes	16270ab (±9862)	0,3%
TCBS-Mus 75%	amarillas, pequeñas	37980a (±23747)	0,8%	verdes, pequeñas	24320a (±13145)	0,5%	pequeñas verdes	3255a (±1322)	0,06%
TCBS-Mus 100%	amarillas, pequeñas	18650a (±6075)	0,4%	verdes, pequeñas	18840a (±3099)	0,4%	pequeñas verdes	10830ab (±4198)	0,2%
Mus-Agar-SS	crema, pequeñas	Inc*	-	crema, medianas	Inc*	-	crema, pequeñas	Inc*	-

Inc.\* Número de colonias incontable debido al exceso de bacterias.

Valores con la misma letra no presentan diferencias significativas ( $p > 0,05$ )

A excepción de la cepa Ili, no existieron diferencias significativas entre los números de UFC obtenidas sobre los medios con 25% y 50% de caldo de músculo ( $p > 0,05$ ), siendo estas concentraciones óptimas en términos de números de UFC. Consecuentemente, para los posteriores trabajos fue utilizado Agar TCBS con un enriquecimiento de 25% de caldo.

Por referencia al medio Mus2-Agar-SS, el porcentaje de recuperación fue estimado para cada uno de los tres *Vibrios* utilizados y siempre igual o relativamente un poco menor al 0,5%.



BIENESTAR  
1995  
AGOSTO

### **3.2.3. Evaluación de diferentes suplementos de sales en el medio TCBS-Mus25%**

Los aislamientos de los vibrios *V. alginolyticus* (cepa Ili), *V. vulnificus* (cepa S2) y *V. tubiashii* (cepa B1163-1) fueron comparados sobre los medios TCBS, TCBS-Mus 25%-NaCl(1%) y TCBS-Mus 25%-SS con 40 g/L de Sea Salts (Sigma). Los medios fueron sembrados con 50  $\mu$ L de suspensión diluída 100 veces y correspondiente inicialmente a una D.O. de 0.17 a 550 nm.

En los aislamientos de *V. alginolyticus*, la morfología y el color de las colonias fueron idénticas sobre los tres medios, amarillas y redondas. No hubo diferencias significativas en lo que respecta a los números de UFC ( $p>0,05$ ) (Tabla 9).

Con la cepa de *V. vulnificus*, las colonias fueron verdes y redondas. Se pudieron apreciar diferencias significativas entre los medios ( $p<0,05$ ), siendo el número de UFC mayor en TCBS-Mus25%, mientras que no hubo diferencia relacionada con el tipo de sal (Tabla 9).

Para la cepa de *V. tubiashii*, las colonias fueron verdes y redondas, y sus de colonias se presentaron no presentaron diferencias TCBS-Mus 25%-SS que sobre TCBS-Mus 25%-NaCl ( $p>0,05$ ). Sobre el medio TCBS no se observaron colonias bacterianas (Tabla 9).

Tabla 9. Morfología y números de UFC aisladas por ml. de suspensiones de *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *V. tubiashii*. Los medios corresponden respectivamente a: Agar TCBS; Agar TCBS enriquecido con 25% de caldo de músculo preparado por el método 2 y con 0.5% NaCl (medio TCBS-Mus 25%-NaCl); Agar TCBS enriquecido con 25% de caldo de músculo preparado por el método 2 y con 40gr/L de SS.(medio TCBS-Mus 25%-SS.).

Medio	<i>V. alginolyticus</i>			<i>V. vulnificus</i>			<i>V. tubiashii</i>		
	morfología	x(S)	%R	morfología	x(S)	%R	morfología	x(S)	%R
TCBS	amarillas, pequeñas	3145a (±1397)	0.7%	verdes, pequeñas	3950a (±1045)	0,8%	-	-	-
TCBS-Mus 25%	amarillas, pequeñas	2666a (±992)	0,5%	verdes, grandes	5395ab (±532)	1.1%	verdes, grandes	40a (±20)	0%
TCBS-Mus 25%-SS	amarillas, medianas	4415a (±931)	0,9%	verdes, grandes	6535b (±1301)	1.4%	verdes, grandes	174a (±81)	0.03%

Valores con la misma letra no presentan diferencias significativas ( $p>0,05$ )

Para validar los resultados previos, otras dos cepas bacterianas fueron consideradas, *Pseudomonas sp.* (cepa B1158-2) y *Vibrio damsella* (cepa SZ22), utilizando en paralelo los medios Agar TCBS-Mus 25%-SS y Agar TCBS (con 1% más de NaCl). Los medios fueron sembrados con 50  $\mu$ L de una suspensión diluída 10 veces y correspondiente inicialmente a una D.O. de 0.17 a 550 nm.

Sobre ambos medios, las colonias de la cepa de *Pseudomonas sp.* fueron de color verde, redondas y pequeñas. El número de colonias aisladas sobre el medio TCBS-Mus 25%-SS fue significativamente mayor que sobre el medio TCBS ( $p<0,05$ ) (Tabla 10).

La colonias de la cepa de *Vibrio damsella* fueron sobre ambos medios de color amarillo, redondas y pequeñas. Al contrario de *Pseudomonas sp.*, el número de colonias aisladas sobre el medio TCBS-Mus 25%-SS fue significativamente menor que sobre el medio TCBS ( $p<0,05$ ) (Tabla 10).

Tabla 10. Morfología y números de UFC aisladas por ml. de suspensiones de *Pseudomonas sp.* y *V. damsella*. Los medios corresponden respectivamente a: Agar TCBS (TCBS); Agar TCBS enriquecido con 25% de caldo de músculo preparado por el método 2 y 40gr/L de SS (TCBS-Mus 25%-SS).

Medio	<i>Pseudomonas sp.</i>			<i>V. damsella</i>		
	morfología	x(S)	% R*	morfología	x(S)	% R*
TCBS	verdes, pequeñas	26200a (±6872)	0,86%	amarilla, pequeñas	47240a (±5470)	2.5%
TCBS-Mus 25%-SS	verdes, pequeñas	63520b (±17045)	2,1%	amarilla, pequeñas	18580b (±9781)	1%

Valores con la misma letra no presentan diferencias significativas ( $p > 0,05$ )

%R\* Porcentaje de recuperación en base a los números de UFC obtenidas sobre Mus-Agar-SS para *Pseudomonas sp* y *V. damsella*, respectivamente. ( ver Tabla 5).

Considerando los números de UFC obtenidas sobre el medio Mus2-Agar-SS con 50  $\mu$ L de una suspensión diluída 1000 veces (ver Tabla 5), por una parte, y los números de UFC obtenidas sobre los presentes medios TCBS con 50  $\mu$ L de una suspensión equivalente diluída 10 veces (Tabla 10), por otra parte, se estimaron los porcentajes de recuperación (%R) en alrededor de 1-2%.

En conclusión, parece que la adición de caldo de músculo no cambió la agresividad del medio TCBS, siendo bacterias del género *Vibrio* y *Pseudomonas* fuertemente inhibidas por la composición de este medio (hasta el 97%). Es importante apreciar como la cepa de *Pseudomonas spp.* es aumentada significativamente ( $P > 0,05$ ) con la adición de caldo de músculo pero aún así este aumento no es del todo eficiente (solo el 0,15%).

### 3.3. Evaluación clínica de los medios Agar Marino, Mus2-Agar-SS, Agar TCBS y Agar TCBS-Mus25%-SS

En base a los ensayos previos fue considerado, por una parte que el medio Mus2-Agar-SS podría constituir un sustituto al medio Agar Marino clásicamente utilizado para los monitoreos bacteriológicos en cultivo de camarón y, por otra parte, que el medio Agar TCBS-Mus 25%-SS podría ser un sustituto al medio Agar TCBS también clásicamente utilizado.

En primer lugar, una evaluación clínica de estos cuatro medios fue realizada con una colección de cinco cepas de bacterias (Q7, Q13, Q16, Q34 y Qaß) aisladas de larvas de camarón enfermas con síntomas típicos del síndrome de la "Zoea". Estas cepas no fueron identificadas bioquímicamente debido a su incapacidad de crecer en ninguno de los medios de identificación, lo que podría sugerir una especialización parasitaria con dependencia del huésped y subsecuentemente deficiencias metabólicas.

Para las cinco cepas bacterianas fue observado crecimiento sobre los medios Agar Marino y Mus-Agar-SS.

Ninguna de estas cepas bacterianas fueron capaces de crecer sobre el medio TCBS. lo que mostró la fuerte selectividad de este medio, haciendo en este caso su uso, incompatible como medio de aislamiento.

Por el contrario, el medio TCBS-Mus25%-SS permitió el crecimiento de las cepas Q13, Qaß y Q34, mientras que Q7, Q16 y Q34 fueron también incapaces de crecer sobre este medio enriquecido.

Estos resultados deberan ser considerados con gran atención debido a su alcance epidemiológico, ya que sugiere que la metodología de aislamiento sobre TCBS, actualmente practicada en casi todos los laboratorios y camaroneras, no permitiría detectar varias cepas con deficiencia metabólica probablemente relacionada con especialización parasitaria y patogenicidad.

Una segunda evaluación clínica de los cuatro medios fue realizada a través de cuatro muestreos, aislándose las bacterias a partir de macerados de post-larvas o de extracciones de hepatopáncreas con un asa de platino. Los dos primeros muestreos correspondieron al mismo grupo de larvas, al estadio PL10 con proveniencia de laboratorio y al estadio PL20



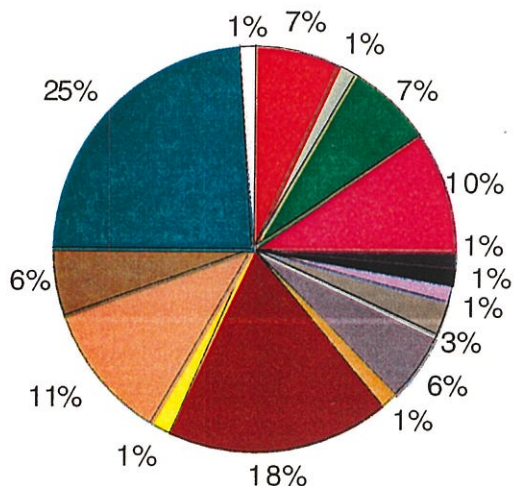
BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MARITIMA



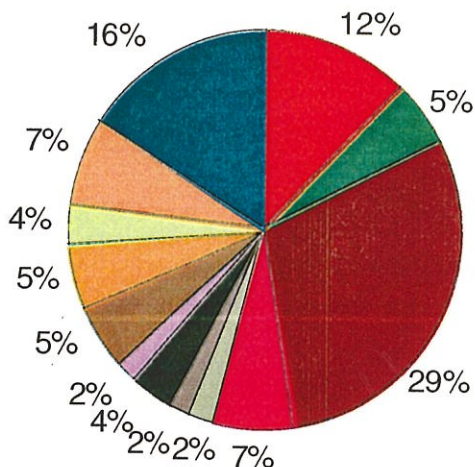
después una semana en la camaronera. Los dos últimos muestreos correspondieron también al mismo grupo de camarones después 30 y 45 días en la camaronera.

Para cada muestreo fueron identificadas bioquímicamente algunas bacterias a fin de determinar la variedad en relación con cada tipo de medio (FIGURA No.3).

**Agar Marino**



**Mus-Agar-SS**



BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MARITIMA

Colonias aisladas: 72

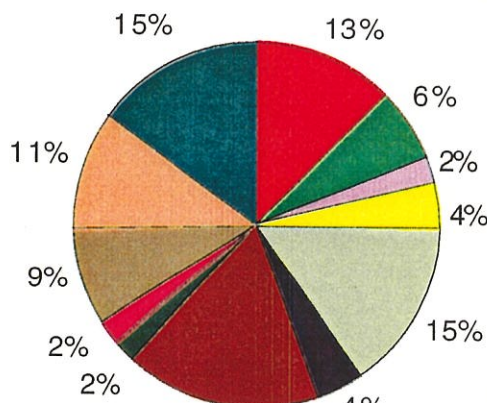
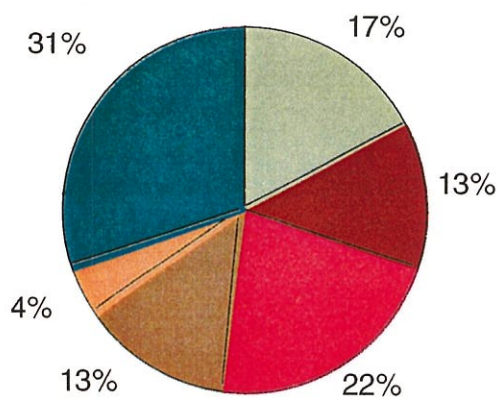
Colonias aisladas: 57

Número de especies identificadas: 14

Número de colonias identificadas: 12

**TCBS**

**TCBS-Mus 25%-SS**



Colonias aisladas: 23

Colonias aisladas: 47

Número de especies identificadas: 5

Número de especies identificadas: 11

- V. splendidus I
- V. fluvialis
- V. anguillarum
- V. tu biashii
- V. fisheri
- V. campbeli
- V. alginolyticus
- V. vulnificus
- V. furnisii
- V. splendidus II
- V. damsella
- V. cholerae
- V. logei
- V. nereis
- Photo bacterium
- Gram-positiva
- No identificable
- No recuperable en TSA

FIGURA No.3. Total de bacterias identificadas sobre los distintos medios de cultivo durante los muestreos.

La comparación entre los medios Agar marino y Mus-Agar-SS mostró una gran similitud en términos de las especies bacterianas aisladas y sus proporciones respectivas. Sobre ambos medios, las especies más frecuentemente identificadas fueron *V. tubiashii*, *V. splendidus*, *V. fisherii*, *V. campbelli*, así como bacterias del género *Photobacterium* y bacterias Gram-positivas. Algunas bacterias en más baja proporción fueron también las mismas sobre ambos medios, *V. fluvialis*, *V. damsella*. En ambos casos, una proporción no despreciable de bacterias fue imposible de cultivar sobre el medio TSA, y subsecuentemente no fueron identificadas. La naturaleza de estas bacterias aislables sobre Agar Marino o Mus-Agar-SS ameritará ser estudiada, en particular en relación con algunos requerimientos satisfechos por la composición de estos medios y no satisfechos por el TSA. Una hipótesis corresponde a nucleótidos que podrían estar ausentes del medio TSA y suministrados, ya sea por el extracto de levadura presente en el medio Agar Marino o por el caldo de camarón previamente licuado en el medio Mus-Agar-SS. Tales bacterias podrían corresponder a cepas con fuertes adaptaciones parasitarias que generalmente conducen a deficiencias y subsecuentemente a requerimientos particulares.

En lo que concierne a los medios TCBS y TCBS-Mus 25%-SS, se aislaron también colonias que no se pueden subsecuentemente cultivar sobre el medio TSA. La hipótesis emitida en el párrafo anterior podría ser considerada ya que el medio TCBS contiene una alta concentración de extracto de levadura. Del punto de vista de la selectividad de los medios TCBS y TCBS-Mus 25%-SS, las bacterias aisladas fueron en ambos casos en su mayoría bacterias del género *Photobacterium* y los vibrios *V. tubiashii*, *V. anguillarum*. Para esta última especie los dos medios TCBS y TCBS-Mus 25%-SS parecen selectivos ya que 17% y 15%, respectivamente, de las colonias aisladas fueron identificadas como *V. anguillarum* mientras que sobre los medios Agar Marino y Mus-Agar-SS esta bacteria fue minoritariamente aislada, 1% y 2% respectivamente. Bacterias Gram-positivas fueron aisladas en proporciones



BIBLIOTECA  
ING.  
MARITIMA

similares a lo que fue con los otros dos medios. *V. fisherii* fue mucho más frecuentemente aislado sobre el medio TCBS que TCBS-Mus 25%-SS, 22% y 2% respectivamente. *V. splendidus*, y con una menor frecuencia *V. furnisis*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* fueron aisladas solamente sobre el medio TCBS-Mus 25%-SS, lo que sugiere una menor selectividad de este último medio comparativamente al medio TCBS clásicamente utilizado en cultivo de camarón. Sin embargo, esta variedad de bacterias aparentemente mayor con el medio TCBS-Mus 25%-SS podría de hecho resultar del mayor número de bacterias identificadas.

## CONCLUSIONES

1) El presente trabajo fue enfocado a medios de aislamiento para bacterias asociadas con camarones, considerando el carácter primordial del aislamiento para poder detectar todas las bacterias presentes en muestras de camarones y, subsecuentemente, poder identificarlas y determinar su naturaleza, en particular patógena o probiótica.

2) Clásicamente, los medios Agar Marino y TCBS son utilizados en cultivo de camarón para cuantificar la flora bacteriana total y los vibrios, respectivamente. Estas aseveraciones resultan de la bacteriología marina y médica, las cuales comparativamente con la bacteriología de camarón están más avanzadas, debiendo realizarse en esta última trabajos que establezcan las características reales de estos medios, en términos de selectividad cualitativa y cuantitativa. Además, faltan trabajos sobre optimización o elaboración de medios de aislamiento específicos de bacterias asociadas con camarones. Por eso, se realizaron ensayos con diferentes aditivos y sustitutos de los medios Agar Marino y TCBS, considerando inicialmente tres cepas de vibrios, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *V. tubiashii*, siendo las dos primeras probiótica y patógena respectivamente. Luego, se analizaron muestras de camarones para considerar la selectividad cualitativa de los dos medios clásicos comparativamente con dos nuevos medios escogidos en el marco del presente estudio.

3) En lo que concierne al medio Agar Marino, los análisis fueron enfocados sobre el uso de caldo de músculo de camarón *Penaeus vannamei* como aditivo o como sustituto, dado que este tejido es muy abundante y fácil de obtener. Dos tipos de caldos fueron evaluados con el mismo éxito, uno correspondiendo a un método de preparación más sencillo que el otro.

4) La adición de caldo de músculo en el medio Agar Marino se reveló muy útil para la numeración de la cepa Ili (*V. alginolyticus*) ya que las colonias se desarrollan de manera

compacta e individualizada y no de manera extendida y amontonada. En lo que concierne a los números de UFC, esta adición no fue influyente para ninguna de las otras dos cepas bacterianas consideradas.

5) Se demostró el uso de caldo de músculo como sustituto del Agar Marino, siendo este caldo la base constitutiva del medio llamado Mus-Agar. Análisis complementarios permitieron comparar diferentes tipos de aditivos como fuentes de sales, siendo "Sea Salts" de Sigma escogidos preferencialmente al NaCl y al uso de agua de mar en razón de su formulación completa en lo que concierne a la variedad de sales e iones. Así, el medio Mus-Agar-SS fue considerado como un medio de aislamiento alternativo al Agar Marino.

6) En base a estudios clínicos con identificaciones bioquímicas de bacterias aisladas respectivamente sobre medios Agar Marino y Mus-Agar-SS, este último demostró su equivalencia con el primero en términos de variedad bacteriana, con la ventaja de evitar el desarrollo extendido típico de algunas bacterias sobre el medio Agar Marino.

7) El medio Mus-Agar-SS podría constituir un nuevo producto para los monitoreos bacteriológicos en cultivo de camarón, siendo su costo 2,5 veces más bajo que el del Agar Marino a nivel de los componentes.

8) Un punto importante concernirá al estudio de la naturaleza de las bacterias aisladas sobre los dos medios Agar Marino y Mus-Agar-SS que no fueron capaces de crecer sobre el medio TSA, ya que tales bacterias pueden representar alrededor del 30% de las colonias. Una hipótesis sería un requerimiento particular, por ejemplo en nucleótidos, suministrado con el extracto de levadura o el caldo de músculo, pudiendo tal requerimiento reflejar una deficiencia metabólica resultante de una especialización parasitaria. Así, se podría detectar bacterias con más probabilidad de ser patógenas para el camarón.



BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MARITIMA

9) El caldo de hepatopáncreas fue considerado como un segundo tipo de aditivo o sustituto al medio Agar Marino, ya que este órgano es el blanco de bacterias patógenas en síndromes afectando juveniles o larvas, por ejemplo los síndromes de "bolitas" y de la "Zoea". Así, extractos de hepatopáncreas podrían favorecer bacterias patógenas (adaptadas a una vida parasitaria dependiente de nutrientes obtenidos de sus huéspedes) causantes de la destrucción de este órgano y, eventualmente, desfavorecer bacterias no patógenas de la flora bacteriana normal que podrían ser sensibles a algunos componentes de los extractos de hepatopáncreas.

10) Utilizando las tres mismas cepas de bacterias, los ensayos condujeron a demostrar que el caldo de hepatopáncreas confiere un carácter selectivo, ya sea como aditivo o como sustituto al medio Agar Marino. Además este carácter selectivo parece diferir entre bacterias, siendo las cepas probiótica y patógena menos inhibidas por el caldo de hepatopáncreas que la cepa de *V. tubiashii*. De hecho, con el medio AM-Hep 100%-NaCl por ejemplo, los porcentajes de inhibición fueron 71%, 61% y 90,4% para *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *V. tubiashii*, respectivamente.

11) Evaluaciones clínicas de estos tipos de medios serán necesarias para determinar si permiten aislar específicamente bacterias capaces de crecer en presencia de extractos de hepatopáncreas. Una alternativa al caldo, que destruye las enzimas hepatopancreáticas, sería el uso de macerados filtrados y no autoclavados que podrían ser más selectivos de bacterias altamente especializadas en la destrucción y utilización de las células del hepatopáncreas.

12) En lo que concierne a los medios TCBS y derivados, se revelaron siempre muy selectivos cuantitativamente ya que alrededor del 99% de las bacterias fueron inhibidas utilizando cepas puras. Las bases moleculares de este crecimiento diferentes entre las células bacterianas provenientes de un cultivo puro son difíciles de concebir ya que teóricamente todas estas células son genéticamente equivalentes. Se podría reflejar diferencias fisiológicas entre las

células, como reservas en aminoácidos o nucleótidos, aunque parece difícil tal diferencia debido a los numerosos ciclos de división.

13) La selectividad teórica del medio TCBS para los vibrios fue invalidada durante la evaluación clínica de los medios ya que bacterias Gram-positivas y bacterias del género *Photobacterium* fueron aisladas con una relativa frecuencia. Al igual que con los medios Agar Marino y derivados, frecuentemente se aislaron bacterias incapaces de ser cultivadas sobre TSA, probablemente gracias a la presencia de una alta concentración de extracto de levadura en el medio TCBS. Este componente debería ser considerado en la elaboración de medios ya que constituye una excelente fuente de nucleótidos y oligoelementos.



## RECOMENDACIONES

- 1) Utilizar los medios Mus2-Agar-SS y TCBS-Mus25%-SS en paralelo con los dos medios de referencia AM y TCBS para monitoreos bacteriológicos a larga escala a fin de evaluar la selectividad de cada medio para bacterias relacionadas con mortalidades, debiendo el carácter patógeno ser confirmado por medio de infecciones experimentales.
- 2) Estudiar las bacterias aisladas durante los muestreos que no tuvieron la capacidad de ser posteriormente cultivadas sobre el medio TSA, lo que sugiere un requerimiento específico posiblemente a nivel de nucleótidos que vienen con el extracto de levadura. Tal requerimiento podría corresponder a una deficiencia de la bacteria resultante de una especialización parasitaria. Así, se deben identificar estas cepas bacterianas por medio de pruebas bioquímicas y RAPD y determinar experimentalmente su relación con su huésped.
- 3) Realizar ensayos a nivel investigativo utilizando como enriquecimiento o sustituto de medios de cultivo un macerado de hepatopáncreas filtrado por membrana, evitando la esterilización térmica que desnaturalice proteínas y enzimas hepatopancreáticas. Así mismo utilizar agares que gelifican a baja temperatura lo que podría permitir el aislamiento selectivo de bacterias patógenas adaptadas para resistir a estas enzimas y utilizar los componentes liberados de las células destruidas por las toxinas bacterianas.
- 4) De igual manera, realizar ensayos en los cuales se utilice como enriquecimiento o sustituto un macerado filtrado de hemolinfa para aislar y estudiar cepas bacterianas capaces de resistir a los efectos inmunitarios del camarón, y consecuentemente posiblemente patógenas.
- 5) Realizar ensayos con un mayor número de réplicas que confirmen los resultados de este trabajo y además una evaluación de la influencia que podría tener el coágulo de residuos celulares obviado en este trabajo sobre la recuperación de bacterias en los medios.

## BIBLIOGRAFIA

- **AUSTIN B., 1993.** *Vibrionacea* representatives as pathogens of penaeid shrimps. En "Memorias del segundo congreso Ecuatoriano de acuicultura". Calderón J., Sorgeloos P., (Eds.), 1995, Guayaquil, Ecuador, pp 189-192.
- **DIFCO MANUAL, 1984.** Decima edición, DIFCO Laboratories Inc., Michigan, USA, pp 1-930.
- **HOLT J.G., KRIEG N.R., SNEATH P. H.A., STALEY J.T., WILLIAMS S.T., 1994.** Bergey's Manual of determinative bacteriology, Ninth Edition. Williams & Wilkins, Baltimore, pp 190-191.
- **HOPSON J.L., WESSELLS N.K., 1990.** Essentials of microbiology. Mc Graw-Hill, New York, USA., pp. 1-862.
- **LACHLAN H., OWENS L., SMITH S., 1996.** A selective and differential medium for *Vibrio harveyi* . Appl. environ. microbiol.,.62: 3548-3550.
- **LIGHTNER D. V., 1985.** A review of the diseases of cultured penaeid shrimps and prawns with emphasis on recent discoveries and developments. In "Proceedings of the first international conference on the culture of penaeid prawns/shrimps" ( Toko Y., Primavera J. H., Llobrera J.A., Eds). Iliolo, Philippines pp 79-103 .
- **LIGHTNER D.V., 1988.** Diseases of cultured penaeid shrimp and prawns. In C.J. Sindermann and D.V. Lightner (Eds), Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture, 2nd ed. Elsevier, New York. pp 8-127, citado por Brock, J.A. and Lightner, D.V. 1990.



BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MANILA

- **LIGHTNER D.V., BELL T.A., REDMAN R.M., MOHNEY L.L., NATIVIDAD J.M., RUKYANI A., POERNOMO A., 1992.** A review of some mayor diseases of economic significance in penaeid prawns/shrimp of the Americas and Indopacific. In "Diseases in Asian aquaculture". (Sharif I.M., Subasinghe R.R., Arthur J.R., Eds.). Fish health section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp 57-80.
- **LIGHTNER D.V., 1992.** Shrimp pathology: Major diseases of concern to the farmig industry in the Americas. En "Memorias del primer congreso Ecuatoriano de acuicultura". Calderón J., Sandoval V., (Eds.), 1993, Guayaquil, Ecuador, pp 177-196.
- **LODISH H., BALTIMORE D., BERK A., ZIPURSKY S.L., MATSUDAIRA P., DORNELL A., 1995.** Molecular cell biology. Third edition American books, New York, USA, pp 1-661.
- **MOHNEY L.L., LIGHTNER D.V., BELL T.A., 1994.** An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond-reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea: Decapoda). J. World Aquaculture Soc 25: 116-125
- **MUNIENSA-PEREZ M., JOFRE J., BLANCH A.R., 1996.** Identification of *Vibrio proteolitycus* with a differential medium and specific probe. Appl. environm. Microbiol, 62: 2673-2675.
- **NEDER M., 1989.** Determinación de los principales tipos de bacterias que afectan el cultivo de larvas *Penaeus vannamei* en sus diferentes estadios larvales. Tesis de Acuicultor. ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Guayaquil-Ecuador, pp 1-75.
- **PRESCOTT L., HARLEY J., KLEIN D. 1993.** Microbiology, Second Edition. WCB Publisher. pp 1-912.

- **RODINA A.G., 1972.** Methods in aquatic microbiology. University Park Press, Baltimore, USA. pp 1-661.
- **SAN MIGUEL L. 1996.** Caracterización de una bacteria probiótica en larvas de *Penaeus vannamei* y estudio *in vitro* de la interacción con una bacteria patógena. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Guayaquil-Ecuador. pp 1-101.
- **SERRANO J., 1996.** Optimización de un modelo experimental en larvas de camarón *Penaeus vannamei* para el control de infecciones por *Vibrio harveyi* (cepa E22) mediante la utilización de *Vibrio alginolyticus* (cepa Ili). Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Guayaquil-Ecuador, .
- **SIAVICHAY K., 1997.** Aplicación de nuevas técnicas para el seguimiento bacteriológico en un laboratorio de larvas de camarón. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Guayaquil-Ecuador. .
- **SOLIS A. , 1996.** Miniaturización y simplificación de pruebas bioquímicas de bacterias marinas asociadas al camarón. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Guayaquil-Ecuador,
- **TATSUO A., YUKIYO M., TAKU Y., IKURO K., YASUO I., MICHIO H. , 1996.** Effect of viscosity on swimming by the lateral and polar flagella of *Vibrio alginolyticus*. J. Bacteriol., 178: 5024-5026.



BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MARILLIA

# ANEXOS

## ANEXO I

Composición del Agar TCBS (Thiosulfate-citrate-bile-sucrose agar)

### AGAR TCBS BACTO (Deshidratado)

Ingredientes por litro

Extracto de levadura Bacto.....5 g.	Cloruro de sodio.....10g.
Proteosa de peptona.....10 g.	Citrato férrico.....1 g.
Citrato de sodio.....10 g.	Azul de bromo timol Bacto.....0,004 g.
Tiosulfato de sodio.....10 g.	Azul de timol Bacto.....0,004 g.
Bacto Ovgall.....8 g.	Bacto-Agar.....15 g.
Sacarosa Bacto.....20 g.	

pH final  $8,6 \pm 0,2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

## ANEXO II

Composición del Agar Marino Bacto 2216.



### AGAR MARINO BACTO 2216 (Deshidratado)

BIBLIOTECA  
I.A.C. INC.  
MANLIVIA

#### Ingredientes por litro

Peptona Bacto.....5 g.	Bromuro de potasio.....0,06 g.
Extracto de levadura Bacto.....1 g.	Cloruro de estroncio.....0,034 g.
Citrato férrico.....0,1 g.	Acido bórico.....0,022 g.
Cloruro de sodio.....19,45 g.	Silicato de sodio.....0,004 g.
Cloruro de magnesio.....8,8 g.	Fluoruro de sodio.....0,0024 g.
Sulfato de sodio.....3,24 g.	Nitrato de amonio.....0,0016 g.
Cloruro de calcio.....1,8 g.	Difosfato de sodio.....0,006 g.
Cloruro de potasio.....0,55 g.	Bacto-Agar.....15 g.
Bicarbonato de sodio.....0,16 g.	

pH final  $7,6 \pm 0,2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

### ANEXO III

Composición del Agar TSA

**TRYPTIC SOY AGAR Soybean-Casein Digest Agar Medium, USP**  
**(Deshidratado)**

Ingredientes por litro

Bacto tryptone.....15gr	Cloruro de sodio.....5gr
Digerido pancreatico de caseina	
Bacto Soytone.....5gr	Bacto Agar.....15gr
Digerido papaico de soya	

pH final  $7,3 \pm 0,2$  a  $25^{\circ}\text{C}$





BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MARILLAS

## ANEXO IV

Unidades formadoras de colonias por mililitro recuperadas por Agar en cada ensayo.

### Ensayo 1

Medio	<i>Vibrio alginolyticus</i>			<i>Vibrio vulnificus</i>			<i>Vibrio tubiashii</i>		
	R#1	R#2	R#3	R#1	R#2	R#3	R#1	R#2	R#3
Agar Marino	S*	S	S	4040	5440	4420	8100	6920	8240
AM-Mus25%-NaCl	S	S	S	6640	7040	5580	7680	7880	6500
AM-Mus50%-NaCl	2320	2120	1880	5900	6840	4000	7440	10760	9960
AM-Mus75%-NaCl	2040	2080	1980	5740	5420	6020	19920	13840	12360
AM-Mus100%-NaCl	2180	2720	2500	7040	6260	7440	7580	6080	C**
Mus-Agar-NaCl	3920	4420	3420	5140	4820	8000	8940	8180	7220

S\* crecimiento tipo extendido

C\*\* Contaminado

Ensayo 2

Medio	<i>Vibrio alginolyticus</i>				<i>Vibrio vulnificus</i>				<i>Vibrio tubiashi</i>			
	R#1	R#2	R#3	R#4	R#1	R#2	R#3	R#4	R#1	R#2	R#3	R#4
Agar Marino	S	S	S	S	45920	28520	24000	39600	29920	34640	25920	21680
AM-Mus25%-NaCl	S	S	S	S	41280	28640	30720	20800	29360	25280	38320	20560
AM-Mus50%-NaCl	S	S	S	S	41280	40400	33200	42080	15840	38640	24720	22480
AM-Mus75%-NaCl	24480	26080	34400	28720	35280	39920	39600	44000	23760	27280	24720	31600
AM-Mus100%-NaCl	31840	27440	32800	33360	26640	40640	58320	30400	20960	29680	31040	36480
Mus-Agar-NaCl	44320	52160	43120	36080	46000	48480	37040	36800	46560	34400	40480	41600

S\* crecimiento tipo extendido

Ensayo 3

Medio	<i>Vibrio alginolyticus</i>				<i>Vibrio vulnificus</i>				<i>Vibrio tubiashi</i>			
	R#1	R#2	R#3	R#4	R#1	R#2	R#3	R#4	R#1	R#2	R#3	R#4
Mus1-Agar-NaCl	14120	15560	16260	18580	43680	59120	40880	49840	42080	49840	39600	50240
Mus2-Agar-NaCl	17440	17520	27520	16480	36400	51120	62560	58240	44080	38320	46480	42720



ACADEMIC  
DEPARTMENT  
MARIKINA

Ensayo 8

Medio	<i>Vibrio alginolyticus</i>				<i>Vibrio vulnificus</i>				<i>Vibrio tubiashii</i>			
	R#1	R#2	R#3	R#4	R#1	R#2	R#3	R#4	R#1	R#2	R#3	R#4
Agar TCBS	21120	17920	21440	34400	19580	26280	34040	38640	17280	10760	12920	13400
TCBS-Mus25%	95720	89440	89280	101120	45840	46240	49360	78120	35200	10320	23680	19480
TCBS-Mus50%	80640	23720	51520	33600	51920	59360	C	49280	25760	6400	9240	23680
TCBS-Mus75%	49440	65600	14320	22560	16720	43800	20680	16080	1940	5020	2640	3420
TCBS-Mus100%	17520	12840	17040	27200	14880	18600	19480	22400	8880	8880	17120	8440
Mus-Agar-SS	I*	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I

I\* Incontables

Ensayo 9

Medio	<i>Vibrio alginolyticus</i>				<i>Vibrio vulnificus</i>				<i>Vibrio tubiashii</i>			
	R#1	R#2	R#3	R#4	R#1	R#2	R#3	R#4	R#1	R#2	R#3	R#4
Agar TCBS	1160	4040	3180	4200	3600	3000	3760	5440	0	0	0	0
TCBS-Mus 25%	2740	3620	1640	-	4800	5460	5240	6080	60	20	40	C**
TCBS-Mus25%-SS	4600	5500	4320	3240	6200	5060	6680	8200	C**	262	100	160

Ensayo 10

Tratamiento	<i>Pseudomonas spp.</i>				<i>Vibrio damsella</i>			
	R#1	R#2	R#3	R#4	R#1	R#2	R#3	R#4
Agar TCBS	20640	34320	29480	20360	50240	53440	42720	42560
TCBS-Mus25%-SS	46240	80320	64000	I	20320	14960	31120	7920

I\* Incontables