

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

Diseño de un protocolo para la evaluación *in vitro* de la
patogenicidad de bacterias aisladas de huayaípe

(Seriola rivoliana)

Proyecto Integrador

Previo la obtención del Título de:

INGENIERO ACUICOLA

Presentado por:

David Antonio Culqui García.

Guayaquil - Ecuador

Año: 2023



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

College of Maritime Engineering and Sea Science

“Design of a protocol for the *in vitro* evaluation of the pathogenicity of
bacteria isolated from huayaibe (*Seriola rivoliana*)”

CAPSTONE COURSE

A project submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree

of:

Aquaculture Engineer

By:

David Antonio Culqui García

GUAYAQUIL - ECUADOR

2023

Dedicatoria

El presente proyecto dedico a mi querido padre Ramón, mi ángel guardián, mi protector, quien siempre creyó en mí, me alentó a seguir siempre adelante y me inspiro a nunca renunciar a mis sueños, aunque ya no esté físicamente junto a mí, su espíritu de perseverancia, carácter y amor incondicional ha sido mi motor constante. Por ello, cada paso en mi vida lleva impreso su ejemplo y su legado.

A mi amada madre Edith, que con su rol de padre y madre me da su apoyo inexorable y sus palabras alentadoras han sido mi luz en las tormentas personales y académicas, siendo mi fuente de fortaleza.

A hermana Elizabeth, por sus risas, complicidad y ánimo incansable. Mi mascota Jazz, su lealtad incondicional y el afecto puro que me ofrece día a día, brindándome su compañía y felicidad desde que llego a mi vida.

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a mi valiente madre, por tener siempre el vigor para salir adelante sin importar los obstáculos por el apoyo financiero, el apoyo ilimitado e incondicional que siempre me has dado.

Mis más sinceros agradecimientos a mis tutores por permitirme ser parte de este proyecto.

A Jeimy, por su predisposición para ayudarme en este proceso colaborando en mis momentos de real incertidumbre. Su generosidad, compromiso y apoyo incondicional me demostraron el verdadero significado de la amistad.

A mis amigos/as de la universidad y compañeros del baloncesto, con quienes compartimos momentos, risas, derrotas y victorias. Vuestra amistad y energía positiva me dieron el equilibrio necesario tanto en la cancha como en mi tiempo en las aulas.

Declaración Expresa

Yo, Culqui Garcia David Antonio acuerdo y reconozco que la titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, información no divulgada y cualquier otro derecho o tipo de Propiedad Intelectual que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada durante el desarrollo de su trabajo de titulación, incluyendo cualquier derecho de participación de beneficios o de valor sobre titularidad de derechos, pertenecerán de forma total, perpetua, exclusiva e indivisible a LA ESPOL, sin limitación de ningún tipo. Se deja además expresa constancia de que lo aquí establecido constituye un “previo acuerdo”, así como de ser posible bajo la normativa vigente de transferencia o cesión a favor de la ESPOL de todo derecho o porcentaje de titularidad que pueda existir.

Sin perjuicio de lo anterior los alumnos firmantes de la presente declaración reciben en este acto una licencia de uso gratuita e intransferible de plazo indefinido para el uso no comercial de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada durante el desarrollo de su trabajo de titulación, sin perjuicio de lo cual deberán contar con una autorización previa expresa de la ESPOL para difundir públicamente el contenido de la investigación, desarrollo tecnológico o invención.

Así también autorizamos expresamente a que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra o invento, por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual.

Guayaquil, 8 septiembre del 2023.



David Culqui Garcia.

Evaluadores



JOSE JERRY LANDIVAR
ZAMBRANO

M.Sc. Jerry Landívar.
Profesor de Materia



WILFRIDO ERNESTO
ARGUELLO GUEVARA

Wilfrido Arguello, Ph.D.
Tutor de proyecto

Resumen

Seriola rivoliana, comúnmente conocido como huayaípe, es un pez marino potencial para la acuicultura. Se han realizado varios estudios acerca de su cultivo, partiendo desde la obtención de reproductores, la larvicultura y la producción de juveniles. Sin embargo, estudios enfocados en la respuesta inmune, el diagnóstico y prevención de enfermedades son escasos debido a la falta de un protocolo estandarizado para el aislamiento e identificación de patógenos. En base a un metaanálisis acerca de métodos y técnicas para el aislamiento, caracterización y evaluación de la patogenicidad de las bacterias, se logró diseñar un protocolo de evaluación de la patogenicidad de aislados bacterianos obtenidos de cultivos de huayaípe mediante pruebas *in vitro*. Este protocolo se desarrolló en el laboratorio de Bioactividad de CENAIM. Usando técnicas de aislamiento y caracterización se obtuvieron catorce aislados bacterianos los cuales fueron evaluados mediante pruebas *in vitro* como: prueba de halotolerancia, producción de biofilm, MIC y MBC, resistencia antibióticos, motilidad, prueba de hemólisis y prueba de letalidad con larvas de huayaípe donde se identificaron tres aislados bacterianos con alto potencial patogénico, los cuales requieren un estudio e investigación posterior. Estos hallazgos resaltan la importancia de seguir estudiando estos aislados bacterianos para comprender mejor la naturaleza y potencial impacto en la salud de los peces como el huayaípe.

Palabras Clave: huayaípe, protocolo, aislados bacterianos, *in vitro*.

Abstract

Seriola rivoliana, commonly known as huayaibe, is a potential marine fish for aquaculture. Several studies have been carried out on its cultivation, starting from obtaining reproducers, larviculture and the production of juveniles. However, studies focused on the immune response, diagnosis and prevention of diseases are scarce due to the lack of a standardized protocol for the isolation and identification of pathogens. Based on a meta-analysis about methods and techniques for the isolation, characterization, and pathogenicity evaluation of bacteria, it was possible to design a protocol for evaluating the pathogenicity of bacterial isolates obtained from huayaibe through *in vitro* tests. This protocol was developed in the CENAIM Bioactivity laboratory. Using isolation and characterization techniques, it was obtained fourteen bacterial isolates which were evaluated through *in vitro* tests such as: halotolerance test, biofilm production, MIC and MBC, antibiotic resistance, motility, hemolysis test and lethality test with huayaibe larvae where we identified three bacterial isolates with high pathogenic potential which require continuous and more detailed study and research. These findings highlight the importance of continuing to study these bacterial isolates to better understand the nature and potential impact on the health of fish like the huayaibe.

Keywords: *huayaibe, protocol, bacterial isolates, in vitro.*

Índice general

Evaluadores.....	IV
Resumen.....	V
Abstract.....	VI
Abreviaturas.....	IX
Simbología.....	X
Índice de figuras (utilizar mismo tipo de letras).....	XI
Índice de tablas.....	XIII
Capítulo 1.....	1
1. Introducción.....	1
1.2 Descripción del problema.....	2
1.3 Justificación del problema.....	3
1.4 Objetivos.....	3
1.4.1 Objetivo general.....	3
1.4.2 Objetivos específicos.....	4
1.5 Marco teórico.....	4
1.5.1 Huayaípe (<i>Seriola rivoliana</i>).....	4
1.5.2 Estado de cultivo.....	5
1.5.3 Problemas sanitarios comunes del género <i>Seriola</i>	5
1.5.4 Estrategias para la optimización del cultivo de peces.....	6
1.5.5 Uso de bacterias patógenas.....	6
1.5.6 Métodos de evaluación de la patogenicidad.....	7
1.5.7 Halotolerancia.....	7
Capítulo 2.....	12
2. Metodología.....	12
2.1 Objetivo 1: Aislamiento de bacterias.....	12
2.1.1 Obtención de muestras.....	12
2.1.2 Aislamiento y purificación de los aislados.....	12
2.2 Objetivo 2: Caracterización de los aislados.....	13
2.2.1 Morfotipo de la colonia y morfología celular.....	13
2.2.2 Cultivos de aislados bacterianos.....	13
2.2.3 Pruebas bioquímicas.....	13
2.2.4 Crecimiento bacteriano.....	14
2.3 Objetivo 3: Evaluación de potencial patogénico.....	14
2.3.1 Pruebas de halotolerancia.....	14
2.3.2 Resistencia a Antibióticos (Antibiograma).....	14

2.3.3 MIC y MBC.....	15
2.3.4 Producción de biofilm.....	15
2.3.5 Prueba de motilidad.....	16
2.3.6 Prueba de hemólisis.....	16
2.3.7 Prueba de letalidad.....	16
2.3.8 Análisis estadístico.....	17
Capítulo 3.....	18
3.1 Resultados y análisis.....	18
3.2 Objetivo 1. Aislamiento.....	18
3.3 Objetivo 2. Caracterización.....	19
3.3.1 Caracterización de los aislados bacterianos.....	20
3.3.2 Caracterización y Crecimiento de los aislados bacterianos.....	22
3.3.3 Resultados de pruebas bioquímicas.....	22
3.4 Objetivo 3. Patogenicidad.....	23
3.4.1 Halotolerancia de los aislados bacterianos.....	23
3.4.2 Resultados de la resistencia a antibióticos.....	24
3.4.3 Resultados de prueba de biofilm.....	26
3.4.4 Resultados de prueba de biofilm.....	26
3.4.5 Resultados motilidad de los aislados bacterianos.....	27
3.4.6 Resultados actividad hemolítica.....	28
3.4.7 Prueba de letalidad.....	30
3.5 resumen de resultados de los tres objetivos del protocolo.....	31
3.5 Protocolo para la evaluación in vitro de la patogenicidad de bacterias aisladas de huayaipa (<i>Seriola rivoliana</i>).....	32
3.7 Costos.....	33
Capítulo 4.....	35
4.1 Conclusiones y recomendaciones.....	35
4.1.1 Conclusiones.....	35
4.1.2 Recomendaciones.....	36
Referencias.....	37

Abreviaturas

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
CENAIM	Centro Nacional de Investigaciones Acuícolas y Marinas.
TSA	Agar tripticasa soya
TCBS	Agar tiosulfato citrato bilis sacarosa
GSP	Agar Selectivo de Pseudomonas y Aeromonas
AM	Agar Marino
LB	Caldo Luria Bertani
TSB	Caldo Soya Trypticaseína
PBS	Tampón fosfato salino

Simbología

UFC Unidad formadora de colonia.

uL microlitro

mL mililitro

mm milímetro

mg miligramos

cm centímetros

g gramos

nm nanómetro

ppm parte por millón

°C grados Celsius

rpm revoluciones por minuto

D.O. densidad óptica

Índice de figuras (utilizar mismo tipo de letras)

Figura 1, Caracterización de los aislados bacterianos en base al morfotipo de las colonias en placas Petri.....	20
Figura 2, Caracterización de los aislados bacterianos en base al morfotipo de las colonias en placas Petri.....	20
Figura 3, Caracterización de los aislados bacterianos en base a la morfología de las colonias vistas en microscopio óptico a 40x.	21
Figura 4, Caracterización de los aislados bacterianos en base a la morfología de las colonias vistas en microscopio óptico a 40x.	21
Figura 5, Resultado del crecimiento de los aislados bacterianos.	22
Figura 6, Crecimiento de los aislados bacterianos a diferentes concentraciones de salinidad al 0%, 0.5%, 1%, 2%, 3% y 4%.....	24
Figura 7, Crecimiento de los aislados bacterianos a diferentes concentraciones de salinidad al 5%, 6%, 7%, 8%, 9% y 10%.....	24
Figura 8, Inhibición de los 14 aislados bacterianos a cinco concentraciones de Oxitetraciclina (Oxiacua, 98% de pureza): 0, 100, 500, 1000 y 2000 ppm. Los resultados de inhibición de los aislado a Oxitetraciclina se muestran a través del tamaño del halo de inhibición.....	25
Figura 9, Inhibición de los 14 aislados bacterianos a cinco concentraciones de Florfenicol (Greenfenicol, 15% de pureza): 0, 50, 100,300 y 500 ppm. Los resultados de inhibición de los aislado a Florfenicol se muestran a través del tamaño del halo de inhibición.	25
Figura 10, Crecimiento de los aislados bacterianos después 24 horas. Los resultados de esta prueba de motilidad se expresan con los valores medios y desviación estándar (media \pm SD).....	28

Figura 11, Resultados de prueba de hemólisis de cada uno de los aislados bacterianos después de 48 horas de incubación.....	29
Figura 12, Supervivencia 24 horas post infección de larvas de huayaipe. Resultados se muestra el efecto de los aislados bacterianos sobre la supervivencia de larvas de huayaipe con revisiones cada 4 horas.	31

Índice de tablas

Tabla 1, Aislados bacterianos seleccionados para la evaluación de la patogenicidad. Los aislados se seleccionaron en base a su morfología celular y el morfotipo de cada colonia en medio TSA, los resultados se expresan con signos (+) para los aislados que tuvieron buen crecimiento, (-) para los aislados que no crecieron en los medios de cultivo y (±) representa un bajo crecimiento. Fuente: Autor.....	19
Tabla 2, Resultado pruebas bioquímicas después de 48 horas de experimentación, los resultados se presentan con (+) para los aislados con reacción positivos y (-) para los aislados con reacción negativa.	23
Tabla 3, MBC para los aislados resistentes al tratamiento con Oxitetraciclina, resultados muestran la concentración del antibiótico en ppm.	26
Tabla 4, MBC para los aislados resistentes al tratamiento con Oxitetraciclina, resultados muestran la concentración del antibiótico en ppm.	26
Tabla 5, Producción de biofilm de los 14 aislados bacterianos. Estos resultados son expresados con los valores medios y desviación estándar (absorbancia ± DS). Las diferentes letras indican diferencias significativas entre cada aislado por medio de la prueba Tukey (P< 0,05).....	27
Tabla 6, Resultados de la motilidad de los aislados bacterianos en placas con medio LB y TSB después de 24 horas, la motilidad de las bacterias en las placas se las midió en centímetros. Los resultados de esta prueba se expresan con los valores medios y desviación estándar (media ± SD).	28
Tabla 7, Resultados de la prueba de hemólisis de los aislados bacterianos después de 48 horas, resultados se expresan con signos α para los aislados no hemolíticos y β para los aislados con actividad hemolítica.	29
Tabla 8, Resumen de los resultados de los tres objetivos del protocolo	31

Tabla 9, Protocolo para la evaluación <i>in vitro</i> de la patogenicidad de bacterias aisladas de huayaipe (<i>Seriola rivoliana</i>).....	32
Tabla 10, Lista de materiales de laboratorio que fueron empleados en el desarrollo del proyecto.	33

Capítulo 1

1. Introducción

La acuicultura a nivel mundial se ha convertido en una actividad productiva de gran relevancia, puesto que ha tenido un rápido crecimiento, cuya importancia radica en su aportación a la producción pesquera mundial y al incremento en la demanda de los productos acuícolas, en parte, por el crecimiento de la población mundial y el cambio de hábitos alimenticios al considerar las carnes blancas como más sanas y nutritivas (Beltrán Meza, 2017). Ecuador se ubica en una posición privilegiada en términos oceanográficos, y sus casi mil kilómetros de costa cuentan con una rica plataforma marina con abundantes recursos pesqueros (Aquahoy, 2019). El sector acuícola del Ecuador se concentra en la producción de camarón (*Penaeus vannamei*). Para el 2021, el Ecuador fue el segundo mayor productor acuícola en América, con un área de producción de camarón de aproximadamente 250.000 hectáreas y una producción de 940.000 toneladas (Zhao, 2022). El continuo crecimiento de este sector requiere de una serie de esfuerzos que deben estar direccionados en la optimización de los sistemas de producción, el control de enfermedades, la mejora genética y la diversificación acuícola. Entre ellos, la diversificación acuícola es una alternativa que ofrece numerosos beneficios significativos para la industria y el medio ambiente. La diversificación de las especies y una distribución más equitativa de la producción, podrían brindar resiliencia frente a un clima cambiante y otros factores externos y agregar un seguro económico, social y ecológico a los sistemas acuícolas (FAO , 2017)

Algunas de las especies potenciales para la diversificación acuícola en el Ecuador son: lenguado (*Paralichthys woolmano*), robalo (*Centropomus nigrescens*), huayaipe (*Seriola rivoliana*), pámpano (varias especies del género *Trachinotus*), pargo (especies del género *Lutjanus*), chame (*Dormitator latifrons*) y otras especies de moluscos (Blacio , 2002).

El huayaibe al ser una especie relativamente nueva para la producción acuícola, aun cuenta con una serie de desafíos y cuellos de botella en su producción. Uno de los desafíos es el diagnóstico y prevención de enfermedades, pues como toda especie en confinamiento presenta problemas sanitarios (Symonds et al, 2014), causados por diversos agentes patógenos (Hutson et al, 2007). La correcta detección e identificación de los agentes patógenos es crucial para abordar las enfermedades y desarrollar tecnologías de prevención, por ello, el objetivo de este trabajo es determinar un protocolo de evaluación rápida de la patogenicidad de bacterias provenientes de peces enfermos con la finalidad de identificarlas. Gracias a ello, futuros estudios podrían estandarizar un protocolo de infección y desarrollar alternativas de control y prevención de las enfermedades.

1.2 Descripción del problema

Seriola rivoliana, comúnmente conocido como huayaibe, es un pez marino potencial para la acuicultura por su demanda comercial, adaptabilidad al cautiverio, rápido crecimiento y calidad de carne. En el Ecuador, es considerada una alternativa para la diversificación acuícola. El Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) ha realizado varias pruebas y estudios sobre su cultivo, partiendo desde la obtención de reproductores, larvicultura y producción de juveniles. Sin embargo, estudios enfocados en la respuesta inmune, el diagnóstico y prevención de enfermedades son escasos. La falta de un protocolo estandarizado para el aislamiento e identificación de patógenos limita el avance de la producción y la capacidad de los productores e investigadores para estudiar y entender la patogénesis de las enfermedades y la respuesta inmune del hospedero.

El correcto diagnóstico de enfermedades permite identificar el agente causal y aplicar acciones preventivas y curativas para reducir los efectos negativos sobre el cultivo. El proceso de identificación del agente causal requiere de métodos de cultivo microbiano

hasta la obtención del aislado patogénico, el cual más adelante debe ser identificado por métodos bioquímicos o moleculares. Los aislados patogénicos son empleados en los desafíos patogénicos a nivel de laboratorio (bajo condiciones controladas). Estos permiten desarrollar investigación en torno a los efectos de la enfermedad en el huésped, tanto a nivel productivo como fisiológico e inmunológico. Además, son una importante herramienta para caracterizar la enfermedad y evaluar la resistencia genética, eficacia de los tratamientos, bioseguridad y la respuesta inmune de los peces.

1.3 Justificación del problema

La falta de cepas patógenas que afectan al huayaipe reduce la capacidad de realizar estudios entorno a la mejora de la producción y prevención y control de enfermedades en su cultivo. Por lo que, en conjunto con el Laboratorio de Bioactividad y el Laboratorio de Piscicultura del CENAIM se buscó establecer un protocolo para el aislamiento e identificación de patógenos de huayaipe con el objetivo de realizar estudios que incluyan desafíos patogénicos. Entre estos estudios, la evaluación del uso de aditivos, probióticos, inmunoestimulantes y otros suplementos sobre la respuesta inmune y parámetros productivos del huayaipe.

Este trabajo establece un protocolo rápido de identificación de patógenos y a su vez, aisló potenciales patógenos de huayaipe que podrían ser empleados en futuros desafíos patogénicos.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Diseñar un protocolo de evaluación de la patogenicidad de aislados bacterianos obtenidos de huayaipe (*Seriola rivoliana*) mediante pruebas *in vitro* para su posterior identificación y aplicación en la estandarización de protocolos de desafíos patogénicos.

1.4.2 Objetivos específicos

- Aislar bacterias de ejemplares de huayaipe con signos de enfermedad mediante técnicas microbiológicas para la evaluación de su patogenicidad.
- Caracterizar los aislados bacterianos obtenidos bajo condiciones de laboratorio.
- Evaluar el potencial patogénico de los aislados mediante pruebas *in vitro*.
- Diseñar/esquematar un protocolo de desafío basado en los resultados obtenidos.

1.5 Marco teórico

1.5.1 Huayaipe (*Seriola rivoliana*).

El huayaipe se caracteriza por ser un pez pelágico y epibentónico marino (Smith-Vaniz et al, 1995), que se encuentra en aguas abiertas cerca de la superficie. Se lo encuentra comúnmente en aguas con temperaturas entre 18 y 29°C, a profundidades cercanas a 50 m. Sin embargo, pueden ser encontrados en profundidades superiores a 300 m (FishBase, 2004). La especie *Seriola rivoliana* se encuentra distribuida a lo largo de las zonas subtropicales de los océanos Índico, Pacífico oeste y, Atlántico oeste (Espinoza et al, 2009) En Ecuador lo podemos localizar en toda la zona costera e Islas Galápagos (Chirichigno & Martin, 2001).

El huayaipe se caracteriza por ser un pez fusiforme medianamente comprimido lateralmente, tiene una cabeza fuerte con un perfil dorsal curvado y hocico de forma redondeada. La boca es grande con dientes pequeños, numerosos y dispuestos en bandas tanto en las mandíbulas como en los palatinos, vómer y lengua. Su cuerpo es robusto, alargado. Posee pequeñas escamas, en el cuerpo, remarcándose a lo largo de su línea lateral. Llega a medir los 2 m de longitud y a pesar más de los 50 kg. El color es aceituno

en el dorso, los flancos son más claros, y el vientre es blanquecino plateado. Los huevos son pelágicos, transparentes, esféricos y de 1,1 mm. La eclosión ocurre luego de veinticinco horas aproximadamente (Blacio et al , 2003)

1.5.2 Estado de cultivo

El cultivo de engorda del huayaipe es llevado (Argüello-Guevara, y otros, 2020) a cabo en jaulas flotantes, en países como Japón, Australia, Estados Unidos (Montoya, 2019) y Panamá. Estos países están ubicados en la región tropical y subtropical del planeta por lo que cuentan con condiciones ambientales favorables para la acuicultura de esta especie, lo que ha contribuido a su producción y comercialización a nivel global.

Actualmente, en el Ecuador se realizan numerosos estudios en las diferentes etapas de desarrollo para alcanzar una producción controlada de esta especie (Argüello-Guevara et al, 2020).

1.5.3 Problemas sanitarios comunes del género *Seriola*

Debido a la rápida expansión de la maricultura intensiva y el consiguiente deterioro de las condiciones de cultivo, la vibriosis, la enfermedad causada por una bacteria del género *Vibrio*, ocurre con frecuencia en todo el mundo, y afecta a un gran número de especies de peces entre ellos especies del género *Seriola* (Jun & Woo, 2003).

Por otro lado, *Heteraxine spp.* es un parásito que se adhiere a las branquias de los peces causándoles anemia lo cual puede matar a los peces (Avilés-Quevedo et al, 2004). La amiloodiniosis, es causada por el dinoflagelado *Amyloodinium ocellatum*, considerado el parásito que inflige el daño más considerable a las empresas comerciales de peces marinos (Vivanco-Aranda et al, 2018).

Además de las bacterias y parásitos mencionados, existen otras especies que han surgido como importantes agentes que afecta la salud de los peces y tienen un alto potencial

patogénico en el cultivo de *Seriola*, entre ellas están: *Nocardia seriolae*, *Mycobacterium marinum*, *Tenacibaculum maritimus*, *Chlamydial epitheliocystis* y *Pseudomonas spp.* (Sheppard, 2005).

1.5.4 Estrategias para la optimización del cultivo de peces.

Cuando se trata de especies marinas provenientes de condiciones pelágicas, la infraestructura, el control de los parámetros ambientales (Pérez et al, 2016), la nutrición y control de enfermedades son tópicos importantes para potenciar la producción. La investigación y tecnificación de los cultivos marinos nos han llevado a entender que una alimentación óptima, reforzada con aditivos potenciadores, es la mejor manera de contribuir a la integridad intestinal, a un mayor aprovechamiento del alimento y a la mejora de la calidad del agua, traduciéndose en general en organismos más sanos y entornos más limpios, todo esto sin la necesidad de antibióticos. Algunos de los aditivos más utilizados y estudiados son los probióticos, prebióticos, ácidos orgánicos, fotogénicos y enzimas (Proaqua, 2020).

1.5.5 Uso de bacterias patógenas.

Los peces tanto silvestres como de cultivo se protegen de los patógenos microbianos principalmente con la ayuda de la inmunidad innata o no específica (Zhang, Kong, Zhou, & Li, 2014). Sin embargo, bajo condiciones de cultivo no idóneas, los peces pueden estar más propensos a infecciones bacterianas oportunistas que amenazan con la supervivencia (García et al., 2021)

Por ello, ante la presencia de enfermedades en un centro acuícola, es importante diagnosticar correctamente la enfermedad, partiendo de la inspección visual de los signos de la enfermedad y obteniendo muestras de los tejidos lesionados por las infecciones para el aislamiento e identificación del agente causal de estas anomalías (Hutson et al., 2007).

Si el agente causal recae sobre el grupo de las bacterias, varios estudios *in vitro* pueden desarrollarse para identificar los posibles tratamientos de la enfermedad, o a su vez, estudios *in vivo*, los cuales son más acertados y consisten en la infección controlada de un grupo de peces para determinar métodos de prevención y control de la enfermedad (Campalans et al., 2002)

Generalmente los métodos de infección se realizan con una bacteria en crecimiento, la cual se inocula directamente por inmersión de los organismos por periodos determinados (Robertson & Calderón, 1998). Por otro lado, los microorganismos de infección se pueden inocular por inyección en el área intraperitoneal o se pueden adicionar a la dieta para reducir el periodo de incubación (Pacheco et al, 2017).

1.5.6 Métodos de evaluación de la patogenicidad.

La patogenicidad microbiana se ha definido como el mecanismo bioquímico por medio del cuales los microorganismos causan enfermedad y, por otra parte, la virulencia se entiende como el grado en el que se expresa la patogenicidad (Molina Lopez et al., 1998). Existen varios métodos que se pueden utilizar para evaluar la patogenicidad *in vitro* de las bacterias, entre ellos:

1.5.7 Halotolerancia.

La halotolerancia es la capacidad de un organismo para tolerar condiciones ambientales salinas o hipersalinas en donde puede sobrevivir y desarrollarse normalmente, dependiendo de los factores nutricionales y el medio en que se encuentra. (DasSarma & Aurora, 2015). Los organismos halotolerantes han desarrollado mecanismos adaptativos para sobrevivir en condiciones de alta salinidad, como la acumulación de solutos compatibles y la regulación de la presión osmótica. Estos mecanismos les permiten mantener el equilibrio hídrico y proteger las estructuras celulares vitales en presencia de altas concentraciones de sal (Ventosa, 2006). Esta cualidad tiene la capacidad de influir

para causar una enfermedad. Si un patógeno es halotolerante significa que este puede sobrevivir en hábitats con salinidades elevadas, de igual manera la halotolerancia puede ser un factor para debilitar las funciones del patógeno disminuyendo las probabilidades de infectar y causar una enfermedad (Melo, 2020).

1.5.8 Resistencia a antibióticos.

Las pruebas de resistencia para antibióticos se usan para determinar la susceptibilidad de un patógeno a los antibióticos u otros agentes antimicrobianos con el fin de elegir tratamientos adecuados y evitar la propagación de la cepa resistente. Los microorganismos resistentes a antimicrobianos se conocen como ultrarresistentes, el uso incorrecto de antibióticos puede causar resistencia a bacterias patógenas disminuyendo las opciones de tratamiento. (Vazquez, 2022)

El antibiograma mide la sensibilidad de una bacteria frente a diferentes antimicrobianos *in vitro* y a partir de estos resultados predice la eficacia *in vivo*. Con un antibiograma se pueden obtener resultados cualitativos que indican si la bacteria es sensible o resistente a un antibiótico, o cuantitativos que determinan la concentración mínima (MIC) de antimicrobiano que inhibe el crecimiento bacteriano (en $\mu\text{g}/\text{mL}$ o en mg/L) (Cercenado et al., 2009).

El método de difusión en disco más comúnmente usado (también conocido como prueba de Kirby-Bauer) es adecuado para los microorganismos de crecimiento rápido. Se basa en la colocación de discos impregnados con antibióticos en placas de agar inoculadas con el microorganismo que está probándose. Después de la incubación (por lo general de 16 a 18 h), se mide el diámetro de la zona de inhibición que rodea a cada disco (Vazquez-Pertejo, 2022).

1.5.9 Pruebas Bioquímicas.

Se relacionan con la capacidad de los microorganismos patogénicos para producir enzimas y metabolizar sustratos, permitiendo usar las pruebas químicas para identificar las especies bacterianas con el fin de evaluar su potencial patogénico. (Senasica, 2020). Las pruebas bioquímicas han sido ampliamente utilizadas para diferenciar bacterias. Estas pruebas se fundamentan en demostrar si el microorganismo es capaz de fermentar azúcares, la presencia de enzimas, la degradación de compuestos, la producción de compuestos coloreados, etc. Se han diseñado formas para realizar varias pruebas bioquímicas simultáneamente y permitir la identificación en un tiempo más corto. Para la realización de esta prueba consta de microtubos que contienen un medio que se hidrata mediante inoculación con una suspensión bacteriana pura. Las pruebas se dividen en grupos donde a cada resultado positivo se le asigna un valor numérico, obteniéndose un código que corresponderá a un determinado género o especie (Vizcarrondo et al., 2002).

1.5.10 Producción de biofilm

Los biofilm se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo (Lasa, 2005). La producción de biofilm permite que las bacterias sean más resistentes a los antibióticos y al sistema inmunológico del huésped, lo que puede aumentar su potencial patogénico y la capacidad de provocar infecciones crónicas. Se pueden realizar diferentes pruebas para evaluar la formación de biofilm, como la tinción de cristal violeta y la microscopía confocal (Flemming & Wingender, 2010)

1.5.11 Prueba de hemólisis.

Las pruebas de hemólisis evalúan la capacidad de una bacteria para degradar los glóbulos rojos presentes en un medio de cultivo sólido que contiene sangre. Los resultados se

clasifican en tres categorías principales: alfa-hemólisis (degradación parcial), beta-hemólisis (degradación completa) y gamma-hemólisis (sin degradación). Estas pruebas son útiles para identificar especies de bacterias y para evaluar la virulencia potencial de microorganismos patógenos (Christensen & Simpson, 1982)

1.5.12 Motilidad

La motilidad es la capacidad que tiene la bacteria de desplazarse aleatoriamente de un lugar a otro por medio del flagelo. Los flagelos son apéndices largos los cuales se encuentran fijos a la célula por uno de sus extremos y libres por el otro. El filamento del flagelo bacteriano está compuesto de subunidades de una proteína denominada flagelina y constituyen el principal medio de motilidad (Cárdenas-Perea et al., 2014). Esta característica permite a las bacterias moverse dentro del huésped para causar una enfermedad. La motilidad es una particularidad que invade y coloniza, afectando y propagando a un patógeno en un organismo sano; puede variar de acuerdo con el tipo de patógeno ya que no depende de la motilidad para infectar (Kaiser, 2022).

Para realizar esta prueba el método de agar semisólido es útil para detectar la motilidad bacteriana. Permite el aislamiento de cepas móviles e inmóviles de algunos cultivos que eran inmóviles con la técnica de gota colgante (Tittsler & Sandholzer, 1936)

1.5.13 Prueba de letalidad.

Usadas para determinar la concentración de cierta sustancia o patógeno que provoca la muerte en un individuo vivo, como un animal de laboratorio. Para esto se administran diferentes dosis del agente infeccioso a cierto grupo de animales a monitorear para luego hacerle un seguimiento y conocer las dosis y efectos que producen la muerte (Ángeles Espino et al., 2013). En las pruebas de letalidad se valora el potencial de cierto patógeno de matar organismos con relación al tiempo, así mismo puede determinar la frecuencia

con la que se presenta una resistencia a los antibióticos, la fluidez con la que se transmite y además si la infección puede prevenirse (Organización Panamericana de la Salud, 2021).

Capítulo 2

2. Metodología.

2.1 Objetivo 1: Aislamiento de bacterias.

2.1.1 Obtención de muestras

Se recolectaron un total de 17 juveniles de huayaípe con un peso promedio de $36,14 \pm 5,03$ g del CENAIM. Los peces mostraban signos de enfermedad como enrojecimiento en boca y aletas, letargo, nado errático y mortalidad por goteo. Los peces fueron muestreados en mayo de 2023. Para la toma de muestras de tejido cutáneo los juveniles fueron sacrificados con una sobredosis de anestesia por inmersión, en una solución que contenía 50 ppm de eugenol (Eufar S.A). Con un bisturí se extrajo el tejido del pez en condiciones estériles y se colocó en tubos estériles de 1,5 mL.

2.1.2 Aislamiento y purificación de los aislados.

Las muestras tomadas fueron homogenizadas con un micropistilo en 10 volúmenes de solución estéril tamponada con fosfato (PBS). Se sembró 100 μ L de cada dilución por duplicado en 3 diferentes medios de cultivo, agar selectivo para pseudomonas-aeromonas (GSP) con 1,5% y 0,5% de NaCl, agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) con 2% NaCl y agar marino (AM). Las placas se incubaron a 30°C durante 48 horas y todas las colonias con diferente morfología se purificaron transfiriéndolas a una nueva placa. Se confirmó que cada colonia aislada y purificada era una bacteria en base a su morfología celular, la cual fue verificada en un microscopio óptico. Posteriormente, todos los aislados fueron transferidos a un medio TSA (Trypticase Soya Agar) (2% NaCl) e incubadas por 12 horas. A su vez, cada aislado se suspendió en caldo LB (Luria Bertani LB) con glicerol al 15% como agente crioconservante y se almacenó a -80°C para su posterior análisis.

2.2 Objetivo 2: Caracterización de los aislados.

2.2.1 Morfotipo de la colonia y morfología celular

Para determinar el morfotipo de las colonias se tomaron fotografías de las placas TSA de cada asilado bacteriano después de 24 horas de cultivo a 30°C. Se consideraron características como: tamaño, color, tipo de borde, elevación y textura. Por otro lado, la morfología celular de los aislados bacterianos se la determinó tomando una muestra de un cultivo joven de cada aislado de las placas TSA, luego colocado en una placa portaobjeto y puesta a un microscopio óptico para su observación.

2.2.2 Cultivos de aislados bacterianos.

Los aislados se activaron luego de la congelación a -80°C en placas de TSA (2% NaCl) y se cultivaron por 24 horas a 30°C. Luego, una colonia de cada placa fue transferida a tubos de vidrio con caldo LB (2% NaCl) o TSB (Soya Trypticaseína) (2% NaCl) (según el medio en el que mostraban mayor crecimiento), y cultivada por 12 horas a 30°C con agitación continua a 120 rpm. posteriormente, se sembraron en un nuevo tubo con caldo por 7 horas con agitación continua a 120 rpm a 30°C.

2.2.3 Pruebas bioquímicas.

Para determinar la capacidad bioquímica de cada aislado bacteriano se realizaron 16 pruebas bioquímicas: OF(Oxidación-Fermentación), OF+(oxidación-Fermentación+), VP(Voges-Proskauer), Indol, Citrato, Ornitina, Arginina, Lisina, Arabinosa, Celobiosa, Mannosa, Manitol, Sucrosa, Gluconato, Glucoronato y Galactosa. Para ello se dispensaron 180 µL de cada medio específico en tubos de 500 µL y se inocularon 20 µL de cultivo bacteriano en LB ajustado a aproximadamente 1×10^5 UFC/mL, por duplicado. Estos tubos se incubaron a 30°C y se observaron los resultados de la reacción a las 24 y 48 horas. La interpretación de los resultados se basó en un método colorimétrico y se describieron como reacción positiva (+), media (±) y negativa (-).

2.2.4 Crecimiento bacteriano.

Mediante densidad óptica (DO) se observó el patrón de crecimiento de cada aislado durante 24 horas. Para ello se inocularon 20µL de cada aislado bacteriano (7 horas de cultivo) en micropocillos con 180µL de caldo LB o TSB por triplicado, a una concentración inicial aproximada de 1×10^5 UFC/mL, y se incubó a 30°C. Cada 6 horas se realizaron las lecturas de absorbancia a 600 nm en un lector de microplacas (Varioskan Lux, Thermo Scient), hasta las 24 horas.

2.3 Objetivo 3: Evaluación de potencial patogénico

2.3.1 Pruebas de halotolerancia.

Esta prueba nos permitió evaluar la capacidad de los microorganismos para crecer y sobrevivir en condiciones diferentes concentraciones de salinidad. Para ello, los aislados bacterianos fueron cultivados en una gradiente de salinidad del 0 al 10%. En micropocillos, se inocularon 20 µL de cada aislado bacteriano (7 horas de cultivo) en 160 µL de agua y 20 µL en caldo LB por triplicado, a una concentración inicial aproximada de 1×10^5 UFC/mL, y se incubó a 30°C. A las 18 horas se realizaron las lecturas de absorbancia a 600nm en un lector de microplacas (Varioskan Lux, Thermo Scient).

2.3.2 Resistencia a Antibióticos (Antibiograma).

Para realizar el antibiograma se sembraron 100 µL de cada aislado bacteriano (7 horas de cultivo y ajustado a aproximadamente 1×10^5 UFC/mL) sobre toda la superficie de las placas de TSA con la ayuda de un hisopo. Cada aislado se sembró por duplicado y fue evaluado para dos antibióticos, Florfenicol (Greenfenicol, 15% de pureza) y Oxitetraciclina (Oxiacua, 98% de pureza), los únicos antibióticos permitidos para su uso en acuicultura. Se colocaron 5 sensidiscos en cada placa, para oxitetraciclina se colocaron 4 discos con: 250, 500 1000, 2000 ppm cada uno y para florfenicol se colocaron 4 discos con: 50, 100, 300, 500 ppm cada uno, en todas las placas se incluyó un disco control sin

antibiótico en el centro. Las placas fueron incubadas a 30°C por 18 horas, los halos de inhibición fueron medidos en cm.

2.3.3 MIC y MBC.

Se determinó la mínima concentración inhibitoria (MIC) de los aislados que mostraron halos de inhibición menores a 2,5 mm. Para ello se inocularon 20 μL de cultivo bacteriano (7 horas de cultivo y ajustado a aproximadamente 1×10^5 UFC/mL) en 180 μL de solución salina con un gradiente de antibiótico en una placa de 96 pocillos. Para cada aislado se evaluaron doce concentraciones de antibiótico por triplicado más un control positivo (solo medio LB e inóculo) y negativo (Medio LB, solución salina y sin inóculo). Esto se incubó a 30°C y se realizaron mediciones de absorbancia a 600 nm cada 6 horas durante 24 horas. Para determinar la mínima concentración bactericida (MBC) se inocularon 100 μL de medio obtenido de pocillos donde no hubo crecimiento (en base a la absorbancia) y cercano al que sí obtuvo crecimiento en placas de TSA por 24 horas a 30°C. La MBC fue considerada aquella en donde se observó un crecimiento de menos de 3 colonias.

2.3.4 Producción de biofilm.

Para determinar la producción de biofilm de cada aislado, se inocularon 20 μL del cultivo de cada aislado bacteriano (7 horas de cultivo y ajustado a aproximadamente 1×10^5 UFC/mL) en los pocillos de una placa estéril de 96 pocillos que contenía 180 μL de caldo LB o TSB (según la afinidad de cada aislado). Después de 72 horas de incubación a 30°C, se retiró el medio con micropipeta y se secó la microplaca durante 1 hora a 45°C. A continuación, las biopelículas de los pocillos se tiñeron con 200 μL de cristal violeta (0,1%) durante 15 minutos, se lavaron con abundante agua, se dejó secar al ambiente por 1 hora y el colorante insolubilizado se solubilizó mediante la adición de 200 μL de etanol y se homogeneizó. El etanol con colorante fue transferido a una nueva microplaca para

medir la absorbancia a 600 nm con un lector de microplacas (Varioskan LUX, Thermo Scientific).

2.3.5 Prueba de motilidad.

Para determinar la motilidad de cada aislado se sembraron 5 μ L de cultivo bacteriano (LB ajustado a aproximadamente 1×10^5 UFC/mL) en el centro de placas de LB y TSB con el 1% de agar. El diámetro del área de crecimiento fue medida en mm a las 24 horas.

2.3.6 Prueba de hemólisis.

La actividad hemolítica de los aislados bacterianos se probó utilizando base de agar sangre suplementado con un 5% de sangre de tilapia (*Oreochromis* sp.). Para la obtención de sangre de tilapia se sedaron 5 adultos de tilapia sanos con 25 ppm de eugenol y de cada uno se extrajo 2 mL. La sangre se desfibrinó mediante agitación constante en un matraz con perlas de vidrio (500 μ L) durante 10 minutos. Cada aislado bacteriano se inoculó con asa de platino en el agar sangre durante 48 horas y se observó la actividad hemolítica. Los aislados que produjeron hemólisis α o β se consideran hemolíticos y hemólisis γ se consideraron no hemolíticos.

2.3.7 Prueba de letalidad.

Para desarrollar la prueba de letalidad se distribuyeron 20 larvas de huayaipe de 1 día post eclosión (dpe) en bandejas transparentes con 200 mL de agua de mar estéril para cada aislado y un control (sin inóculo) por triplicado. Cada aislado se inoculó a una concentración de 1×10^4 UFC. Para ello, se usó un cultivo de 7 horas ajustado a aproximadamente 1×10^7 UFC, se realizó una dilución seriada en solución salina (1×10^6 UFC) y se inocularon 2 mL de cada aislado en 200 mL de agua de mar. Luego de la inoculación se monitoreó la mortalidad cada 4 horas hasta las 48 horas post infección.

2.3.8 Análisis estadístico.

El análisis estadístico se ejecutó en el software R STUDIO, los valores se evidenciaron como media \pm desviación estándar (DS). Con los resultados conseguidos a través de las pruebas de Shapiro-Wilk y de Bartlett se corroboró la normalidad y homogeneidad de las varianzas entre los tratamientos. Además, se realizó ANOVA de una vía y el análisis de comparación múltiple de Tukey para establecer diferencias significativas en casos donde se vieron diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Capítulo 3

3.1 Resultados y análisis.

En el presente estudio, se seleccionaron aislados bacterianos con potencial patogénico a través de una serie de pruebas *in vitro*. Esta selección se realizó en 3 fases: aislamiento, caracterización y evaluación de potencial patogénico. El proceso empezó con 48 aislados bacterianos tomados de laceraciones de la piel, aletas y boca de 17 juveniles de huayaípe, los cuales fueron aislados en cajas Petri con diferentes medios de cultivos selectivos para identificar las colonias de los aislados. En este primer paso se seleccionaron 14 aislados bacterianos, los cuales mostraban una morfología de la colonia diferente, y se sometieron al siguiente paso de caracterización y selección. Donde se caracterizaron los aislados en base a su crecimiento y actividad bioquímica, y se evaluó su patogenicidad en base a pruebas hemolíticas, de motilidad, de producción de biofilm, halotolerancia, y de resistencia a antibióticos. Al finalizar, los 14 aislados fueron usados para evaluar su efecto sobre la supervivencia de las larvas de huayaípe (en un ensayo *in vivo* con larvas de 1 dpe) y confirmar si efectivamente correspondían a aislados patogénicos, como una forma de validar los métodos de evaluación de la patogenicidad realizados en el objetivo 3.

3.2 Objetivo 1. Aislamiento.

En este proceso se obtuvieron 48 aislados bacterianos los cuales crecieron en placas Petri con diferentes medios de cultivo selectivo. A los 48 aislados del primer paso se los caracterizó a través de su morfología celular y el morfotipo de cada colonia en medio TSA. Se detectó que de los cuarenta y ocho aislados, catorce aislados correspondían a diferentes colonias las cuales fueron seleccionados para la siguiente fase y se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1, Aislados bacterianos seleccionados para la evaluación de la patogenicidad. Los aislados se seleccionaron en base a su morfología celular y el morfotipo de cada colonia en medio TSA, los resultados se expresan con signos (+) para los aislados que tuvieron buen crecimiento, (-) para los aislados que no crecieron en los medios de cultivo y (±) representa un bajo crecimiento.

<i>Código lab.</i>	<i>Tipo</i>	<i>N° aislado</i>	<i>TSA</i>	<i>GSP</i> <i>0,5</i>	<i>GSP</i> <i>1,5</i>	<i>TCBS</i>
B1	<i>Vibrio</i>	19.1	+	-	-	+
B2	<i>Vibrio</i>	27	+	±	±	+
B3	<i>Vibrio</i>	8	+	-	-	+
B4	<i>Vibrio</i>	17	+	-	-	+
B5	<i>Vibrio</i>	43	+	-	±	+
B6	<i>Vibrio</i>	42	+	-	-	+
B7	<i>Vibrio</i>	5	+	-	-	+
B8	<i>Vibrio</i>	45	+	-	±	+
B9	<i>Vibrio</i>	15	+	-	-	+
B10	<i>Pseudomonas</i>	34	+	+	-	-
B12	<i>Pseudomonas</i>	38	+	+	-	-
B13	<i>Pseudomonas</i>	23	+	+	+	-
B14	<i>Vibrio</i>	4	+	-	-	+
B15	<i>Pseudomonas</i>	24	+	+	+	-

3.3 Objetivo 2. Caracterización.

En Figura 1 y Figura 2, se muestran la caracterización de los aislados bacterianos cultivados en placas Petri después de 24 horas de incubación. Además, en Figura 3 y Figura 4, se presenta la morfología de las colonias vistas a través de un microscopio óptico a un aumento de 40x.

3.3.1 Caracterización de los aislados bacterianos.

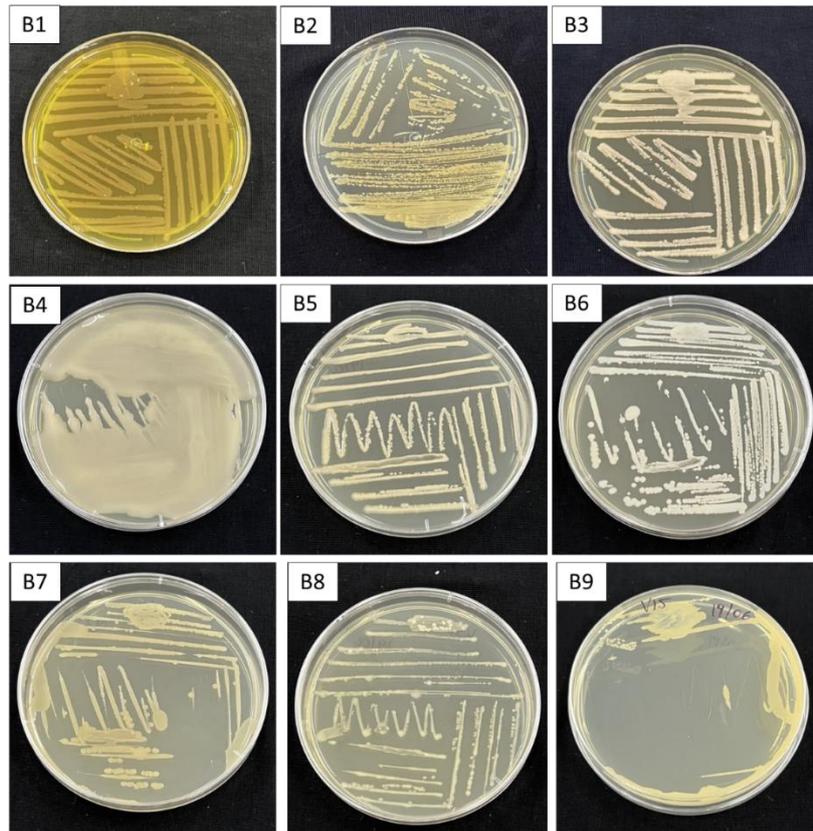


Figura 1, Caracterización de los aislados bacterianos en base al morfotipo de las colonias en placas Petri.



Figura 2, Caracterización de los aislados bacterianos en base al morfotipo de las colonias en placas Petri.

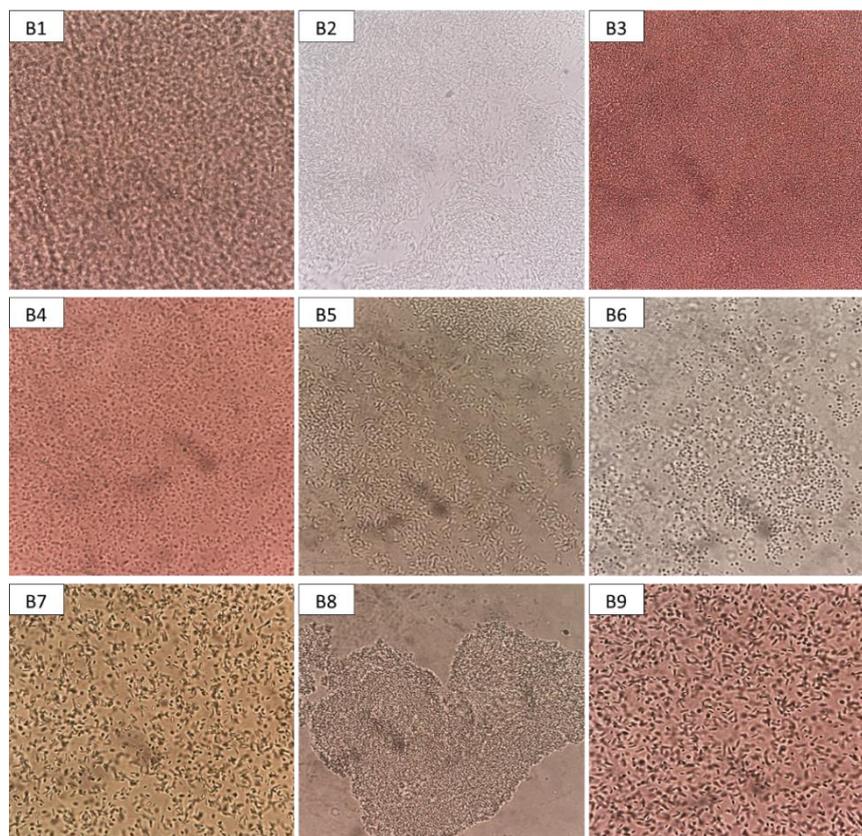


Figura 3, Caracterización de los aislados bacterianos en base a la morfología de las colonias vistas en microscopio óptico a 40x.

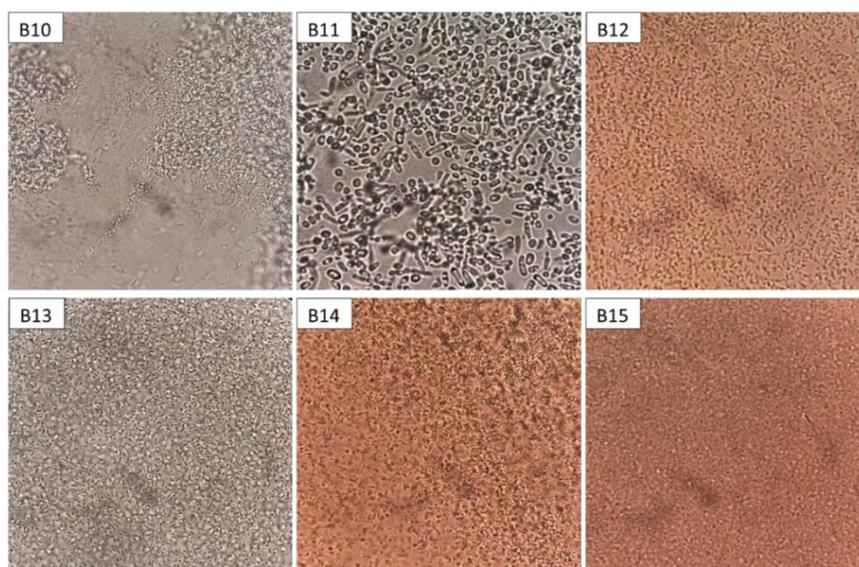


Figura 4, Caracterización de los aislados bacterianos en base a la morfología de las colonias vistas en microscopio óptico a 40x.

3.3.2 Caracterización y Crecimiento de los aislados bacterianos.

En la Figura 6, se muestra el crecimiento de los aislados bacterianos B3, B4, B8, B12, B14, B15. Los aislados B2, B7, B9 y B10 no mostraron un buen crecimiento en caldo LB, por lo que para todos los ensayos siguientes fueron cultivados en caldo TSB, en donde mostraron un mayor crecimiento.

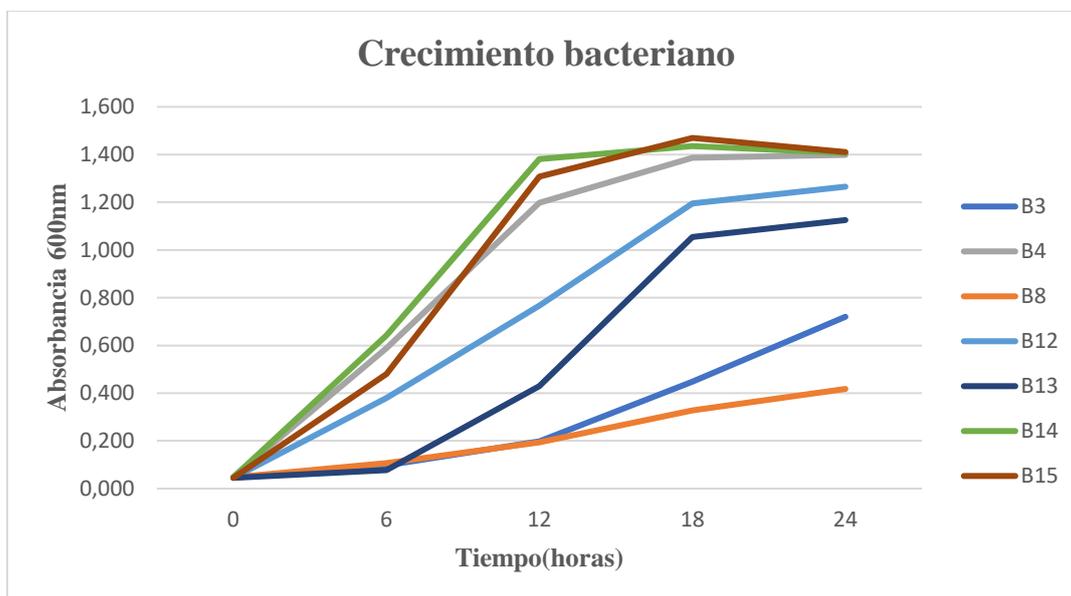


Figura 5, Resultado del crecimiento de los aislados bacterianos.

3.3.3 Resultados de pruebas bioquímicas.

En la tabla 2, los resultados de las pruebas bioquímicas se dieron después de las 48 horas. Se observó que los aislados bacterianos B2, B6, B7, B9 Y B10 no tuvieron actividad en ninguna de las pruebas, posiblemente debido a su lento crecimiento, o a su vez podemos decir que estos aislados no tienen la capacidad de fermentar o metabolizar los sustratos probados. Por otra parte, los aislados B1, B3, B4, B8, B12, B13, B14 y B15 demostraron una gran capacidad metabólica mostrando resultados positivos (+) en la mayoría de las pruebas realizadas. Además, se puede observar que B1 y B15 tuvieron la capacidad de metabolizar los mismos sustratos.

Tabla 2, Resultado pruebas bioquímicas después de 48 horas de experimentación, los resultados se presentan con (+) para los aislados con reacción positivos y (-) para los aislados con reacción negativa.

Bacteria	OF	OF+	Indol	VP	Citrato	Ornitina	Argenina	Lisina	arabinosa	cellobiosa	Mannosa	Mannitol	Sucrosa	Gluconato	Glucorona to	Galactosa
B1	+	+	+	-	-	-	-	+	±	+	+	+	+	+	-	+
B2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B3	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
B4	+	+	±	+	+	-	+	+	+	+	±	+	+	+	±	-
B5	±	±	±	-	+	-	-	-	+	-	±	±	+	-	-	-
B6	+	-	±	-	-	-	-	-	±	-	-	-	+	-	-	-
B7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B8	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	±	+
B9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B12	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	±	+	±	-	+
B13	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	±	+
B14	+	+	+	-	±	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
B15	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+

3.4 Objetivo 3. Patogenicidad.

3.4.1 Halotolerancia de los aislados bacterianos.

En la Figura 2, se muestra que el aislado B4 presenta un buen crecimiento en concentraciones altas de salinidad, lo que da a entender que la tiene una tolerancia a las altas salinidades. Además, podemos observar en la Figura 2 como el aislado B12 muestra un bajo crecimiento en salinidades altas, pero tiene un buen crecimiento a bajas salinidades como se muestra en la Figura 1. A todo esto, los aislados bacterianos tienen un crecimiento favorable en concentraciones de entre 2% al 5%.

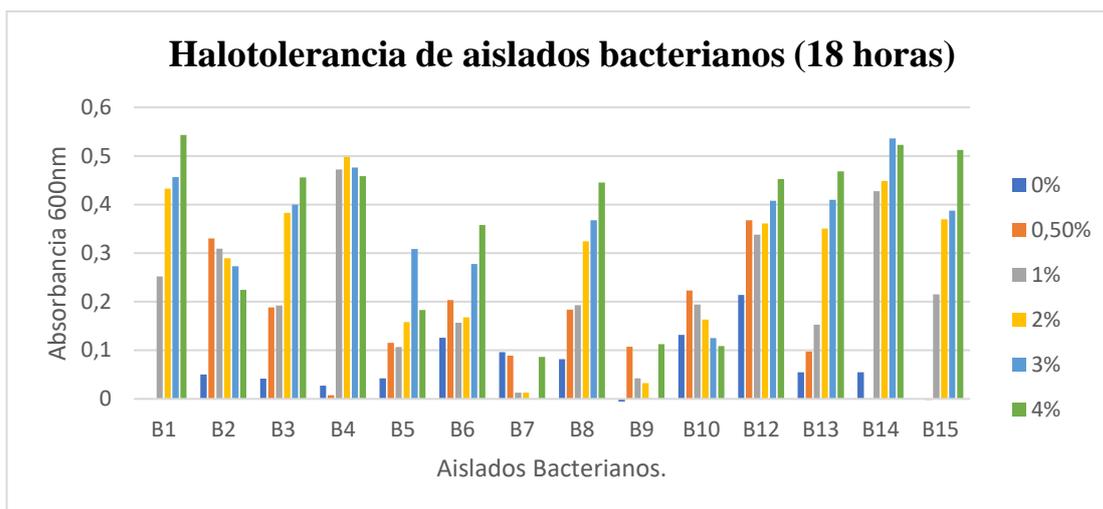


Figura 6, Crecimiento de los aislados bacterianos a diferentes concentraciones de salinidad al 0%, 0.5%, 1%, 2%, 3% y 4%.

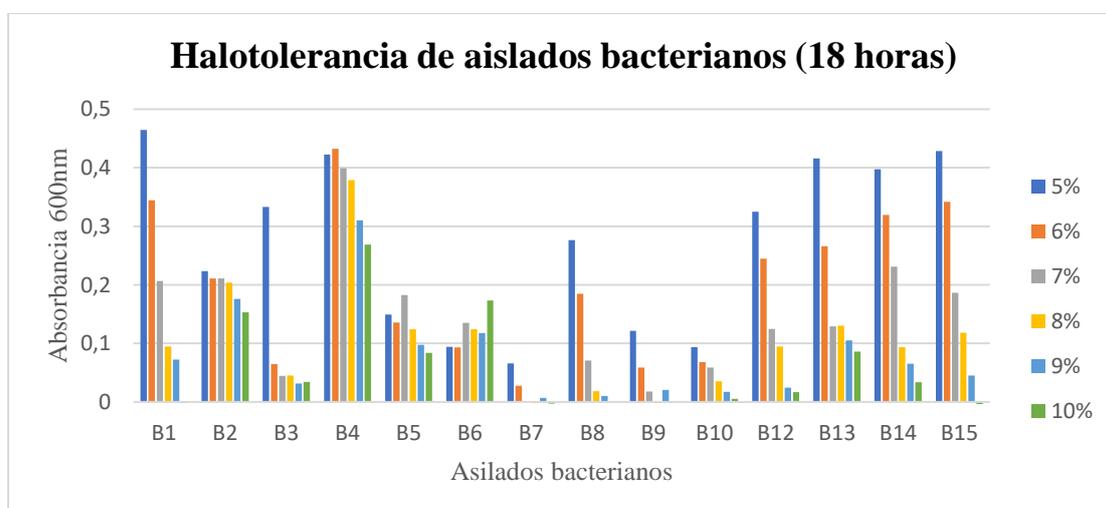


Figura 7, Crecimiento de los aislados bacterianos a diferentes concentraciones de salinidad al 5%, 6%, 7%, 8%, 9% y 10%.

3.4.2 Resultados de la resistencia a antibióticos.

Para evaluar la resistencia a antibióticos de los aislados bacterianos se realizó un antibiograma. La sensibilidad de cada aislado a los antibióticos se muestra a través del tamaño del halo de inhibición, los aislados con halos mayores de 2,5mm se consideraron como sensibles a antibióticos, Por otro lado, los aislados con un halo menor a 2,5mm se consideraron resistentes. En la Figura 3 y 4, los aislados que demostraron ser resistentes

se las seleccionó para determinar la concentración más baja del antibiótico que inhibe el crecimiento de estos aislados a través de las pruebas MIC y la mínima concentración bactericida MBC.

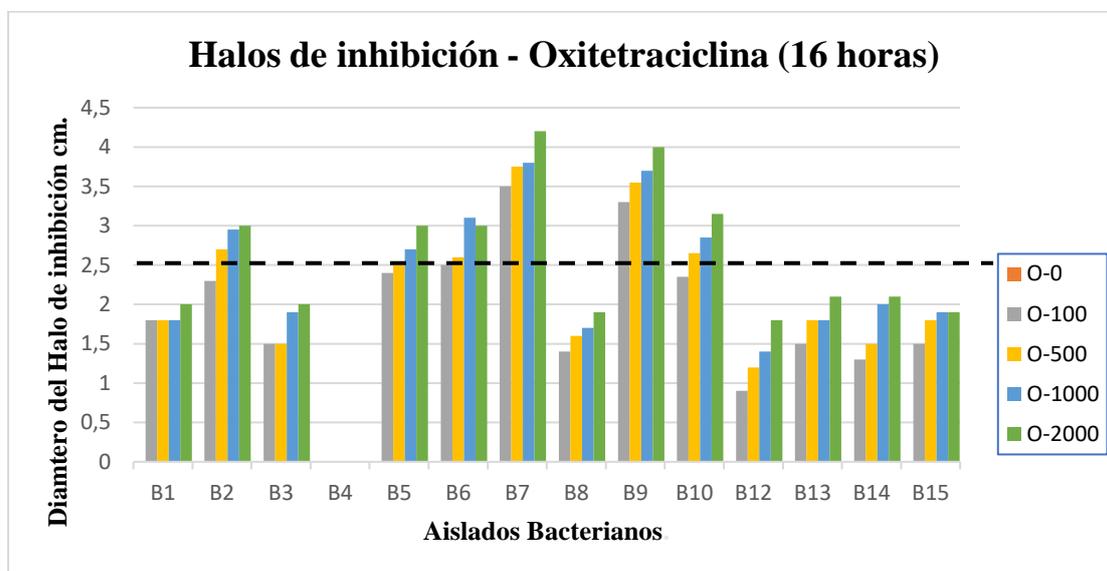


Figura 8, Inhibición de los 14 aislados bacterianos a cinco concentraciones de Oxitetraciclina (Oxiacua, 98% de pureza): 0, 100, 500, 1000 y 2000 ppm. Los resultados de inhibición de los aislado a Oxitetraciclina se muestran a través del tamaño del halo de inhibición.

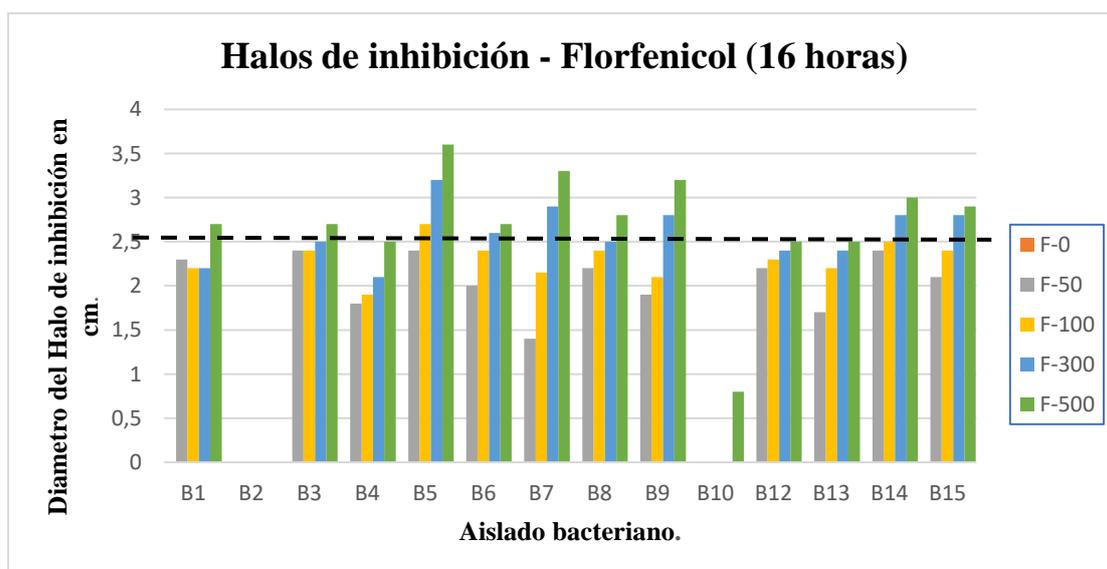


Figura 9, Inhibición de los 14 aislados bacterianos a cinco concentraciones de Florfenicol (Greenfenicol, 15% de pureza): 0, 50, 100, 300 y 500 ppm. Los resultados de inhibición de los aislado a Florfenicol se muestran a través del tamaño del halo de inhibición.

3.4.3 Resultados de prueba de biofilm.

A continuación, se muestran los resultados de mínima concentración bactericida (MBC) que se les realizó a los aislados bacterianos que presentaron resistencia a las concentraciones de los antibióticos.

Tabla 3, MBC para los aislados resistentes al tratamiento con Oxitetraciclina, resultados muestran la concentración del antibiótico en ppm.

BACTERIA	MBC OXITETRACICLINA
B1	50 ppm
B3	10 ppm
B4	1250 ppm
B8	ND
B12	ND
B13	ND
B14	10 ppm
B15	ND

Tabla 4, MBC para los aislados resistentes al tratamiento con Oxitetraciclina, resultados muestran la concentración del antibiótico en ppm.

BACTERIA	MBC FLORFENICOL
B2	25 ppm
B4	50 ppm
B10	75 ppm
B12	ND
B13	125 ppm

3.4.4 Resultados de prueba de biofilm.

La producción de biofilm obtenida se muestra en la Tabla 3, se puede constatar que los aislados B10 ($0,585 \pm 0,04$) y b12 ($0,602 \pm 0,11$) muestran mayores valores de absorbancia, por lo tanto, producen una mayor cantidad de biofilm, siendo

significativamente diferente en comparación a los demás aislados. Los aislados: B1, B2, B3, B4, B5, B7, B8, B13, B14, B15 tienen niveles de absorbancia bajos, con valores que oscilan entre 0,192 y 0,360, es decir que tuvieron la menor producción de biofilm y nos indica que no hay diferencias significativas entre estos aislados. Por otro lado, el aislado B6 con un valor de absorbancia de $0,411 \pm 0,05$ es un aislado con mayor producción de biofilm, pero no tiene diferencias significativas entre los aislados con menor producción de biofilm.

Tabla 5, Producción de biofilm de los 14 aislados bacterianos. Estos resultados son expresados con los valores medios y desviación estándar (absorbancia \pm DS). Las diferentes letras indican diferencias significativas entre cada aislado por medio de la prueba Tukey ($P < 0,05$).

Bacteria	Absorbancia – Producción de biofilm
B1	0.192 ± 0.02 ^a
B2	0.308 ± 0.11 ^{ab}
B3	0.331 ± 0.02 ^{ab}
B4	0.240 ± 0.04 ^{ab}
B5	0.308 ± 0.03 ^{ab}
B6	0.411 ± 0.05 ^b
B7	0.294 ± 0.01 ^{ab}
B8	0.247 ± 0.02 ^{ab}
B9	0.275 ± 0.20 ^{ab}
B10	0.585 ± 0.04 ^c
B12	0.602 ± 0.11 ^c
B13	0.360 ± 0.05 ^{ab}
B14	0.247 ± 0.02 ^{ab}
B15	0.250 ± 0.03 ^{ab}

3.4.5 Resultados motilidad de los aislados bacterianos.

En la tabla 4, se presentan los valores obtenidos de esta prueba. De los 14 aislados, nueve tuvieron valores cercanos a $0,4 \pm 0,00$ cm, lo que nos menciona que estos aislados son poco móviles o tienen limitaciones en su crecimiento. Por otro lado, los aislados B1, B4, B12, B14 y B15 son los que obtuvieron mayor desplazamiento, estos aislados bacterianos son los que presentan más movilidad, por lo que pueden exhibir movimientos más rápidos y extensos a comparación de los aislados restantes.

Tabla 6, Resultados de la motilidad de los aislados bacterianos en placas con medio LB y TSB después de 24 horas, la motilidad de las bacterias en las placas se las midió en centímetros. Los resultados de esta prueba se expresan con los valores medios y desviación estándar (media \pm SD).

<i>Aislados Bacterianos</i>	<i>Motilidad (cm)</i>
B1	5,6 \pm 0,85
B2	0,4 \pm 0,00
B3	0,4 \pm 0,00
B4	8,5 \pm 0,00
B5	0,4 \pm 0,00
B6	0,9 \pm 0,14
B7	0,4 \pm 0,00
B8	0,5 \pm 0,00
B9	0,4 \pm 0,00
B10	0,5 \pm 0,00
B12	6,8 \pm 0,35
B13	0,4 \pm 0,00
B14	8,5 \pm 0,00
B15	7,1 \pm 0,14

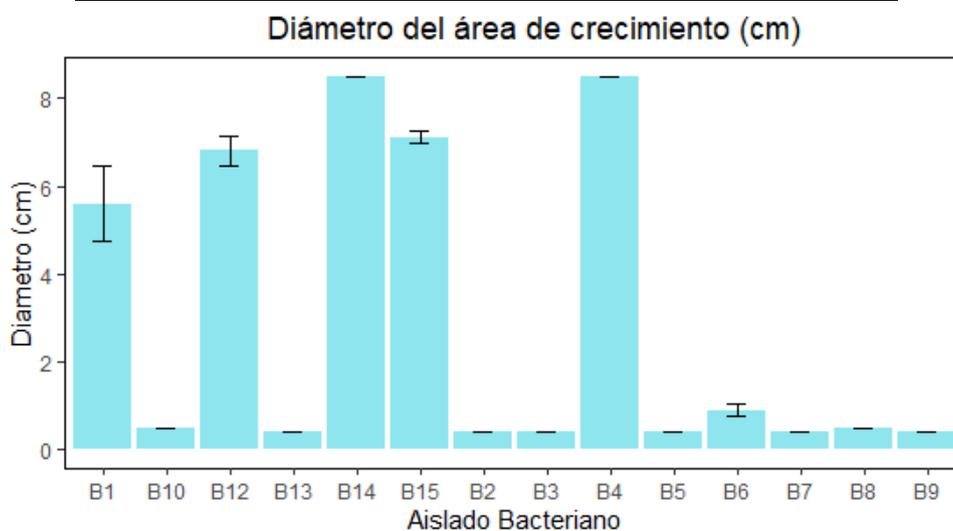


Figura 10, Crecimiento de los aislados bacterianos después 24 horas. Los resultados de esta prueba de motilidad se expresan con los valores medios y desviación estándar (media \pm SD).

3.4.6 Resultados actividad hemolítica.

De acuerdo con los resultados obtenidos de la capacidad hemolítica de cada aislado bacteriano (Tabla 5), se observó que B1, B2, B4, B6, B7, B9, B14, B15 tuvieron hemólisis β lo que significa que son hemolíticas y los aislados: B3, B5, B8, B10, B12, B13 tuvieron hemólisis γ , lo que significa que no son hemolíticas.

Tabla 7, Resultados de la prueba de hemólisis de los aislados bacterianos después de 48 horas, resultados se expresan con signos g para los aislados no hemolíticos y β para los aislados con actividad hemolítica.

<i>Aislados Bacterianos</i>	<i>Hemólisis (48 horas)</i>
B1	β
B2	β
B3	γ
B4	β
B5	γ
B6	β
B7	β
B8	γ
B9	β
B10	γ
B12	γ
B13	γ
B14	β
B15	β

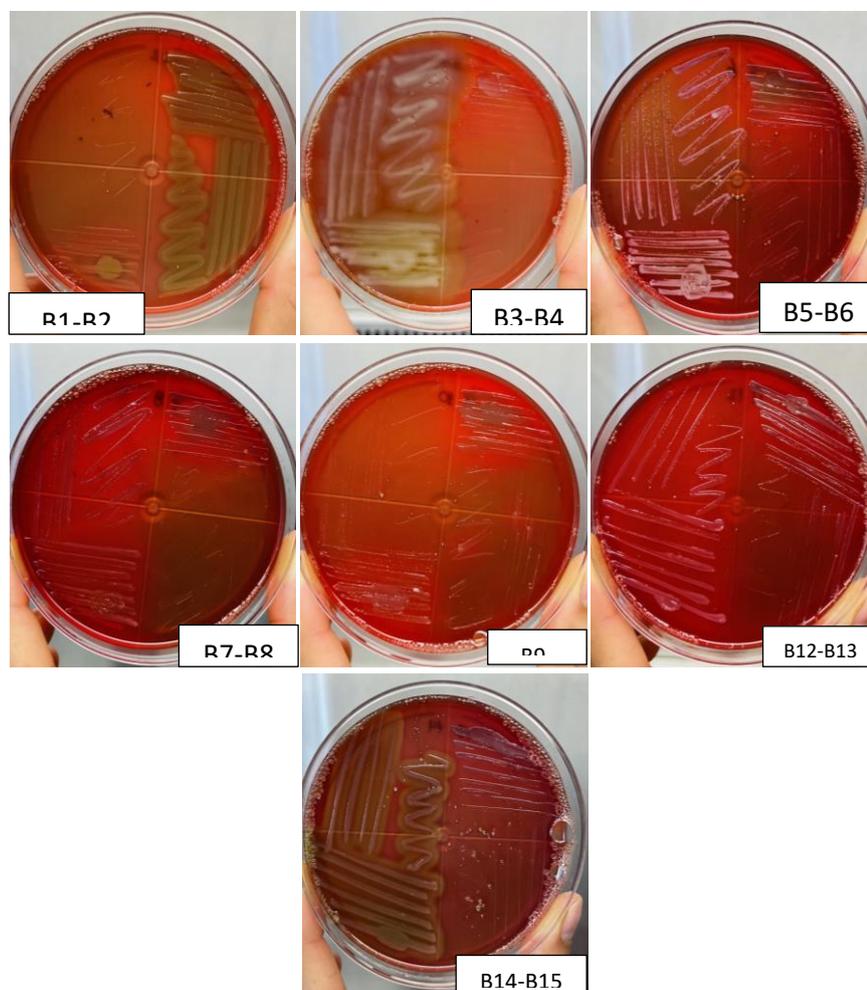


Figura 11, Resultados de prueba de hemólisis de cada uno de los aislados bacterianos después de 48 horas de incubación.

Figura 12, Supervivencia 24 horas post infección de larvas de huayaie. Resultados se muestra el efecto de los aislados bacterianos sobre la supervivencia de larvas de huayaie con revisiones cada 4 horas.

3.5 resumen de resultados de los tres objetivos del protocolo.

En la tabla 8, se muestra el resumen de los resultados de los tres objetivos del protocolo (aislamiento, caracterización, evaluación potencial patogénico). Los aislados bacterianos: B8, B10, B12 fueron considerados posibles patógenos debido a que en la prueba de letalidad influyeron de manera considerable en la supervivencia de las larvas de huayaie, además, son productoras de biofilm y tienen la capacidad de movilizarse como el caso del aislado B12.

Tabla 8, Resumen de los resultados de los tres objetivos del protocolo.

N°	Tipo	Medio origen	TSA	GSP 0,5	GSP 1,5	TCBS	Código lab	Código	Cultivo en LB	Cultivo en TSB	Hemolisis	Supervivencia larvas 24 horas	MIC-Oxi	MBC-Oxi	MIC-Flor	MBC-Flor	Biofilm	Motilidad
B1	V	AM	si	x	x	si	1	V-M5-19.1	si	si	β	71.93	0	0	0	0	0.19	5.6
B2	V	AM	si	poco	poco	si	2	V-M3-27	no	si	β	64.91	0	0	0	0	0.31	0.4
B3	V	TCBS	si	x	x	si	3	V-M4-8	si	si	g	61.11	5	10	0	0	0.33	0.4
B4	V	TCBS	si	x	x	si	4	V-M5-17	si	si	β	84.31	1250	1250	50	50	0.24	8.5
B5	V	AM	si	x	poco	si	5	V-M1-43	si	si	g	71.79	0	0	0	0	0.31	0.4
B6	V	TCBS	si	x	x	si	6	V-M4-42	si	si	β	49.12	0	0	0	0	0.41	0.9
B7	V	TCBS	si	x	x	si	7	V-M5-5	no	si	β	58.97	0	0	0	0	0.29	0.4
B8	V	GSP	si	x	poco	si	8	V-M3-45	si	si	g	29.09	0	0	0	0	0.25	0.5
B9	V	TCBS	si	x	x	si	9	V-M5-15	no	si	β	51.72	0	0	0	0	0.27	0.4
B10	P	GSP	si	si	x	x	10	P-M3-34	no	si	g	3.39	0	0	0	0	0.58	0.5
B12	P	GSP	si	si	x	x	12	P-M5-38	si	si	g	16.95	0	0	100	125	0.60	6.75
B13	P	AM	si	si	si	x	13	P-M3-23	si	si	g	57.38	5	10	0	0	0.36	0.4
B14	V	TCBS	si	x	x	si	14	V-M5-4	si	si	β	57.89	0	0	0	0	0.25	8.5
B15	P	AM	si	si	si	x	15	P-M3-24	si	si	β	56.10	0	0	0	0	0.25	7.1

3.6 Protocolo para la evaluación *in vitro* de la patogenicidad de bacterias aisladas de huayaibe (*Seriola rivoliana*)

A continuación, se detalla el protocolo para la evaluación *in vitro* de la patogenicidad de bacterias aisladas de huayaibe el cual consta de tres objetivos: aislar bacterias de individuos con signos de enfermedad, caracterizar los aislados obtenidos y evaluar el potencial patogénico mediante pruebas *in vitro*. Es importante adaptar los detalles según los recursos y las necesidades específicas del laboratorio.

Tabla 9, Protocolo para la evaluación *in vitro* de la patogenicidad de bacterias aisladas de huayaibe (*Seriola rivoliana*)

PROTOCOLO PARA LA EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA PATOGENICIDAD DE BACTERIAS AISLADAS DE HUAYAIBE (<i>Seriola rivoliana</i>).	
Objetivo: Evaluar la patogenicidad de bacterias aisladas de huayaibe (<i>Seriola rivoliana</i>) mediante pruebas <i>in vitro</i> para su aplicación en la estandarización de desafíos patogénicos.	
1. Aislamiento de aislados bacterianos.	
<ul style="list-style-type: none"> a) Obtención de Juveniles de Huayaibe b) Aislamiento y Purificación de los Aislados Bacterianos 	<p>La obtención de muestras implica el proceso de aislar bacterias específicas de muestras de tejidos infectados. El aislamiento se puede lograr mediante inoculación en medios selectivos con nutrientes y condiciones específicas para ayudar al crecimiento de los aislados bacterianos.</p>
2. Caracterización de aislados bacterianos.	
<ul style="list-style-type: none"> a) Morfología de las colonias. b) Cultivos de aislados bacterianos c) Crecimiento bacteriano. d) Pruebas bioquímicas. 	<p>Una vez aislados, sometemos los aislados obtenidos a una serie de análisis para caracterizar a través de su morfotipo o morfología de cada colonia. Además, podemos visualizar propiedades químicas y biológicas.</p>

3. Evaluación de potencial patogénico.	
a) Pruebas de halotolerancia. b) Resistencia a antibióticos (Prueba de antibiograma). c) MIC y MBC. d) Producción de biofilm. e) Prueba de motilidad. f) Prueba de hemólisis. g) Prueba de letalidad (Supervivencia)	Le evaluación de potencial patogénico implica investigar la capacidad de los aislados obtenidos para causar enfermedades en los peces como el huayaipe. Se detallan las pruebas para evaluar el grado de patogenicidad de los aislados bacterianos y su capacidad de causar daño

3.7 Costos.

En la tabla 9, se reflejan los costos asociados con la ejecución del presente proyecto. Se han considerado todos los materiales necesarios para el desarrollo del proyecto. Los costos individuales de cada material se presentan junto con las cantidades que fueron requeridas, lo que proporciona una visión completa de los gastos involucrados. Esta estructura de costos ofrece una base para la planificación y asignación de recursos, asegurando que el proyecto pueda llevarse a cabo de manera efectiva y eficiente. Con un total de \$4464,49 estos costos representan una inversión necesaria para la realización exitosa del proyecto.

Tabla 10, Lista de materiales de laboratorio que fueron empleados en el desarrollo del proyecto

Cantidad	Materiales	Costo Unitario (\$)	Costo Total (\$)
300	Placas Petri plástico 90x10mm	0,50	150,00
20	Asa de vidrio	6,32	126,40
1	Cristal violeta	7,80	7,80
100	Tubo Eppendorf 1,5 ml	0,16	16,00
30	Tubo Falcon 45 ml	0,90	27,00
1	Medio LB Miller Luria Broth 500gr	175,00	175,00

1	Medio TSB Tryptic Soy Broth 500gr	80,00	80,00
1	BACTO™ AGAR 454gr	150,00	150,00
1	TCBS AGAR 454gr	125,00	125,00
1	TSA AGAR 454gr	100,00	100,00
1	GSP AGAR 454gr	105,00	105,00
1	Micropipeta 100 <i>ul</i>	98,70	98,70
1	Micropipeta 200 <i>ul</i>	281,62	281,62
1	Micropipeta 1 a 10ml	104,61	104,61
100	Puntas para micropipeta 100 <i>ul</i>	0,67	67,00
100	Puntas para micropipeta 200 <i>uL</i>	0,10	10,00
100	Puntas para micropipeta 1-10 <i>ul</i>	0,45	45,00
20	Placa microelisa 96 pocillos	50,00	1000,00
50	Tubo de cultivo con tapa rosca	1,25	62,50
1	Caja de guantes	30,00	30,00
1	Autoclave	930,00	930,00
1	Microscopio	700,36	700,36
1	Oxiacua (Oxitetraciclina 98%)	32,50	32,50
1	Greenfenicol (Florfenicol 15%)	40,00	40,00
-	Servicios CENAIM	-	-
TOTAL (\$)			4464,49

Capítulo 4

4.1 Conclusiones y recomendaciones

4.1.1 Conclusiones

El presente estudio ha logrado diseñar un protocolo para la evaluación de la patogenicidad de bacterias aisladas de huayaipe mediante pruebas *in vitro*, a través de un proceso de tres fases, que abarca aislamiento, caracterización y evaluación de potencial patogénico. Mediante la aplicación de técnicas microbiológicas, se logró obtener 14 aislados bacterianos para su análisis. Las pruebas bioquímicas y crecimiento bacterianos permitieron categorizar y diferenciar los aislados. Por otro lado, la actividad hemolítica y la prueba de halotolerancia reveló características adicionales que podrían influir en su capacidad patogénica. Se evaluó la supervivencia de larvas de huayaipe con los aislados obtenidos a través de la prueba de letalidad donde se evaluó la supervivencia post infección, esto arrojó información importante sobre el impacto real de los aislados en el huésped, proporcionando una comprensión más completa de la patogenicidad de los aislados y su relación con las pruebas de evaluación patogénica. Siendo así, que la mortalidad en esta prueba está relacionada con los aislados bacterianos que demostraron una evidente capacidad en su motilidad, producción de biofilm y resistencia a antibióticos lo que sugiere un alto potencial patogénico.

Utilizando este protocolo se identificaron tres aislados bacterianos con potencial patogénico. Estos aislados deberían ser sometidos a estudios adicionales para determinar las amenazas que representarían en el cultivo de huayaipe.

4.1.2 Recomendaciones

Nuestro protocolo es una herramienta rápida y efectiva para obtener aislados bacterianos, utilizamos técnicas y pruebas para obtener resultados precisos. Así, reducimos el tiempo y los recursos necesarios para la identificación.

Se recomienda realizar la identificación taxonómica de cada aislados bacteriano para obtener una amplia información bibliográfica clave para investigaciones y control. Así, conocer la epidemiología y tratamientos sería fundamental para comprender las enfermedades que causan estos patógenos y combatirlos de manera más efectiva. Es fundamental mantener la salud y el bienestar de los peces en los centros de cultivo por lo que la detección oportuna de patógenos puede prevenir la propagación de enfermedades. Si no se toman medidas oportunas de detección y control, la enfermedad puede propagarse rápidamente y causar graves pérdidas económicas.

Referencias

- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 5-16.
- Ángeles Espino, A., Valencia Botin , A., Virgen Calleros , G., Ramírez Serrano, C., Paredes Gutierrez, L., & Hurtado De la Peña , S. (2013). Determinacion de la dosis letal con Co60 en vitroplántulas de Agave tequilana var. *Revista fitotecnica mexicana*, 381-386. Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000400003&lng=es&tlng=es.
- Aquahoy. (9 de diciembre de 2019). *El mercado de pesca y acuicultura en Ecuador*. Obtenido de Aquahoy: <https://aquahoy.com/el-mercado-de-pesca-y-acuicultura-en-ecuador/>
- Argüello-Guevara, W., Chilán, K., Suárez, A., Estay-Moyano, C., Bohórquez-Cruz, M., Reinoso, S., & Sonnenholzner, S. (2020). Lack of compensatory growth response in longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*, Valenciennes, 1833) juveniles related to cyclical fasting and refeeding under rearing conditions. *Aquaculture Research*.
- Avilés-Quevedo, A., & Castelló-Orvay, F. (2004). Manual para el cultivo de Jurel . Insituto Nacional de Pesca .
- Beltrán Meza, M. (2017). Innovación en el sector acuícola. El Fuerte: Organización Redalyc. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/461/46154070020.pdf>
- Blacio , E. (2002). Posibilidades de diversificación en la Acuicultura en Ecuador. 8, 14-18. Obtenido de <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/8726/1/art4.pdf>
- Blacio, E., Darquea , J., & Rodríguez , S. (2003). Experimental culture of ecuadorean huayaípe. *Global Aquaculture Advocate*.
- Campalans , M., Rojas , P., Campalans, J., & Guerrero, I. (2002). Técnicas de diagnóstico de enfermedades de salmónidos, mitílidos, pectínidos y ostreidos. Universidad Católica de Valparaíso. Obtenido de https://www.subpesca.cl/fipa/613/articulos-88964_informe_final.pdf
- Cárdenas-Perea, M. E., Cruz y López, O. R., & Gámdara-Ramírez, J. L. (2014). Factores de virulencia bacteriana: la " inteligencia " de las bacterias. *Elementos94*.
- Cercenado, E., & Saavedra-Lozano, J. (2009). El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I). 214-217.
- Chirichigno, N., & Martin, R. (2001). *Catálogo Comentado de los Peces Marinos del Perú*. Callao.
- Christensen, G., & Simpson, A. (1982). Adherence of Slime-Producing Strains of *Staphylococcus*. *INFECTION AND IMMUNITY*, 318-326.
- DasSarma , S., & Aurora, P. (25 de Junio de 2015). Las halófitas y sus enzimas: la negatividad aprovechada. *Liberia Nacional de Medicina*, págs. 120-6. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26066288/>
- Espinoza, N., Escala , E., & Blacio, E. (2009). *Estudio de la factibilidad técnica y económica del cultivo de huayaípe (seriola rivoliana) en piscinas con y sin geomembranas*. Guayaquil: DSpace ESPOL. Obtenido de <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/1700>

- FAO . (2017). Planning for aquaculture diversification: the importance of climate change and other drivers. Roma: Fisheries and Aquaculture Proceedings. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/320546704_Planning_for_aquaculture_diversification_the_importance_of_climate_change_and_other_drivers
- FishBase. (2004). *Seriola Rivoliana*. Obtenido de https://www.fishbase.se/NoRecordForCommonName.php?crit1_operator=EQUAL&CommonName=seriola+rivoliana
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews / Microbiology*.
- Forbes, B. A., Sahm, D. F., & Weissfeld, A. S. (2007). *Diagnostic Microbiology*. Mosby.
- García, J., Ulloa, J., & Mendoza, S. (2021). Patógenos bacterianos y su resistencia a los antimicrobianos en los cultivos de tilapia en Guatemala. Uniciencia. Obtenido de <https://dx.doi.org/10.15359/ru.35-2.4>
- González Hernández , J., & Peña , A. (2002). Estrategias de adaptación de microorganismos halófitos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófito). *Revista Latinoamericana de Microbiología* , 145. Obtenido de https://www.medigraphic.com/pdfs/lamico/mi-2002/mi02-3_4g.pdf#:~:text=En%20esta%20revisi%C3%B3n%20se%20mencionan%20los%20avances%20y,ces%20hansenii%2C%20microorganismo%20hal%C3%B3fito%2C%20con%20el%20cual%20trabaja-
- Hutson , K., Ernst, I., & Whittington , I. (2007). Risk assessment for metazoan parasites of yellowtail kingfish *Seriola lalandi* (Perciformes: Carangidae) in South Australian sea-cage aquaculture. En *Aquaculture* (Vol. 271, págs. 85-99). Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.03.020>.
- Jun, L., & Woo, N. (2003). Pathogenicity of *Vibriosis* in Fish: an Overview. *Journal of Ocean University of Qingdao*.
- Kaiser, G. (2022). Obtenido de *Flagelos*: [https://espanol.libretexts.org/Biologia/Microbiolog%C3%ADa/Libro%3A_Microbiolog%C3%ADa_\(Kaiser\)/Unit_1%3A_Introducci%C3%B3n_a_la_Microbiolog%C3%ADa_y_Anatom%C3%ADa_Celular_Procariota/2%3A_La_C%C3%A9lula_Procariota_-_Bacterias/2.5%3A_Estructuras_fuera_de_l](https://espanol.libretexts.org/Biologia/Microbiolog%C3%ADa/Libro%3A_Microbiolog%C3%ADa_(Kaiser)/Unit_1%3A_Introducci%C3%B3n_a_la_Microbiolog%C3%ADa_y_Anatom%C3%ADa_Celular_Procariota/2%3A_La_C%C3%A9lula_Procariota_-_Bacterias/2.5%3A_Estructuras_fuera_de_l)
- Lasa, I. (2005). Biofilms bacterianos e infección. 163-175.
- Martínez, J. L. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*, 365-367.
- Melo, L. (2020). Efectos negativos de los microorganismos halotolerantes y/o halófilos en alimentos con conservas salinas. *Microorganismos de ambientes extremos*.
- Molina Lopez, J., Manjarrez Hernández, A., & Cravioto Quintana, A. (1998). Patogenicidad bacteriana. *Facultad de Medicina UNAM*, 115-119.
- Montoya, L. B. (2019). *EFEECTO DE LA OSCILACIÓN DE LA TEMPERATURA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO Y SU INFLUENCIA EN LA ALIMENTACION EXÓGENA EN LARVAS DE JUREL SERIOLA rivoliana*. Baja California Sur.
- Organizacion Panamericana de la Salud. (4 de Marzo de 2021). *Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS*. Obtenido de <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms>
- Pacheco, R., Ascencio , F., Zarain , M., Gómez , G., & Campa, Á. (2017). Enhancement of superoxide dismutase and catalase activity in juvenile brown shrimp, *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes, 1900), fed β -1.3 glucan vitamin E, and

- β -carotene and infected with white spot syndrome virus. *Latin American Journal of Aquatic Research*. Obtenido de <https://doi.org/10.3856/vol39-issue3-fulltext-13>
- Pérez, O., Roos, L., & Télfer, J. (2016). Optimización de la acuicultura marina de jaulas flotantes en Tenerife, Islas Canarias, mediante el uso de modelos basados en Sistemas de Información Geográfica (SIG). *17*. Obtenido de <http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/art>
- Proaqua. (26 de Agosto de 2020). *Prebióticos, Prebióticos Y Otros Aditivos Potenciadores De Alimento En Granjas De Peces Y Camarones*. Obtenido de PROAQUA: <https://proaqua.mx/blog-y-noticias/probiticos-prebiticos-y-otros-aditivos-potenciadores-de-alimento-en-granjas-de-peces-y-camarones/>
- Robertson, & Calderón, J. (1998). Infecciones experimentales por *Vibrio harveyi* en larvas de *Penaeus vannamei*. *Enfermedades de los organismos acuáticos*, 151-155.
- Senasica. (2020). *Aislamiento de bacterias fitopatógenas y pruebas de patogenicidad*. (I. y. Servicio Nacional de Sanidad, Editor) Obtenido de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/728771/1._FT._Aislamiento_de_bacterias_fitopat_genas_y_pruebas_de_patogenicidad_1.0_2020.pdf
- SEQC. (03 de 11 de 2019). Obtenido de Sociedad Española de Medicina de Laboratorio: <https://www.labtestsonline.es/tests/antibiograma#:~:text=El%20antibiograma%20se%20realiza%20para%20cada%20tipo%20de%20bacteria%20u,antimicrobianos%20para%20inhibir%20su%20crecimiento.>
- Sheppard, M. (2005). Aquatic Animal Health Subprogram: Detection and management of health issues in yellowtail kingfish (YTK, *Seriola lalandi*)-the foundation for a health program for Australian finfish aquaculture. *Aquatic Animal Health Subprogram*.
- Smith-Vaniz, W., Kaufman, L., & Glowacki, J. (1995). Species-specific patterns of hyperostosis in marine teleost fishes. *Marine Biology*. Obtenido de <https://doi.org/10.1007/BF00349291>
- Symonds, J., Walker, S., Pether, S., Gublin, Y., McQueen, D., King, A., . . . Bruce, M. (2014). Developing yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) and hāpuku (*Polyprion oxygeneios*) for New Zealand aquaculture. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*. Obtenido de <https://doi.org/10.1080/00288330.2014.930050>
- Tittsler, R., & Sandholzer, L. (1936). THE USE OF SEMI-SOLID AGAR FOR THE DETECTION. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*.
- Vazquez, M. (2022). *Pruebas de sensibilidad o antibiogramas*. Obtenido de <https://www.msmanuals.com/es-mx/professional/enfermedades-infecciosas/diagn%C3%B3stico-de-laboratorio-de-las-enfermedades-infecciosas/pruebas-de-sensibilidad-o-antibiogramas>
- Vazquez-Pertejo, M. T. (octubre de 2022). *MANUAL MSD*. Obtenido de Pruebas de sensibilidad o antibiogramas: <https://www.msmanuals.com/es-es/professional/enfermedades-infecciosas/diagn%C3%B3stico-de-laboratorio-de-las-enfermedades-infecciosas/pruebas-de-sensibilidad-o-antibiogramas#:~:text=Las%20pruebas%20de%20sensibilidad%20o,para%20bacterias%20hongos%20o%2>
- Ventosa, A. (2006). En A. Ventosa, *Unusual microorganisms from unusual habitats: hypersaline environments* (págs. 223-254). Springer.

- Ventosa, A. (2006). Unusual microorganisms from unusual habitats: hypersaline environments. Springer.
- Ventosa, A. (s.f.). Unusual microorganisms from unusual habitats: hypersaline environments.
- Vivanco-Aranda, M., Del Río-Zaragoza, O., Lechuga-Sandoval, C., Viana, M. T., & Rombenso, A. (2018). Health response in yellowtail *Seriola dorsalis* exposed to an *Amyloodinium*. *Ciencias Marinas*.
- Vizcarrondo, M., & Gutiérrez de Gamboa, S. (2002). *IDENTIFICACIÓN MICROBIANA. Identificación microbiana mediante métodos basados*.
- Zhang, J., Kong, X., Zhou, C., & Li, L. (2014). Toll-like receptor recognition of bacteria in fish: Ligand specificity and. *Fish & Shellfish Immunology*, 380-388.
- Zhao, A. (30 de mayo de 2022). *Ecuador-- el gran país del cultivo de Penaeus vannamei*. Obtenido de LinkedIn: <https://es.linkedin.com/pulse/ecuador-el-gran-pa%C3%ADs-del-cultivo-de-penaeus-vannamei-andr%C3%A9s-zhao#:~:text=Ecuador%20es%20uno%20de%20los,alcanza%20las%20940%20000%20toneladas>.