

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y
Recurso naturales.



**“CONTROL BIOLÓGICO DE PATÓGENOS DE CAMARON
MEDIANTE EL USO DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE
MUESTRAS DE BIOL Y SUELO DE LA ANTÁRTIDA.”**

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

INGENIERO EN ACUICULTURA

Presentado por:

Lizette Verónica Serrano Mena

Guayaquil – Ecuador

2014

AGRADECIMIENTO

En primer lugar a Dios por acompañarme y guiarme; en segundo lugar a cada uno de los que son parte de mi familia, a mi PAPÁ, mi MAMÁ, mis HERMANOS y AMIGOS por haberme apoyado incondicionalmente; por último a todo el personal del CIBE-ESPOL, y de manera especial al Dr. Juan Manuel Cevallos, y la Dra. Esther Peralta.

DEDICATORIA

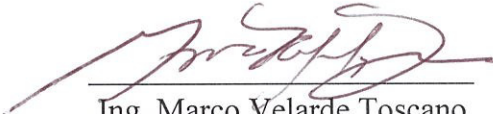
A todas aquellas personas que
estuvieron siempre allí cuando
más lo necesite; a mis padres:

Raúl y María Elena;


y a mis muy queridos amigos:

Jeffrey y Susana.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



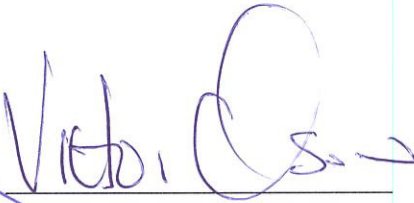
Ing. Marco Velarde Toscano.
Presidente del Tribunal



Ana Tirapé, Ph.D
Directora de tesis



M.Sc. Ecuador Marcillo.
Miembro del Tribunal



M.Sc. Victor Osorio
Miembro del Tribunal

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestas en esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y, el patrimonio intelectual de la misma, a La Escuela Superior Politécnica del Litoral”

(Reglamento de exámenes y títulos profesionales de la ESPOL)



Lizette Verónica Serrano Mena

RESUMEN

La finalidad de esta investigación fue determinar si existen bacterias presentes en el suelo de la Antártida, y en el Biol que con capacidad de inhibir el crecimiento de *Vibrios spp.*, para que luego puedan ser utilizadas en productos para tratamientos preventivos contra enfermedades relacionadas con estos patógenos en las piscinas de cultivo de camarón. Para esto, cepas aisladas de muestras del suelo de la Antártida y de muestras de Bioles elaborados en el CIBE, fueron sometidas a distintas pruebas de antagonismo contra tres especies de *Vibrio* (*V. parahaemoliticus*, *V. vulnificus* y *V. harveyi*) y una cepa de *Pseudomona sp* aislada de camarones enfermos con vibriosis.

Los resultados obtenidos demuestran que existen bacterias del Biol con actividad inhibitoria sobre *V. vulnificus* y *V. harveyi*. Mientras que en el suelo de la Antártida se encuentran bacterías capaces de inhibir el crecimiento de *V. vulnificus*, *V. harveyi*, y *Pseudomona sp.*, pero, esta capacidad se ve afectada negativamente debido a la salinidad que ocasiona que su actividad inhibitoria disminuya.

Palabras claves: *Vibrio*, Inhibición, Antártida, Biol, Antagonismo.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTO	I
DEDICATORIA	II
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN	III
DECLARACIÓN EXPRESA	IV
RESUMEN.....	V
ÍNDICE GENERAL	VI
ABREVIATURAS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XII
INTRODUCCIÓN	XIII
CAPITULO I.....	1
1. JUSTIFICACIÓN	1
CAPITULO II.....	4
2. INFORMACIÓN GENERAL.....	4
2.1. Características del género Vibrio.....	4
2.2. Enfermedades en camarones relacionadas o causadas por bacterias del género Vibrios.....	9
2.2.1. Vibriosis:	9
2.2.1.1. Vibriosis localizada:.....	12
2.2.1.2. Vibriosis Sistémica:	12

2.2.2.	Erosión bacteriana del caparazón:	14
2.2.3.	Hepatopancreatitis	15
2.2.4.	Síndrome de Zoea II	15
2.2.5.	Enfermedad de luminiscencia.....	16
2.3.	Características de las especies de patógenos que se emplearán.	17
2.3.1.	<i>V. parahaemoliticus</i>	17
2.3.2.	<i>V. vulnificus</i>	21
2.3.3.	<i>V. harveyi</i>	29
2.3.4.	<i>Pseudomonas</i> spp.....	31
2.4.	Características de los posibles biocontroladores.	34
2.4.1.	Bacterias provenientes de la Antártida	34
2.4.2.	Propiedades antimicrobianas de los Bioles.....	39
CAPITULO III.....		41
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1.	Materiales:.....	41
3.1.1.	Medios de cultivo.....	41
3.1.2.	Equipos	41
3.1.3.	Materiales.....	42
3.1.4.	Cepas Empleadas	42
3.1.4.1.	Cepas patógenas	42
3.1.4.2.	Cepas antagonistas	43
3.2.	Metodología:	44

3.2.1.	Determinación del medio a utilizarse en las pruebas de antagonismo.	44
3.2.2.	Pruebas de antagonismo Cepas de la Antártida vs patógenos camarón.	44
3.2.2.1.	Primera prueba	44
3.2.2.2.	Segunda prueba	46
3.2.2.3.	Tercera prueba:	47
3.2.2.4.	Cuarta prueba:	49
3.2.3.	Pruebas de antagonismo Cepas aisladas del Biol vs patógenos camarón.....	52
3.2.3.1.	Primera Prueba	52
3.2.3.2.	Segunda Prueba.....	52
3.2.3.3.	Tercera prueba:	53
3.2.3.4.	Cuarta prueba:	54
3.3.	Presupuesto:	55
4.	RESULTADOS.....	56
4.1.	<i>V. parahaemolyticus</i>	56
4.2.	<i>V. vulnificus</i>	57
4.3.	<i>V. harveyi</i>	61
4.4.	<i>Pseudomona sp.</i>	64
4.5.	Diferencia de tamaño según la salinidad (Bacterias de la Antártida) .	66
	Discusión.....	68
	CONCLUSIONES	70
	RECOMENDACIONES	72

BIBLIOGRAFÍA	89
--------------------	----

ABREVIATURAS

<i>V. parahaemoliticus</i>	<i>Vibrio parahaemoliticus</i>
<i>V. vulnificus</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
<i>V. harveyi</i>	<i>Vibrio harveyi</i>
ppt	Part per thousand
PDB	Potato Dextrose Broth
TSA	Trypticase Soy Agar
Sal.	Salinidad

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura # 1.	Diagrama del primer método de inhibición empleado.....	45
Figura # 2.	Diagrama de la metodología empleada en la segunda prueba de inhibición.....	47
Figura # 3.	Diagrama de la metodología empleada en la tercera prueba de inhibición.....	49
Figura # 4.	Diagrama de la metodología empleada para la cuarta prueba de inhibición.....	51
Figura # 5.	Comparación de los resultados positivos de antagonismo contra <i>V. vulnificus</i>	58
Figura # 6.	Comparación de resultados entre la prueba de antagonismo 3 y 4 contra <i>V. vulnificus</i>	59
Figura # 7.	Comparación entre los resultados positivos de las pruebas de antagonismo 3 y 4 (Medio de crecimiento no salino).....	60
Figura # 8.	Comparación entre resultados positivos de inhibición de crecimiento de <i>V. harveyi</i> en la prueba 3.....	62
Figura # 9.	Comparación entre los resultados de inhibición de <i>Pseudomona sp.</i> .	66
Figura # 10.	Efecto de la salinidad sobre el tamaño de los halos de inhibición de bacterias de la Antártida.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.	Resultados de las pruebas de antagonismos contra el <i>V. vulnificus</i>	57
Tabla II.	Resultados positivos de las pruebas de antagonismo contra <i>V. harveyi</i>	62
Tabla III.	Tabla de resultados positivos de Inhibición de <i>Pseudomona sp.</i>	64
Tabla IV.	Materiales y Costos.....	75

INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarón en Ecuador es de gran importancia por ser un cultivo de alto valor comercial y de varias cosechas en el año. Sin embargo; la producción muchas veces se ve afectada por la aparición de enfermedades causadas por patógenos oportunistas que de no ser detectadas a tiempo pueden llegar a ocasionar importantes pérdidas económicas. La utilización de biocontroladores es una de las alternativas más importantes hoy en día para el manejo de estas enfermedades, además, este método es amigable con el medio ambiente.

El presente trabajo intenta encontrar nuevas cepas bacterianas provenientes de la Antártida y/o muestras de Biol producidos localmente, capaces de producir compuestos antimicrobianos que inhiban el crecimiento de uno o más de uno de los siguientes patógenos oportunistas del camarón: *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, y *Pseudomonas sp.*

Para este fin se realizarán diferentes pruebas de antagonismo *in vitro* mediante las cuales sea posible visualizar una inhibición del crecimiento de los patógenos utilizados. Entre las pruebas a utilizar se incluyen la de Confrontación Dual y la de Difusión en Pozos.

Nuestra hipótesis es que entre los aislados bacterianos provenientes de muestras de suelo de la Antártida y de las muestras de Biol obtenido localmente, que serán usados para las pruebas de antagonismo, se encuentran cepas bacterianas capaces de inhibir el crecimiento de ciertos patógenos oportunistas del camarón, y existe al menos una bacteria con actividad antagonista a más de una especie de *Vibrio*.

CAPITULO I

1. JUSTIFICACIÓN

El camarón se constituye como uno de los principales productos de exportación no petrolera en el Ecuador. Este representa en la actualidad el 12.7% de la participación del total no petrolero, únicamente superado por el banano y plátano que constituyen el 24,2%. (Ministerio de Relaciones Exteriores, Comercio e Integración, 2012). Durante el 2012 las exportaciones de este producto generaron divisas por USD 1.276,9. (Pro Ecuador, 2013), y entre enero del 2013 y mayo del 2013 se reportó que las exportaciones de camarón alcanzaron los US\$632 millones, y tuvo un incremento del 21.5% en relación al mismo periodo en el 2012 (Argüello, 2013).

Además, el cultivo de camarón es un neto generador de divisas para el Ecuador debido a que de cada dólar que se produce y exporta, 91 centavos corresponden a productos ecuatorianos mediante el uso de insumos, tecnología y mano de obra del país (Camposano, 2013).

Debido a su alto valor en el mercado y a la aportación significativa de divisas para el país, su cultivo es una industria en expansión. Esto genera que se intensifique su cultivo, que a su vez provoca un incremento en el estrés y afecta negativamente la salud de los camarones cultivados. Como resultado de esta situación han ocurrido varias enfermedades en los estanques de cultivo, entre las que destacan las provocadas por virus y bacterias del género *Vibrio* principalmente, los cuales han sido los patógenos más documentados. (Huerta Aldaz, 2001).

De acuerdo con Moriarty (1990), los géneros de microorganismos que más comúnmente se encuentran presentes en los crustáceos son *Vibrios* y *Pseudomonas*. Entre las *Pseudomonas* se encuentra la *P. aeruginosa* que puede ser mortal para los camarones de cultivo desde sus etapas tempranas de postlarvas, juveniles y adultos, además esta bacteria puede estar presente en el agua o en el sedimento de los estanques de cultivo, y afecta no sólo a los animales sino también a las personas (León, 1999). Entre las especies que más han sido relacionadas con la vibriosis se

encuentran: *V. harveyi*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* (Venkateswara Rao A. , 2008)

Los vibrios pueden ocasionar la vibriosis, ésta es una de las enfermedades más problemáticas en la acuicultura de crustáceos, moluscos y peces. Esta enfermedad está presente en todo el mundo y en todos los crustáceos marinos, incluido los camarones que son los más susceptibles, y es responsable de mortalidad en camarones de sistemas de cultivo en todo el mundo (Venkateswara Rao A. , 2008).

Tradicionalmente los controles de enfermedades se realizan mediante la utilización de antibióticos, pero actualmente los mercados internacionales han impuesto restricciones en su utilización. Debido a esto es necesario nuevas formas de control de patógenos en los cultivos y centros de acopio.

Además, la aparición de bacterias multi-resistentes a antibióticos ha generado que en los últimos años se incremente la investigación de microorganismos provenientes de ambientes extremos, especialmente aquellos provenientes de los Polos, que dadas sus características o las propiedades de sus enzimas, presentan un gran potencial en aplicaciones biotecnológicas.

CAPITULO II

2. INFORMACIÓN GENERAL

2.1. Características del género Vibrio.

Las enfermedades de origen bacteriano representan una importante limitante en el cultivo de camarón, que pueden conllevar a una reducción del valor comercial del producto y a disminuir la rentabilidad económica de este cultivo. Una de estas enfermedades bacterianas que afectan la camaronicultura es la vibriosis. La vibriosis es el nombre dado a una enfermedad causada por un grupo de bacterias gram-negativas del género *Vibrio* pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* (Pavlidis & Mylonas, 2010) que también incluye a los géneros: *Aeromonas*, *Plesiomonas*, y *Photobacterium*. Todos los vibrios son ubicuos en el ambiente marino y todas las

especies, a excepción del *Vibrio cholerae* y *V. mimicus*, requieren cloruro de sodio en el medio de cultivo (Lynn, 2008).

Se han registrado 30 especies en el género *Vibrio*, 13 de estas son patógenas humanas, incluyendo *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. cincinnatiensis*, *V. hollisae*, *V. vulnificus*, *V. furnissii*, *V. damsela*, *V. metshnikovii*, y *V. carchariae*. Todos los vibrios patógenos han sido reportados como causantes de enfermedades de origen alimentaria, aunque *V. cholerae* O1, *V. parahaemolyticus*, y *V. vulnificus* son considerados los agentes de transmisión más significativas (Lynn, 2008).

Dependiendo de la especie involucrada, las manifestaciones clínicas son diferentes, desde gastroenteritis hasta septicemia e infecciones de heridas (Ankenman *et al*, 2012). La mayoría de las infecciones de heridas causadas por *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*, ocurren en pescadores y procesadores de mariscos, en un estudio conducido por Stom y Paranjpye (2000), el 69% de las infecciones parecían estar relacionadas a exposición ocupacional de los pescadores y abridores de ostras (Lynn, 2008).

La mayoría de los vibrios que causan infecciones son patógenos oportunistas, y requieren que el huésped esté predispuesto al estrés para expresar su patogenicidad como *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. anguillarum*, *V.*

vulnificus y *V. splendidus*. Sin embargo, algunas especies de *Vibrio*, o cepas de ciertas especies, han sido identificados como patógenos primarios (Rubio *et al*, 2012). Es difícil establecer el número de bacterias necesarias para la infección del camarón en condiciones naturales, pero el riesgo parece aumentar si el conteo bacteriano es alto.

La mayoría de las cepas del género *Vibrio* son Gram-negativas, con formas rectas o curvas, baciliformes no formadoras de esporas, tienen de 0,5 a 0,8 µm de ancho y de 1,4 a 2,6 µm de largo, sin embargo, cuando crecen en el laboratorio, frecuentemente son observadas con forma de varas rectas. Son motiles a través de un solo flagelo polar, y son aeróbicos o anaeróbicos facultativos. Muchas especies producen oxidasa y catalasa y fermentan la glucosa sin producir gas (Lynn, 2008).

Muchas de las especies de vibrios se encuentran asociadas a los crustáceos y peces como componentes normales de su microflora (Lightner & Pantoja, 2009) (Ankenman *et al*, 2012), la cual está influenciada tanto por las condiciones medioambientales como con la distribución de bacterias en el ambiente. La composición bacteriana en el intestino puede tener también implicaciones nutricionales y de comportamiento (Hernández *et al*, 1997).

Los vibrios son primariamente residentes acuáticos y su distribución en el ambiente depende de factores como temperatura, salinidad, concentración de sodio, nutrientes en la columna de agua, etc. Además tienen diferentes funciones en el medio acuático,

entre ellas se encuentra la que cumplen dentro de la cadena trófica y en el ciclo del nitrógeno en el medio marino. En la primera estos microorganismos reciclan nutrientes del agua y proveer de ácidos grasos poliinsaturados a organismos acuáticos incapaces de producirlos, en el segundo caso hay especies, como *V. diazotrophicus*, que fijan nitrógeno atmosférico que otros organismos acuáticos necesitan para su nutrición (Beaz, 2008).

La salinidad es un factor determinante para casi todas las especies de vibrio, debido a que necesitan iones de sodio para los translocadores de energía de la membrana citoplasmática, así como los iones inorgánicos para mantener la integridad de la pared celular y membrana (Beaz, 2008). Los vibrios que requieren pequeñas cantidades de sodio para crecer, como *V. cholerae* y *V. mimicus*, es posible también encontrarlos en riberas de agua dulce (San Cristóbal, y otros, 2008). Con respecto a la temperatura casi todas las especies de vibrio suelen crecer a 30°C, mientras que a temperaturas por encima de los 37°C solo crecen especies de origen clínico como el *V. cholerae* que crece hasta los 42°C (Beaz, 2008).

A pesar de esta aparente diferenciación de los vibrios para proliferar en los diferentes ambientes, se ha registrado que *V. harveyi*, especie conocida como principal problema en la larvicultura, en épocas recientes también ha sido implicada en el lento crecimiento en estanques de engorda y mortalidades en camarones juveniles, especialmente en los primeros 45 días de cultivo (Gómez *et al*, 2001).

Las infecciones causadas por estas bacterias generalmente son el resultado de trauma físico, condiciones ambientales extremas, infecciones previas con otros patógenos incluidos virus, baculovirus, rickettsia, fusarium y gregarinas intestinales o por formas altamente virulentas (Lightner & Pantoja, 2009) (Hernández *et al*, 1997). Los brotes pueden ocurrir cuando los factores ambientales disparan la rápida multiplicación de las bacterias que son toleradas a bajos niveles dentro de la sangre del camarón (Sizemore & Davis, 1985). Este tipo de epizootias han sido asociadas con daño al tejido intestinal por toxinas de algas azules, o deficiencia de ácido ascórbico. Adicionalmente, exposición a condiciones físicas y químicos fisiológicamente estresantes, tales como bajo oxígeno disuelto, amonio elevado, temperaturas extremas, alta salinidad, niveles de nitrógeno y hacinamiento han sido ligadas a brotes de vibriosis serios en haciendas camaroneras (Hernández *et al*, 1997).

El exoesqueleto de los crustáceos provee de una barrera física contra los patógenos que tratan de infectar a los crustáceos a través de esta superficie externa, sin embargo, *Vibrio spp.* está entre las bacterias quitinoclásticas asociadas con la enfermedad de la cutícula del cefalotórax, lo que les permite vivir en la cutícula del camarón y en el sedimento del estanque (Venkateswara Rao A. , 2008) (Hernández *et al*, 1997), y puede ingresar a través de las heridas en el exoesqueleto o poros.

Las branquias son un punto probable de ingreso de estas bacterias debido al exoesqueleto delgado del que están recubiertas, pero sus superficies son limpiadas por las setobranquias. Otro lugar por el que resulta más probable el ingreso bacteriano es el intestino medio debido a que éste no está revestido por un exoesqueleto y por consiguiente parece ser el sitio probable de penetración de patógenos presentes en el agua, alimentos y sedimentos (Venkateswara Rao A. , 2008).

2.2. Enfermedades en camarones relacionadas o causadas por bacterias del género *Vibrios*

2.2.1. Vibriosis:

La vibriosis es una de las enfermedades más problemáticas en la acuicultura de crustáceos, bivalvos y de peces, y es responsable de la mortalidad del camarón de cultivo en todo el mundo (Venkateswara Rao A. , 2008). Las infecciones causadas por estas bacterias normalmente ocurren en los hatcheries, pero los brotes también pueden ocurrir en los estanques de engorda. En América, es la enfermedad de más importancia sanitaria después de las enfermedades de la mancha blanca y el síndrome de Taura, en términos de pérdidas de producción y de costo de gestión (Rubio *et al*, 2012). Normalmente las etapas larvarias, tanto en peces como en bivalvos, son las más sensibles a la vibriosis (Beaz, 2008).

En los peces, las mortalidades son asociadas con varias especies de vibrios, como *Vibrio anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, y *V. salmonicida* (Pavlidis & Mylonas, 2010). En estos, la vibriosis se caracteriza por causar una septicemia hemorrágica. Entre los signos externos que manifiestan los peces con vibriosis se encuentran: letargo, oscurecimiento de la piel, engrosamiento corneal, branquias blanquecinas, y eritema en la base de las aletas. Los signos internos comunes comprenden: vasos sanguíneos viscerales congestionados, hemorragia intestinal, destrucción de la mucosa, y acumulación de fluidos tanto serosanguinolento en los intestinos como de exudado mucoso en la cavidad abdominal. Los vibrios son responsables del daño tisular debido a sus productos extracelulares entre los que se encuentran una variedad de proteasas y hemolisinas (Pavlidis & Mylonas, 2010).

Es posible realizar tratamientos con alimento medicado, y este puede ser efectivo si se realiza en el inicio de la enfermedad, cuando los peces aún consumen alimento. Aunque un control bacteriano es necesario en el estanque, un uso de antibióticos excesivo puede afectar la microflora, permitiendo entonces el establecimiento de microorganismos patógenos resistentes (Hernández *et al*, 1997).

Las aves acuáticas pueden ser un vector de *Vibrio spp.*, especialmente durante los meses fríos, Bisgaard y Kristen reportaron, en 1981, la presencia de *V. cholerae* en las heces de patos y gaviotas durante una estación fría, incluso cuando no se observan

vibrios en la columna de agua. Otro estudio de Buck en 1990, reportó haber encontrado una asociación de *Vibrio spp.* con pelícanos y gaviotas. Sin embargo no hay más información disponible referente al rol de las aves acuáticas en la persistencia o propagación de los *Vibrios parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (Lynn, 2008).

En los camarones, las mayores epizootias de vibriosis han sido reportadas para *P.monodon* en la región Indo-Pacífico, *P. japonicus* de Japón, y *P. vannamei* de Ecuador, Perú, Colombia y América Central (Venkateswara Rao A. , 2008) (Rubio *et al*, 2012). Los *Vibrio harveyi* y *V. parahaemolyticus* están asociados con infecciones bacterianas en camarón y generalmente se las considera patógenos oportunistas enfermando al camarón cuando este se encuentra estresado (Ankenman *et al*, 2012).

Los vibrios tienen la capacidad de afectar los diferentes estadios del desarrollo del camarón, provocando rangos de mortalidad variables dependiendo del sitio u órgano afectado. La vibriosis se puede expresar de diferentes formas: vibriosis sistémica y hepatopancreatitis séptica, vibriosis oral y entérica, vibriosis de los apéndices y cuticular, vibriosis localizada en las heridas y enfermedad de la cutícula del cefalotórax (Morales & Cuéllar-Anjel, 2008).

2.2.1.1. Vibriosis localizada:

En esta forma de vibriosis los focos de infección generalmente se encuentran delimitados por células hemocíticas, las cuales se encuentran formando cápsulas o tapones. Estos focos usualmente se encuentran melanizados, y es posible observar a las bacterias sea dentro de la lesión o adyacente a las mismas.

Las lesiones de este tipo pueden deberse a: infecciones lacerantes, raspones o heridas causadas por objetos punzantes, infección bacteriana secundaria del exoesqueleto como resultado de condiciones ambientales extremas o toxicidad química, infección bacteriana secundaria como resultado de la pérdida del epitelio de la mucosa intestinal, del ciego medio anterior o del hepatopáncreas causado por enteritis hemocítica (EH), abscesos focales dentro del hepatopáncreas causados por parásitos, infecciones virales o por causas desconocidas. (Lightner & Pantoja, 2009)

2.2.1.2. Vibriosis Sistémica:

También conocida como el Síndrome de la gaviota (“sea gull síndrome”) en áreas en donde se cultiva principalmente *P. vannamei*, esto, debido a la presencia de gaviotas en los estanques de engorda que se alimentan de los camarones moribundos, que se observan en la superficie y nadando en las orillas de los estanques.

Las especies de vibrios involucradas son con mayor frecuencia: *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. harveyi* (Lightner & Pantoja, 2009).

Esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en las instalaciones de cultivo alrededor del mundo. Se observan mortalidades altas (hasta un 90%), en juveniles y camarones tempranos. Se la considera una infección generalizada, debido a que involucra a la cutícula, hepatopáncreas, órgano linfoide, glándula antenal, corazón, hemolinfa y músculo. (Morales & Cuéllar-Anjel, 2008).

La característica principal para la diagnosis de esta enfermedad es la presencia multifocal de nódulos hemocíticos con centros sépticos, los cuales pueden o no estar melanizados. Dichos nódulos se pueden observar con frecuencia dentro del órgano linfoide, el corazón y las branquias, pero de la misma manera no es raro encontrarlos en espacios del hemoceloma y el tejido conectivo esponjoso en cualquier parte del cuerpo del camarón. (Lightner & Pantoja, 2009)

Cuando la enfermedad se encuentra en fase inicial se observan algunos organismos con opacidad muscular y tracto digestivo vacío y en la fase grave es posible observar organismos con expansión de los cromatóforos, hepatopáncreas inflamado y en algunos camarones luminiscencia. Por observación en fresco en el microscopio se observa atrofia del hepatopáncreas, mayor desprendimiento celular, células con núcleos hipertrofiados, coloración pálida (desaparece el color naranja), textura blanda

y edematosa (fluido blanquecino al realizar la disección), melanización, además se observa atrofia tubular, necrosis de las células y de los túbulos del hepatopáncreas, así como también es posible observar gran cantidad de masas de bacterias y de nódulos hemocíticos en el hepatopáncreas (Morales & Cuéllar-Anjel, 2008).

En larvas y postlarvas hay algunos síntomas claros de vibriosis que incluyen: la melanización y necrosis de la punta de los apéndices, la presencia de numerosas y visibles bacterias en el hemocele de organismos moribundos. Los signos clínicos también incluyen inflamación tanto del hepatopáncreas como del tejido muscular infectado, normalmente contiene un fluido de apariencia lechosa en los lugares donde se da la inflamación (Gómez *et al*, 2001).

2.2.2. Erosión bacteriana del caparazón:

Esta enfermedad se presenta en juveniles y adultos de todas las especies de camarones penaeidos, se manifiesta en forma de manchas cafés o negras en el exoesqueleto, siendo las heridas las que permite la entrada de bacterias quitinolíticas como *Vibrio sp.* y de bacterias oportunistas (Morales & Cuéllar-Anjel, 2008).

Las manchas se producen al acumularse la melanina (producto final de la respuesta inflamatoria en crustáceos) y desaparecen con la muda si la lesión que las originó no llegó a afectar las membranas internas y el músculo (Morales & Cuéllar-Anjel, 2008).

Esta enfermedad debe ser controlada en virtud de que puede llegar a convertirse en una infección grave denominada “astillas negras”, la cual penetra al músculo dañándolo severamente o, llegar hasta una vibriosis sistémica atacando todos los órganos y tejidos del camarón, principalmente al hepatopáncreas.

2.2.3. Hepatopancreatitis

En el diagnóstico de esta patología deben diferenciarse dos procesos causantes de hepatopancreatitis, uno de estos es una infección bacteriana extracelular con proliferación de hemocitos y la formación de nódulos hemocíticos como respuesta del sistema inmune al acumulo de bacterias denominado hepatopancreatitis necrotisante séptica (NHP-S) causada principalmente por cepas patogénicas del género *Vibrio*; la otra es la hepatopancreatitis necrotizante bacteriana (NHP-B) producida por bacterias intracelulares obligada del tipo de las rickettsias donde la respuesta del sistema inmune no es inmediata y se forman cápsulas multifocales para inhibir el patógeno (Rubio *et al*, 2012).

2.2.4. Síndrome de Zoea II

El síndrome de Zoea II ha sido reportado como una enfermedad que causa altas mortalidades en el estadio de Zoea II de camarones blancos y azules. Ataca el hepatopáncreas, intestino medio y posterior. Se reportó que en Ecuador, el agente

causal de esta enfermedad es *Vibrio harveyi*, mientras que otros autores reportan la posible presencia de bacterias intracelulares.

Se presentan altas mortalidades después de 36-48 horas de haber pasado de Zoea I a Zoea II, las sintomatologías más importantes son la anorexia, rápida evacuación del contenido intestinal, letargo con nado errático y la permanencia en el fondo del tanque de los organismos infectados (Morales & Cuéllar-Anjel, 2008).

2.2.5. Enfermedad de luminiscencia

Esta enfermedad ha sido responsable de reducciones de hasta un 70% en la productividad en los laboratorios de larvicultura de muchos países de América Latina. Durante los episodios de alta mortalidad se han aislado las especies *Vibrio harveyi* y *V. splendidus* principalmente (Gómez *et al*, 2001). Los organismos infectados con esta bacteria se observan con luminiscencia, letargo (disminución de la actividad normal), nado errático, permanencia en el fondo del tanque y mortalidades masivas (Morales & Cuéllar-Anjel, 2008).

Las larvas infectadas por este tipo de bacterias presentan una colonización masiva en los apéndices y en el inicio del tracto digestivo y región oral. Posteriormente, conforme la infección avanza, las bacterias van colonizando el intestino medio y el hepatopáncreas para terminar en una septicemia generalizada (Gómez *et al*, 2001).

Para el control de esta enfermedad de luminiscencia, es necesario aplicar tratamiento mediante el empleo de antibióticos, con la previa realización de antibiogramas, en algunos casos es necesario desechar todos los organismos y desinfectar los tanques de larvicultura. (Morales & Cuéllar-Anjel, 2008).

2.3. Características de las especies de patógenos que se emplearán.

2.3.1. *V. parahaemolyticus*

El *Vibrio parahaemolyticus* es un microorganismo halofílico marino ampliamente distribuido en el agua de las costas, sedimento y plancton, este puede causar una gastroenteritis aguda en el ser humano al ser ingerido en pescado o mariscos crudos, insuficientemente cocidos o en alimentos que han sido contaminados con este microorganismo (contaminación cruzada) después de su preparación culinaria (Pascual Anderson & Calderón, 1999).

Existen algunos clones patogénicos de este organismo, algunos de los cuales tienen distribución mundial, y otros son propios de algunas regiones específicas. Densidades de *V. parahaemolyticus* en el medio marino y en los animales, fluctúa de acuerdo a la estación, locación, etc. No se conoce la dosis infectante requerida para ocasionar un

cuadro gastroenterítico, por lo que las características de los brotes epidémicos varían ampliamente de acuerdo a la región (San Cristóbal *et al*, 2008).

V. parahaemolyticus pertenece a la familia Vibrionaceae. Esta especie está integrada por formas bacilares con tendencia al pleomorfismo, sin esporas ni cápsulas, son mótils y se desplazan mediante un único flagelo polar. Son gram negativas, anaerobias facultativas con metabolismo oxidativo y fermentativo. Su crecimiento es más activo entre valores de pH 7,5 a 8,5. La temperatura del agua es el factor más importante que controla los niveles ambientales de *V. parahaemolyticus*, las densidades se incrementan a partir de los 10°C hasta los 30°C (Fratamico *et al*, 2005). Crecen entre 15-43°C, con temperatura óptima a 37°C (Pascual Anderson & Calderón, 1999).

El *V. parahaemolyticus* puede encontrarse en un rango de salinidad entre 5 y 35ppt, con una salinidad óptima de 22ppt (Fratamico *et al*, 2005). Necesitan al menos tres por ciento de salinidad para su desarrollo. Se multiplican con tasas de cloruro sódico del seis y ocho por ciento, pero no en ausencia de cloruro sódico (Pascual Anderson & Calderón, 1999).

El *V. parahaemolyticus* ha sido aislado de aguas estuarinas de todos los continentes. Su distribución muestra una marcada variación estacional. Durante los meses fríos, se lo encuentra en el sedimento marino y durante los meses cálidos, cuando la

temperatura del agua es superior a los 15°C, se lo encuentra en aguas costeras y estuarinas (Acha & Szyfres, 2001). Como consecuencia de su presencia en el agua, esta especie bacteriana se encuentra en peces, crustáceos y moluscos de costas y estuarios. En el camarón, las mayores fuentes de especies de *Vibrio* pueden ser sedimento, agua y alimento. Sin embargo, hay la posibilidad de que alimentos de origen natural tales como: algas, plancton e invertebrados, entre los que se encuentran los copépodos y zooplancton, puedan ser también contribuidores de éstos patógenos (Ankenman, 2012).

Este vibrio es usualmente resistente a ampicilina y carbenicilina, pero es susceptible a colistina, mientras que el *V. vulnificus* tiene la susceptibilidad opuesta (Dworkin & Falkow, 2006). Además descarboxilan la lisina y la ornitina. Fermentan el manitol, la arabinosa y la manosa, no fermentan la sacarosa, lactosa, inositol, ni ramnosa. No forman acetil-metil-carbinol (prueba de Voges Proskauer negativa) (Pascual Anderson & Calderón, 1999) (Zamora *et al*, 2005).

Brotos de gastroenteritis debido a *V. parahaemolyticus* ocurren en todo el mundo, pero no son muy comunes en Estados Unidos. En Japón, es un agente diarreico extremadamente importante, causa entre 50 y 70% de los casos de enteritis transmitidas por alimentos, todos los brotes fueron asociados directa o indirectamente con alimentos provenientes del mar, también es la especie de vibrio aislada con mayor frecuencia de muestras clínicas de Estados Unidos, y está asociada

principalmente con diarrea aunque se la ha aislado también de sitios extraintestinales (San Cristóbal *et al*, 2008). Infecciones directas provienen de la ingestión de pescado crudo o mariscos contaminados con esos microorganismos. Este mecanismo de transmisión es aparentemente muy común en Japón debido a la costumbre de comer pescado crudo. Aparentemente el mecanismo indirecto de infección es la contaminación después de cocinar (Dworkin & Falkow, 2006).

El *V. parahaemolyticus* solamente actúa como patógeno para el hombre, y no se lo encuentra en las heces de individuos sanos, sin embargo es abundante en las de enfermos afectados de esta gastroenteritis (Pascual Anderson & Calderón, 1999).

Dalsgaard *et al.* (1995) estudió la presencia de *V. cholerae* en un total de 107 muestras que incluían agua, sedimento, camarón, alimento, intestino de camarón, y estiércol de pollo. Los resultados indicaban que existía *V. parahaemolyticus* en todas las muestras durante el cultivo, con la excepción de la cepa Kanagawa-positivo en el alimento formulado.

Se ha encontrado que este microorganismo aparece más comúnmente en camarón y otros crustáceos que en peces debido a que tiene actividad quinolítica (Ankenman Granata, Flick, & Martin, 2012). Debido a esto se adhiere a las superficies de quitina, y sobre ellas incrementa su concentración, ya que los nutrientes que necesita se encuentran más disponibles.

El desarrollo de esta bacteria es muy rápido, tiene un tiempo de generación de 9 minutos en medios de cultivo y 12 minutos en alimentos provenientes del mar (Fratamico *et al*, 2005), lo que hace que la presencia de un pequeño número, en pescado recién capturado, se transforme en una cifra elevada al cabo de algunas horas, si la temperatura es favorable.

El desarrollo del *V. vulnificus* ocurre muy lentamente a los 10°C, y deja de desarrollarse entre 5 y 8°C. La congelación de los productos marinos, además de evitar el desarrollo de este vibrio, logra su decrecimiento (Pascual Anderson & Calderón, 1999).

La ebullición inactiva rápidamente a este patógeno, cifras apenas por encima de la máxima para su crecimiento destruyen al 90% de la población de un cultivo en menos de una hora, además se puede destruir este microorganismo utilizando temperaturas de 60°C aplicadas durante 15 minutos (Pascual Anderson & Calderón, 1999). Los yodóforos parecen ser más efectivos que el cloro en la desinfección de ostiones contaminados cuando el tratamiento se aplica a una concentración de 25 mg/L (Zamora *et al*, 2005).

2.3.2. *V. vulnificus*

Hollis *et al* lo describieron por primera vez en 1976 y se le denominó “vibrio lactosa positivo”, posteriormente se le llamó *Beneckea vulnificus* y finalmente *V. vulnificus*

(Dworkin & Falkow, 2006). Pertenece a la familia Vibrionaceae, son bacilos gram negativos rectos y curvos, no son formadores de esporas, presentan un flagelo polar con el cual se movilizan, son termolábiles, oxidasa positivos, y se comportan como anaerobios facultativos (Dávalos, 2005).

V. vulnificus es similar fenotípicamente al *V. parahaemolyticus*, las características más distintivas del *V. vulnificus* son la fermentación de la lactosa y producción de Beta-D-galactosidasa, estos son los principales test bioquímicos que se pueden usar para distinguirla del *V. parahaemolyticus* (Lynn, 2008).

Comúnmente se los encuentra en el agua de los estuarios de climas tropicales y puede estar presente en alimentos de origen marino como crustáceos, moluscos bivalvos (ostiones, almejas, etc.), y también pescados, todos estos tienen un importante papel en la transmisión de agentes infecciosos debido a que en muchas partes del mundo, como Japón, tienen la costumbre de consumirlos crudos o insuficientemente cocidos (Dávalos, 2005).

Este microorganismo tiene la capacidad de adherirse a las células, se ha sugerido que la presencia de pili sea el factor que ayude a la adhesión, que le permite tener una gran capacidad invasiva. Produce, además, enzimas como factores de virulencia que dañan la permeabilidad vascular como la elastinasa, lecitinasa, fosfolipasas, mucinasa, proteasas, elastasa, metaloproteasa, condroitina sulfatasa. El polisacárido

semejante al capsular es señalado como el principal factor de virulencia, por la capacidad de atrapar el hierro del huésped, y la resistencia a la fagocitosis (Dávalos, 2005).

Tanto la temperatura como la salinidad son factores importantes en los niveles de *Vibrio spp.* El *V. vulnificus* puede ser encontrado en aguas con salinidades desde 0,8ppt hasta los 35ppt, varios estudios han demostrado que a salinidades entre 5 y 25ppt, los niveles de esta bacteria aumentan, sin embargo, su salinidad óptima varía considerablemente de lugar en lugar (World Health Organization, 2005) (Lynn, 2008). Por otra parte si las tasas de salinidad eran de: 30, 35, y 38ppt, los niveles de *V. vulnificus* disminuían en un 58, 88 y 83% respectivamente (Lynn, 2008).

Además de la salinidad, otro factor que es determinante de las densidades de *V. vulnificus* en el agua es la temperatura, se ha reportado que este vibrio crece a temperaturas tan bajas como 13°C, pero su densidad en el ambiente disminuye a temperaturas por debajo de los 20°C. Las concentraciones más altas se presentan entre los 20°C y 30°C de temperatura del agua (World Health Organization, 2005), sin embargo, hay estudios en los cuales se ha reportado que se ha logrado aislar en Chesapeake Bay a 8°C de temperatura (Lynn, 2008). Los bajos pH son letales para este organismo (World Health Organization, 2005).

Los niveles de estas bacterias en el agua y en los animales varían de acuerdo a las estaciones por lo que es más abundante en lugares con clima cálido que en las costas frías de Estados Unidos. *Vibrio vulnificus* ha sido implicado, en infecciones humanas, durante el verano en países como Taiwán, Japón, Estados Unidos, Dinamarca, Alemania, Suecia, Holanda y Bélgica (Dávalos, 2005).

Este microorganismo no solo se encuentra en la columna de agua, también está presente en el sedimento marino, plancton y otras formas de vida marina, forma parte de la microflora natural del zooplancton, especialmente en aquellos con exoesqueleto quitinoso tales como los copépodos (Lynn, 2008).

Aunque los niveles de *V. vulnificus* son mayores en el agua estuarina durante las estaciones cálidas, este organismo puede sobrevivir a lo largo de todo el año, incluso en los meses fríos. Existen varias formas a través de las cuales esta bacteria logra persistir durante todo el año, una de esta puede ser debido a que logra persistir en sedimento marino y cuando las condiciones medioambientales son favorables para su crecimiento entonces empieza colonizando el plancton (Lynn, 2008). *V. vulnificus* ha sido aislado de una gran variedad de ecosistemas tales como las costas del Golfo de México, Océano Atlántico y el Océano Pacífico (Dávalos, 2005).

Aunque alrededor del mundo el *V. cholerae* es el patógeno alimenticio proveniente de mariscos más importante, el *V. vulnificus* es que tiene una mayor tasa de

fatalidad/caso de cualquier otro patógeno de origen alimenticio: más del 50% de las infecciones por *V. vulnificus* son fatales (World Health Organization, 2005) (Fratamico *et al*, 2005). Aproximadamente un 7% de la población adulta de Estados Unidos es susceptible a infecciones de *V. vulnificus*. Pero un estimado real de la población susceptible es algo imprecisa debido a las definiciones variadas de los casos de las condiciones de la enfermedad (World Health Organization, 2005).

Puede infectar al ser humano mediante exposición de heridas o consumo de alimentos proveniente del mar. Estas infecciones son raras y generalmente limitadas a individuos inmunocomprometidos o con enfermedades crónicas pre-existentes. Sin embargo *V. vulnificus* puede invadir el torrente sanguíneo a través de la barrera intestinal (septicemia primaria). Aunque el *V. vulnificus* ha sido encontrado en una variedad de crustáceos, bivalvos y peces en el mundo, y se han reportado enfermos en numerosos países, su epidemiología, ecología y distribución en mariscos ha sido más ampliamente investigada en los Estados Unidos. Cada año, entre 30 y 40 casos de septicemia primaria son reportados ese país (World Health Organization, 2005).

La infección en heridas ocurre cuando estas son expuestas al agua de mar o alguna otra fuente portadora de este microorganismo, por ejemplo mariscos contaminados. La tasa de mortalidad debido a estas infecciones, aproximadamente un 7%, no es tan alta en comparación a la tasa de mortalidad debida a la septicemia primaria (50%)

(Dworkin & Falkow, 2006). La infección puede progresar hasta causar un síndrome llamado septicemia primaria.

En el caso de la gastroenteritis los primeros síntomas ocurren unas 16 horas después de haber sido ingerido el alimento contaminado. La sintomatología primaria incluye: dolor abdominal, vómito y diarrea (Dávalos, 2005). Se desconoce la dosis infectiva.

Infecciones de *V. vulnificus* transmitidas por alimentos están claramente asociadas con condiciones médicas subyacentes entre estas las enfermedades hepáticas son uno de los factores de riesgo importantes en infecciones por *V. vulnificus*, incluyendo cirrosis debida al consumo de alcohol. Factores adicionales de riesgo incluyen: diabetes, desordenes gastrointestinales (cirugías, úlceras), condiciones hematológicas, e inmunodeficiencia debida a condiciones como cáncer y tratamiento de condiciones crónicas con agentes inmunosupresores (artritis, etc.) (World Health Organization, 2005).

En individuos inmunocomprometidos y alcohólicos, actúa 24 horas después de la ingestión de las bacterias. Infecta el torrente sanguíneo caracterizado por fiebre, escalofrío, y los niveles de hierro son elevados en suero hasta la disminución de la presión sanguínea llegando al shock séptico (Dávalos, 2005).

La septicemia primaria y la infección en heridas como edemas y úlceras son condiciones de alta letalidad (60%), la dosis infectiva para que se presente esta sintomatología se presume que es de menos de 100 (Dávalos, 2005). Es usualmente asociada con el consumo de mariscos crudos y es definida como una enfermedad sistemática caracterizada por fiebre y shock, y en la cual el *V. vulnificus* es aislado de la sangre o de otro sitio estéril (Lynn, 2008).

El *V. vulnificus* produce toxinas extracelulares como la citolisina que destruye los eritrocitos (también se le denomina hemolisina), lisa los glóbulos rojos y la citotoxina. Afortunadamente, estas infecciones son relativamente raras y, en promedio, el CDC (Centers for Disease Control and Prevention) reporta anualmente 32 casos confirmados por cultivos de septicemia primaria causada por *V. vulnificus* (Lynn, 2008), casi todos estos asociados al consumo de ostras cultivadas en el Golfo de México.

Otras infecciones de las que *V. vulnificus* ha sido aislado incluyen neumonía en una víctima de ahogamiento y endometritis que se desarrolló en una mujer después de su exposición al agua de mar (Dworkin & Falkow, 2006).

La virulencia del *V. vulnificus* es multifacética y no muy bien comprendida. En realidad, varios factores de virulencia han sido reportados para este organismo, incluyendo: una cápsula polisacárida, varias enzimas extracelulares, exotoxinas, y la

habilidad para obtener hierro de transferrina. La ausencia de estrógeno también ha sido citada como un factor ligado al huésped que incrementa el riesgo de infección. La presencia de cápsula, la cual también está relacionada con la opacidad de la colonia, probablemente es el factor de virulencia mejor conocido. *V. vulnificus* es un patógeno extracelular que se apoya en su cápsula polisacárida para evadir ser fagocitado por las células de defensa del huésped (Lynn, 2008).

Los responsables de que el número de *V. vulnificus* en los productos de la pesca se incrementen en un momento dado son la temperatura, el pH, la salinidad y el incremento de la materia orgánica, entre otras. *V. vulnificus* se encuentra en las costas del Golfo de México, en ostiones y agua durante la época de lluvias o cuando la temperatura del agua es elevada (23°C); y se ha estimado que de abril a octubre el 40 % o más de los ostiones capturados en las costas del Golfo de México pueden contener a este patógeno, mediante una asociación simbiótica entre el bivalvo y la bacteria que se adhiere (Dávalos, 2005).

V. vulnificus es más sensible que otras especies de vibrios y que otros patógenos de origen alimenticio a las técnicas de inactivación usadas en el procesamiento de alimentos. Un ligero tratamiento de 50°C por minutos reduce un 6log₁₀ de esta bacteria en la carne de ostras sacadas, mientras que congelando las ostras a -40°C y almacenado por 3 semanas obtiene una reducción de la población natural de *V. vulnificus* en 4 a 5log₁₀ (World Health Organization, 2005).

Para el aislamiento del microorganismo se emplean medios de cultivo que son selectivos y diferenciales entre los que se tiene el TCBS (Agar tiosulfato sales biliares sacarosa) y el CPC-Agar (Agar celobiosa-polimixina β -colisitina), con los cuales se incrementan las posibilidades de aislar al microorganismo. Posteriormente se realizan pruebas de halofilismo (diferentes concentraciones de sal 0%, 3%, 6%, 8%, 10% de NaCl). Para descartar otros tipos de vibrios, se realizan pruebas de oxidasa y pruebas bioquímicas para su confirmación (Dávalos, 2005).

2.3.3. *V. harveyi*

Es una de las especies de *Vibrio*, Johnson y Shunk fueron los primeros en describirla en el año 1936. Anteriormente estaba clasificada como *Lucibacterium* y *Beneckeia*, pero ahora está incluida dentro del género *Vibrio*. Muchas de sus cepas son Bioluminiscentes, pero también existen cepas que no lo son y que son difíciles de distinguir de otros vibrios (Dworkin & Falkow, 2006). Es un organismo Gram negativo, que requiere cloruro de sodio para vivir (Austin & Zhang, 2006).

V. harveyi ha sido aislada de varias locaciones geográficas, se la ha encontrado tanto en las costas como en el océano en aguas abiertas. También se la ha aislado en heces de peces y de calamares (Dworkin & Falkow, 2006).

La gran diversidad de *V. harveyi* plantea ciertas dificultades en la determinación bioquímica del medio ambiente y la identificación de especies de vibrio. Se concluyó que los criterios bioquímicos no son siempre suficientes para distinguir entre especies de vibrio debido a su carácter variable (West *et al*, 1986). El ADN de esta bacteria contiene 46-48 mol% de GC (Dworkin & Falkow, 2006).

Con el rápido desarrollo de la acuicultura de todo el mundo, especialmente de Asia y América del Sur, el *V. harveyi* ha sido reconocido como un patógeno al que hay que tomar en consideración. Causante de problemas de enfermedades en los cultivos de invertebrado marinos, entre estos el del camarón penaeidos, uno de los cultivos de mayor importancia (Austin & Zhang, 2006).

Los *Vibrios spp.* son bacterias de la microflora normal de los camarones peneidos, pero también son agentes patógenos oportunistas que pueden tomar ventaja de los cambios ecológicos que ocurren dentro de los estanques en los cultivos acuícolas, ocasionando diferentes enfermedades, lo que puede causar bajas sobrevivencias y pérdidas económicas en la producción de camarón (Aguirre *et al*, 2013).

Entre las enfermedades que ocasiona el *V. harveyi* se encuentran: las manchas blancas del pie en los abalones japoneses, vibriosis luminiscente y las bolitas negras en camarones penaeidos, ulceraciones en la piel de los pepinos de mar, entre otras (Austin & Zhang, 2006).

En un estudio se observó concentraciones de *V. harveyi* en el agua de 10^5 y 10^7 UFC/ml se generó una sobrevivencia baja significativa en las larvas de *Litopenaeus vannamei*, siendo la última dosis la que presentó los valores más bajos de sobrevivencia. Además que los subestadios larvales y en el de postlarva 1 fueron más resistentes a este patógeno al aumentar la edad de los mismos (Aguirre *et al*, 2013).

V. harveyi es una bacteria marina que utiliza el quorum sensing, entre otras señales medioambientales, para modular su Bioluminiscencia, sin embargo, se desconoce los beneficios que recibe de esta Bioluminiscencia (Dworkin & Falkow, 2006). A pesar de que es una bacteria gran negativa, el mecanismo de su quórum sensing posee características tanto de bacterias gran negativas como de gran positivas. Al igual que otras gran positivas, el *V. harveyi* responde a los autoinductores AHL, pero en contraste con estas bacterias y al igual que las gram positivas, la detección del autoinductor es llevada a cabo por un circuito de 2 componentes (Dworkin & Falkow, 2006).

2.3.4. Pseudomonas spp.

Los patógenos bacterianos que afectan al camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei* generalmente se encuentran en el ambiente marino de forma natural, comportándose como oportunistas cuando el camarón se encuentra estresado o debilitado al atacar a

los animales haciéndolos altamente sensibles a las enfermedades con graves implicaciones para el cultivo (Rubio *et al*, 2012).

Las bacterias del género *Pseudomonas* son causantes de altas mortalidades en el cultivo de camarón, son bacterias muy patógenas y muy comunes a baja salinidad y se combaten mayormente con el uso de probióticos (Rubio *et al*, 2012). De acuerdo con Moriarty (1990), vibrios y pseudomonas son los géneros más comunes presentes en los crustáceos.

Existen especies de *Pseudomonas* que pueden afectar los cultivos acuícolas como la *Pseudomonas aeruginosa*, que es un patógeno oportunista que puede llegar a ser mortal para los camarones de cultivo a lo largo de su ciclo Biológico desde sus etapas tempranas de postlarvas a las de juveniles y adultos (Carvajal, 2008).

Esta bacteria puede estar presente en el agua o en el sedimento de los estanques de cultivo, y afecta no sólo a los animales sino también a las personas (León, 1999). Al *P. aeruginosa* se lo encuentra tanto en los suelos como en el agua, es un patógeno oportunista de plantas y animales, y es el patógeno humano más importante del género *Pseudomonas* debido al número y tipo de infecciones causadas, y a la morbilidad y mortalidad asociadas (Ruiz, 2007).

La presencia de manchas color café a negro en el camarón *Litopenaeus vannamei* constituye un síndrome relacionado con infecciones en la cutícula, apéndices o branquias (Rubio *et al*, 2012), se la conoce como “enfermedad del caparazón” y es causada por patógenos oportunistas, entre ellas se encuentran las *Pseudomonas* y *Aeromonas* (Ibarra, 1999) Según Edgerton (2004) esta enfermedad, como afección general, puede estar relacionada tanto con hongos como con bacterias, siendo: *Vibrios*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Citrobacteres* los géneros bacterianos más comunes (León, 1999). La presencia de estas manchas en el cefalotórax causa depreciación del valor comercial del producto.

Rubio *et al* (2012), valoración clínica y diagnóstica mediante bacteriología e histopatología de organismos juveniles sometidos a estrés por bajas temperatura. En este trabajo se observó la presencia de manchas de color carmelitas oscuros a negras en el exoesqueleto y apéndices, postura encorvada, músculos infectados por los géneros *Pseudomonas* y *Aeromonas* con inflamación y necrosis, unido a una elevada mortalidad. Entre los patógenos que se identificaron en estas lesiones, los géneros *Aeromonas* y *Pseudomonas* coincidieron con el estudio de Edgerton (2004), y se lograron identificar las especies *P. alcaligenes*, *P. anguilliseptica*.

Las bacterias asociadas con la enfermedad de la cutícula del cefalotórax (enfermedad de la “concha”) pueden ingresar a través de las heridas o poros. También pueden penetrar a través de las branquias y el intestino medio, en el primer caso es debido a

que están cubiertas por un exoesqueleto delgado, y en segundo caso se debe a que esa parte del intestino no está revestido por un exoesqueleto. Estos lugares constituyen además los sitios de probable de penetración de patógenos presentes en el agua, alimento y sedimento (Rubio *et al*, 2012).

Pseudomonas spp. también ha sido reportada como agente causal de otra enfermedad del camarón junto con el *V. parahemolyticus* y *V. damsella*, esta enfermedad se la conoce como síndrome de la mortalidad de los estanques de Texas y ha sido reportada en *P. vannamei* de la costa central y sur de Texas (Ibarra, 1999).

2.4. Características de los posibles biocontroladores.

2.4.1. Bacterias provenientes de la Antártida

Durante la última década se han incrementado considerablemente las investigaciones de microorganismos encontrados en ambientes extremos, en especial bacterias y hongos que forman parte de la microbiota del Ártico y la Antártica, que dadas sus características o las propiedades de sus enzimas tienen un gran potencial como biorrecursos de aplicación biotecnológica (Baeza *et al*, 2010).

La Antártida posee poblaciones particulares de microorganismos con flujo genético restringido, lo que resulta en un recurso genético único y muy poco estudiado. Por lo tanto, el estudio de bacterias provenientes de este ambiente resulta interesante dado

que estas poseen moléculas adaptadas a las condiciones inusuales de su ambiente, representando una fuente importante de nuevos compuestos bioactivos (Lavin, 2012).

Esta región además posee una biodiversidad de microorganismos que aún está lejos de ser conocida, en los escasos trabajos realizados a la fecha, se ha encontrado que más de la mitad de los aislados bacterianos obtenidos corresponden a levaduras taxonómicamente no descritas previamente capaces de vivir en condiciones extremas de bajas temperaturas, han debido realizar adaptaciones fisiológicas y bioquímicas de sus funciones celulares vitales tales como replicación y transcripción del DNA, sistemas generadores de energía, transporte y captación de los nutrientes disponibles (Baeza *et al*, 2010). Todas estas características de adaptación hacia el frío han atraído la atención de diversos sectores debido a la posibilidad de que sean explotadas en una gran cantidad de áreas industriales.

La búsqueda de nuevos compuestos con actividad antibacteriana producidos por bacterias antárticas es un campo emergente de relevante importancia, en virtud de que la Antártica es un ambiente extremo que puede tener poblaciones únicas de microorganismos que producen nuevas clases de sustancias antagonistas, incluyendo antibióticos (Baeza *et al*, 2010).

La Antártica posee una biodiversidad de microorganismos que aún está lejos de ser conocida, en los escasos trabajos realizados a la fecha, se ha encontrado que más de

la mitad de los aislados obtenidos corresponden a levaduras taxonómicamente no descritas previamente capaces de vivir en condiciones extremas de bajas temperaturas, han debido realizar adaptaciones fisiológicas y bioquímicas de sus funciones celulares vitales tales como replicación y transcripción del DNA, sistemas generadores de energía, transporte y captación de los nutrientes disponibles (Baeza *et al*, 2010). Todas estas características de adaptación hacia el frío han atraído la atención de diversos sectores debido a la posibilidad de que sean explotadas en una gran cantidad de áreas industriales.

La búsqueda de nuevos compuestos con actividad antibacteriana producidos por bacterias antárticas es un campo emergente de relevante importancia, debido a que la Antártica es un ambiente extremo que puede tener poblaciones únicas de microorganismos que producen nuevas clases de sustancias antagonistas, incluyendo antibióticos (Baeza *et al*, 2010). Debido a las condiciones ambientales adversas, la producción de compuestos extracelulares con actividad antimicrobiana es una ventaja que reduce la competencia entre especies en los microorganismos (Wong *et al*, 2008).

Los resultados obtenidos en el proyecto “Biodiversidad y capacidades metabólicas de la comunidad bacteriana en diferentes hábitats de la Península Fildes (isla Rey Jorge) y cabo Shirreff (isla Livingston)”, financiado por el INACH, demuestran que bacterias aisladas de diferentes tipos de muestras en el territorio Antártico chileno,

son antagónicas para bacterias patógenas de importancia en acuicultura y salud humana (INACH, 2010).

En este estudio se aislaron bacterias que producen compuestos, al parecer, de naturaleza peptídica, activos sobre cepas de *Vibrio splendidus*, *V. parahaemolyticus*, *Halomonas spp.*, *Flavobacterium spp.* y *Aeromonas hydrophila*, importantes patógenos de peces y moluscos de importancia económica. Por otra parte, se demostró la capacidad inhibitoria de un compuesto obtenido a partir de una bacteria recuperada en península Fildes, sobre bacterias hospitalarias multirresistentes a antibióticos actualmente en uso, como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasas de espectro extendido (Baeza *et al*, 2010).

Por otra parte, en otro estudio en colaboración con el Dr. Michael Wong, de la Universiti Malaysia Sabah, se han encontrado que 28 cepas bacterianas de 2226 aisladas de la Península Fildes tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos transmitidos por alimentos, como son *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *S. typhi* y *V. parahaemolyticus*.

En un estudio por Kan *et al* en el 2012 se utilizaron cepas bacterianas aisladas de la Antártida para pruebas de antagonismo contra el *Vibrio anguillarum*. Uno de estos aislados, identificado como *Pseudoalteromonas*, mostró una alta capacidad

inhibitoria. El compuesto antibacterial aislado del sobrenadante de su cultivo mostró sensibilidad ante pH, temperatura y proteinasas. Las sustancias no pudieron ser disueltas en solventes orgánicos, pero pudo ser precipitado por sulfato de amonio, debido a estas características se presume que el compuesto puede ser algún tipo de proteína o péptido (Kan *et al*, 2012).

Otro estudio conducido por la Universidad de Concepción de Chile, encontró que 2 de las 67 cepas aisladas de la Antártida presentaban actividad inhibitoria en la formación de biopelículas de *Flavobacterium psychrophilum* (Leyton, 2012).

Seis cepas de bacterias aisladas de los alrededores del Lake Belem cercano a la Base Escudero, mostraron actividad inhibitoria contra *Klebsiella pneumonia*, adicionalmente, cepas aisladas de muestras provenientes del Glaciar Colin formaron zonas de inhibición contra varias muestras de patógenos (Wong *et al*, 2008).

En ambientes naturales, los antibióticos y otros metabolitos secundarios tienen múltiples funciones relacionadas a la supervivencia de los microorganismos, y su producción generalmente se produce durante la fase estacionaria con limitante de nutrientes (Hentschel *et al*, 2001).

2.4.2. Propiedades antimicrobianas de los Bioles.

Los Bioles son el producto líquido resultante de la descomposición anaeróbica de los estiércoles en biodigestores (Jiménez, 2011), en su elaboración también se emplean otros restos o materiales orgánicos, y agua (Díaz *et al*). El efecto de estos bioproductos está directamente relacionada con su calidad (Chávez *et al*, 2011), las zonas donde se producen y las materias primas utilizadas en su elaboración influyen sobre sus características (Chávez & Jiménez, 2009).

En la investigación realizada por Magdama *et al* (2011) se probó diferentes Bioles elaborados a partir de materias primas de varias provincias del Ecuador, en los resultados de su investigación se observan variaciones en la efectividad de los Bioles relacionadas con la procedencia de la materia prima, además el efecto inhibitorio también estaba relacionado con las concentraciones evaluadas.

Su uso ha sido relacionado con el combate de algunas enfermedades fungosas en diferentes cultivos del Ecuador (Chávez *et al*, 2011), entre las enfermedades que se ha probado el potencial uso de Bioles como biocontrolador se encuentra la de la Sigatoka negra, la cual ataca las plantas de banano y representa un serio problema en el cultivo de del mismo (Chávez & Jiménez, 2009). Otros trabajos como el de Magdama (2011) demostraron el efecto fungicida de Bioles de producción local frente a *M. royeri* (Magdama, 2010).

Chavez *et al* (2011) lograron reducir la incidencia de moniliasis (*M. royeri*) del 18% inicial a un 2% al término de la investigación, en el mismo trabajo también registraron una reducción de la incidencia de escoba de bruja (*M. pernicioso*) de un valor de 37% inicial a solo el 5% al finalizar el trabajo.

Las propiedades fúngicas de algunos Bioles probablemente se encuentra relacionada con compuestos termo-resistentes producidos por las poblaciones microbiales durante la fermentación (Magdama *et al*, 2011).

CAPITULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES:

3.1.1. Medios de cultivo

- Agar Base Sangre
- Nutrient Agar
- Triptose Soy Agar
- Potato Dextrose Broth

3.1.2. Equipos

- Medidor de densidad óptica McFarland
- Balanza
- Incubadora con shaker
- Incubadora de frío con shaker
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar

3.1.3. Materiales

- Cajas Petri plásticas (50mm de diámetro)
- Cajas Petri plásticas (90mm de diámetro)
- Puntas 200ul
- Puntas 1000ul
- Pre-filtro de jeringa de 0,45micras
- Filtro de jeringa de 0,45micras
- Jeringas de 10cc
- Kit de extracción de ADN
- Tubos Falcon (50ml)
- Guantes
- Asas de Platino
- Esparcidores
- Probeta de 250ml
- Matraz Erlenmeyer (500ml)
- Matraz Erlenmeyer (1000ml)
- Sacabocado #3
- Micropipeta (200ul)
- Micropipeta (1000ul)

3.1.4. Cepas Empleadas

3.1.4.1. Cepas patógenas

Se utilizarán cuatro cepas patógenas de camarones para las evaluaciones experimentales:

- *Vibrio harveyi*, aislada de camarones enfermos por el Centro de Servicios para la Acuicultura (Guayaquil, Ecuador).
- *V. vulnificus*, aislada de camarones enfermos por el Centro de Servicios para la Acuicultura (Guayaquil, Ecuador).

- *V. parahaemolyticus*, aislada de camarones enfermos por el Centro de Servicios para la Acuicultura (Guayaquil, Ecuador).
- *Pseudomona spp.* aislada de camarones enfermos por el Centro de Servicios para la Acuicultura (Guayaquil, Ecuador).

Estas cepas fueron seleccionadas para la realización de los test debido a que los patógenos *V. harveyi*, *V. vulnificus*, y *V. parahaemolyticus* son unos de los principales causantes de problemas por vibriosis en los estanques de cultivo de camarón. El aislado de *Pseudomona spp.* fue escogido debido a que también son bacterias oportunistas y se los encuentra presentes en enfermedades del camarón ocasionadas por vibrios.

3.1.4.2. Cepas antagonistas

Los aislados bacterianos a probar como posibles antagonistas de los patógenos antes mencionado son:

- 74 cepas aisladas de diferentes muestras de suelo de la Antártida por el CIBE e identificadas por código.
- 50 cepas aisladas de muestras de Biol por el CIBE, estas cepas están identificadas por código.

3.2. METODOLOGÍA:

3.2.1. Determinación del medio a utilizarse en las pruebas de antagonismo.

Antes de realizar las pruebas de antagonismo se realizó pruebas de crecimiento en diferentes medios de cultivo tanto de las cepas aisladas del Biol y del suelo de la Antártida como de las bacterias patógenas a utilizar. Los medios de cultivo usados fueron: agar nutritivo, Trypticase Soy Agar (TSA), Blood Base Agar, y el medio Potato Dextrose Agar (PDA), la salinidad con la que se trabajó fue de un 2%, la cual se consiguió agregando cloruro de sodio a los medios de cultivos.

- Pruebas de crecimiento de los patógenos en agar nutritivo, en medio TSA y en medio Blood Base agar con 2% de salinidad.
- Pruebas de crecimiento de las bacterias de la Antártida y del Biol en medio TSA al 2% salinidad.
- Pruebas de crecimiento de las bacterias de la Antártida y del Biol en medio Blood Base Agar con 2% de salinidad.

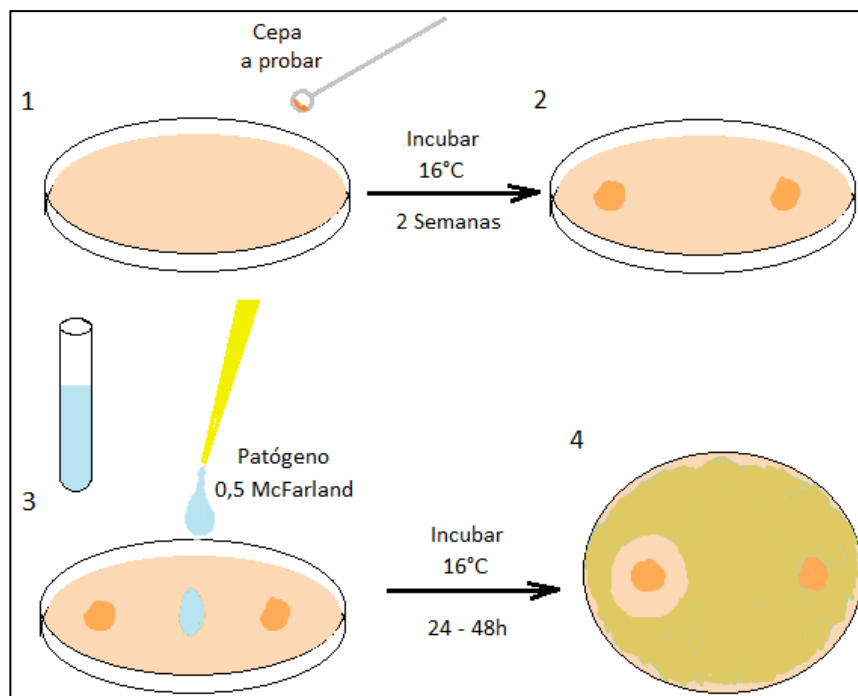
3.2.2. Pruebas de antagonismo Cepas de la Antártida vs patógenos camarón.

3.2.2.1. Primera prueba

1. Se tomó una caja Petri con medio Agar Sangre (2% de salinidad) para 4 cepas, y 2 cajas como réplica. Es decir, 57 cajas Petri para las cepas de la Antártida y por cada patógeno.

2. Con el asa se tomaron las cepas microbianas y se sembró 4 cepas de la Antártida por caja con 2 réplicas, y se las mantuvo en una incubadora de frío a 16°C.
3. Transcurridos diez días desde la siembran se colocaron 50ul del inocular del patógeno a 0,5 McFarland en el centro de cada caja petri con bacterias del Biol (la gota no debe tocar a las otras colonias presentes)
4. Se revisó cada 24 horas a partir de la inoculación del patógeno y se dibujó el contorno del crecimiento del mismo hasta que cubra a la cepa de la Antártida o se forme un halo de inhibición.
5. Repetir desde el paso dos para cada patógeno.

Figura # 1. Diagrama del primer método de inhibición empleado

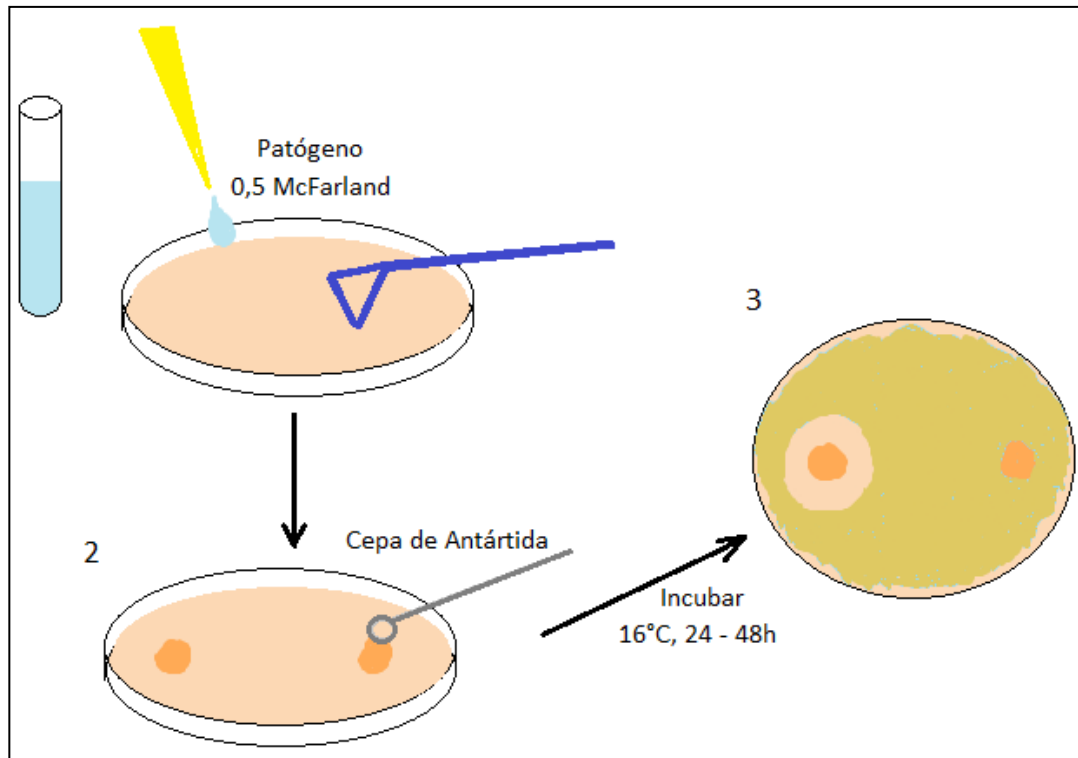


Elaborado por: Autor

3.2.2.2. Segunda prueba

1. Se utilizaron cajas Petri pequeñas (5cm de diámetro) con medio Agar Sangre (2% de salinidad), cuatro cepas por caja y dos replicas, es decir, 57 cajas Petri para las cepas de la Antártida. Además es necesario realizar un control del crecimiento de cada patógeno (control).
2. En cada caja se inoculó 50ul del patógeno a 0,5 McFarland y se realizó un screening.
3. Inmediatamente se sembraron las cepas de las bacterias de la Antártida con sus respectivas replicas.
4. Adicionalmente, para el control positivo, se realizó un screening del patógeno en dos cajas Petri.
5. Las cajas fueron incubadas a 16°C, y cada 24 horas se las revisó en caso de aparición de halos de inhibición.
6. Se repitió el mismo procedimiento para cada patógeno.

Figura # 2. Diagrama de la metodología empleada en la segunda prueba de inhibición.



Elaborado por: Autor

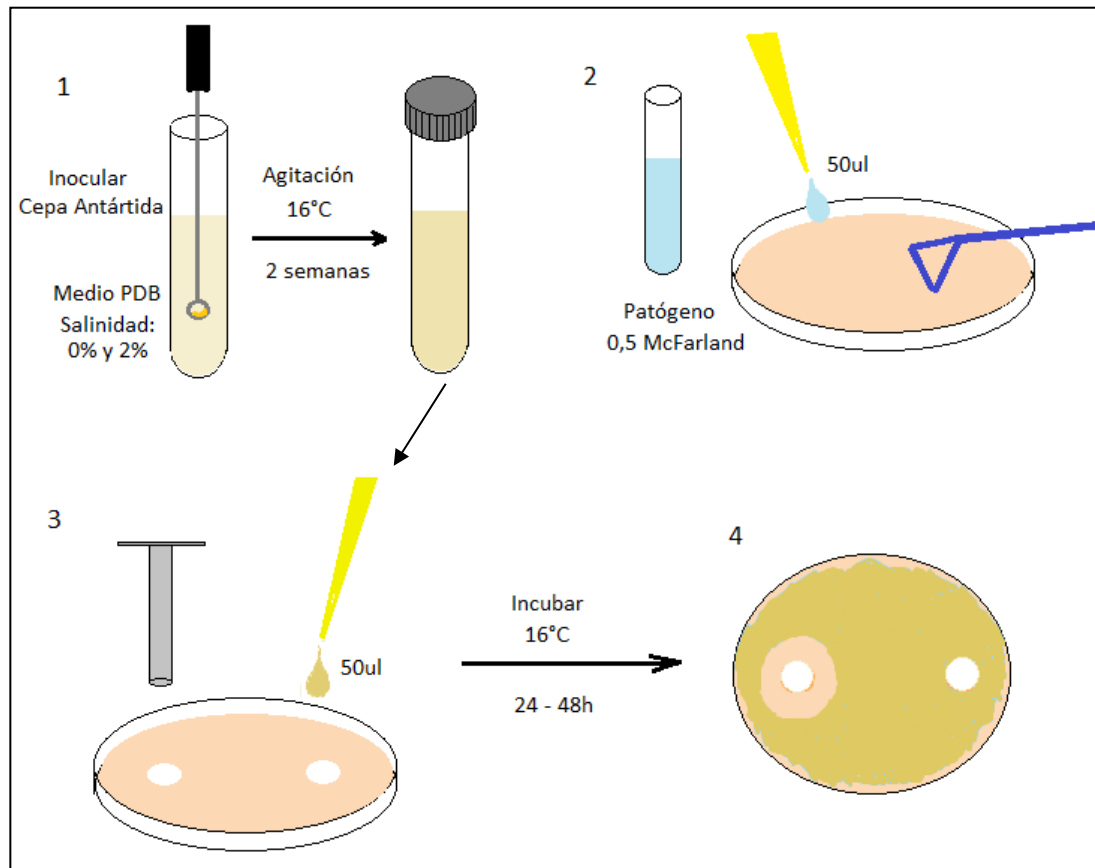
3.2.2.3. Tercera prueba:

1. Se utilizaron cajas Petri pequeñas (5cm de diámetro) con medio Agar Sangre (2% de salinidad), dos cepa por caja y dos replicas, es decir, 111 cajas Petri para las cepas de la Antártida. Además son necesarios dos controles positivos. (esto es para cada patógeno).

2. Las cepas de la Antártida se sembraron en tubos falcon con 10ml del medio líquido Potato Dextrose Broth. Se las incubó a 16°C y con agitación continua por dos semanas.
3. Al igual que en la prueba anterior se realizó un screening del patógeno (50ul a 0,5 McFarland por caja)
4. Con ayuda de un sacabocado se realizaron 2 pocillos en cada caja Petri y se colocó 50ul del cultivo de una cepa de la Antártida en un pocillo (2 cepas por caja). Mantener en refrigeración a 16°C. Tener en consideración que no puede transcurrir mucho tiempo desde el screening hasta la inoculación del antagonista o, en el caso de los vibrios, estos empezará a crecer.
5. Se repitieron los pasos 3 y 4 para cada patógeno.
6. Cada 24 horas se revisaron las cajas para observar la aparición del halo de inhibición.

La prueba fue repetida pero con la variante de la salinidad del medio de cultivo líquido del punto, que en esta ocasión contuvo un dos por ciento de salinidad.

Figura # 3. Diagrama de la metodología empleada en la tercera prueba de inhibición.



Elaborado por: Autor

3.2.2.4. Cuarta prueba:

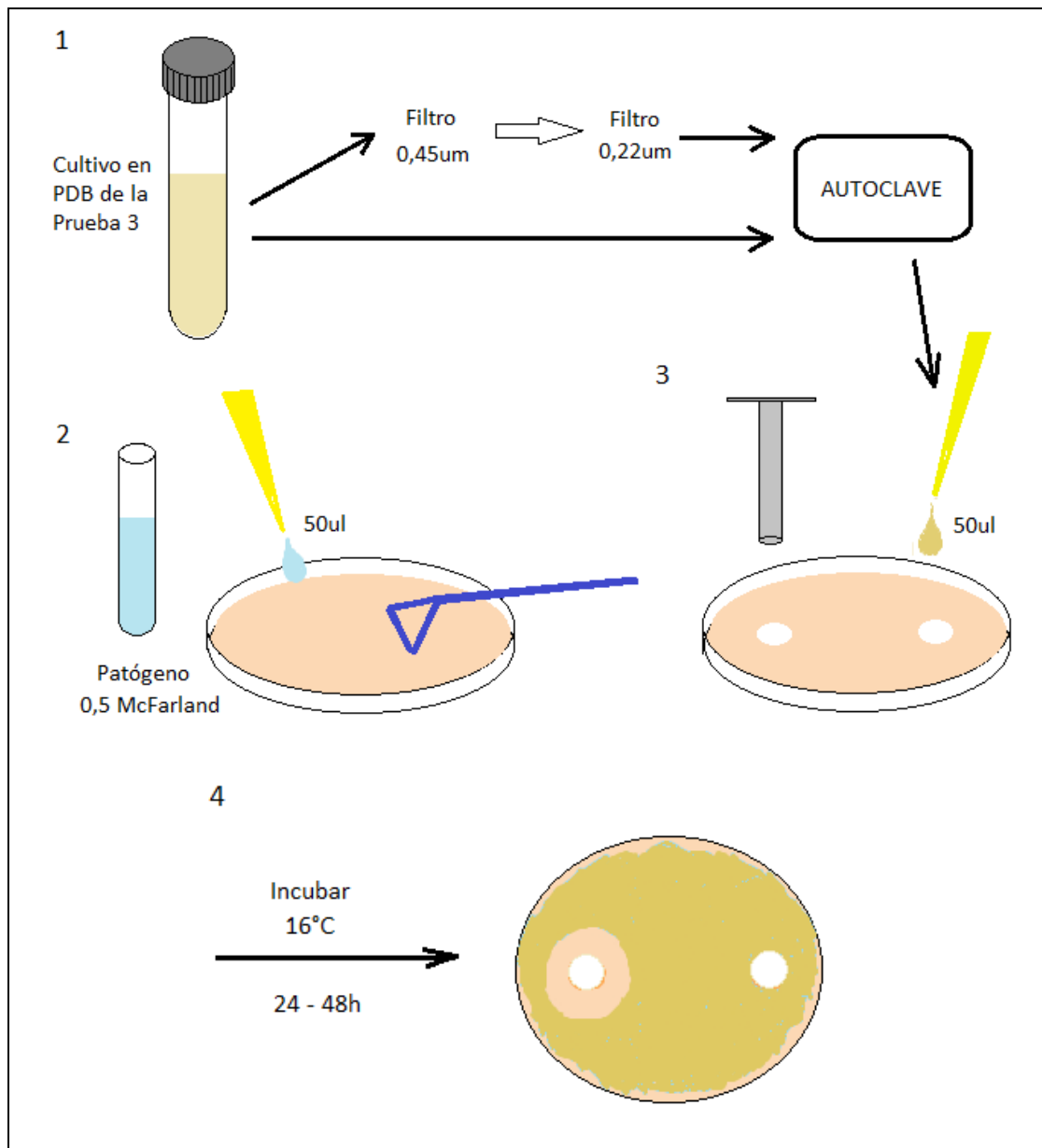
Para este test se utilizaron solo las cepas que fueron positivas en la prueba 3 (en ambas variaciones), y también se emplearon estos cultivos bacterianos en medios líquidos.

Para este test se usaron 2 tubos falcon por cepa.

Se emplearon cajas Petri grandes (9mm de diámetro): Se colocó 2 cepas por caja (2 cultivos y 2 cultivos filtrados) y 2 réplicas, además de 2 controles positivos por cada patógeno. En total se destinó 32 cajas Petri para esta prueba.

1. Usando un pre-filtro para jeringa de 45 micras se filtró la mitad del contenido (aproximadamente 5ml) de un tubo con el cultivo bacteriano y se lo colocó en un nuevo tubo estéril.
2. Este mismo luego pasó a través de un filtro de jeringa de 22 micras y colocado en el otro tubo falcon. Se realizó el mismo procedimiento para cada uno de los cultivos.
3. Se autoclavó por 15 min tanto los tubos con los cultivos originales como los que contenían el producto del filtrado.
4. En cada caja petri se colocó 100ul de un patógeno a 0,5 McFarland se realizó un screening.
5. Inmediatamente después del screening, en cada caja Petri se realizaron 4 pocillos con ayuda de un sacabocado y se colocó 50ul del cultivo autoclavado en un pocillo y 50ul del producto de su filtrado en otro (2 cepas por caja). Luego se lo mantuvo en refrigeración a 16°C.
6. Además se separó 2 cajas petri con el screening del patógeno para usar como control.
7. Se repitieron los pasos del 4 al 6 para cada patógeno.
8. Cada 24 horas se revisaron las cajas para observar la aparición del halo de inhibición.

Figura # 4. Diagrama de la metodología empleada para la cuarta prueba de inhibición.



Elaborado por: Autor

3.2.3. Pruebas de antagonismo Cepas aisladas del Biol vs patógenos camarón.

3.2.3.1. Primera Prueba

1. Se tomó una caja Petri con medio Agar Sangre (2% de salinidad) para cada 4 cepas, cada una con sus respectivas réplicas. Es decir, 39 cajas Petri para las cepas aisladas del Biol para cada patógeno.
2. Se sembró 4 cepas del Biol por caja con 3 réplicas, y se las mantuvo en una incubadora a 30°C.
3. Transcurrida 24 horas desde la siembran se colocaron 50ul del inóculo del patógeno a 0,5 McFarland en el centro de cada caja Petri con bacterias del Biol (la gota no debe tocar a las otras dos colonias presentes)
4. Se revisó cada 24 horas a partir de la inoculación del patógeno y se dibujó el contorno del crecimiento del mismo hasta que cubra a la cepa del Biol o se forme un halo de inhibición.
5. Repetir desde el paso dos para cada patógeno.

3.2.3.2. Segunda Prueba

1. Se utilizaron cajas Petri pequeñas (5cm de diámetro) con medio Agar Sangre (2% de salinidad), dos cepa por caja cada una con dos replicas, es decir, 75 cajas Petri para las cepas del Biol. Además son necesarios dos controles positivos. (esto es para cada patógeno).
2. En cada caja se inoculó 50ul del patógeno a 0,5McFarland y se realizó un screening.

3. Inmediatamente se sembraron las cepas de las bacterias del Biol con sus respectivas replicas.
4. Adicionalmente, para el control positivo, se realizó un screening del patógeno en dos cajas Petri.
5. Las cajas fueron incubadas a 30°C, y cada 24 horas se las revisó en caso de aparición de halos de inhibición.
6. Se repitió el mismo procedimiento para cada patógeno.

3.2.3.3. Tercera prueba:

1. Se utilizaron cajas Petri pequeñas (5cm de diámetro) con medio Agar Sangre (2% de salinidad), dos cepa por caja con dos replicas, es decir, 75 cajas Petri para las cepas del Biol. Además son necesarios dos controles positivos. (esto es para cada patógeno).
2. Las cepas del Biol fueron sembradas en tubos falcon con 10ml del medio líquido Potato Dextrose Broth con 2% de salinidad. Se las incubó a 30°C y con agitación continua por una semana.
3. Al igual que en la prueba anterior se realizó un screening del patógeno (50ul a 0,5 McFarland por caja)
4. Con ayuda de un sacabocado se realizaron 2 pocillos en cada caja Petri y se colocó 50ul del cultivo de una cepa del Biol en un pocillo (2 cepas por caja). Mantener en una incubadora a 30°C.

Tener en consideración que no puede transcurrir mucho tiempo desde el screening hasta la inoculación del antagonista o, en el caso de los vibrios, estos empezará a crecer.

5. Se repitieron los pasos 3 y 4 para cada patógeno.
6. Se revisó cada 24 horas para observar la aparición del halo de inhibición.

3.2.3.4. Cuarta prueba:

Para este teste se utilizaron solo las cepas que fueron positivas en el test anterior, y también se emplearon estos cultivos bacterianos en medios líquidos.

Para este test se usaron 3 tubos falcon por cepa que resultó positiva en la prueba anterior.

Se usaron cajas Petri grandes (9mm de diámetro): se empleó 1 caja Petri por cepa más 2 réplicas para cada una. Además se empleó 2 cajas Petri por patógeno para control. En total se destinó 44 cajas Petri para esta prueba.

1. Usando un pre-filtro para jeringa de 45 micras se filtró 3ml del contenido de un tubo con el cultivo bacteriano y se lo colocó en un nuevo tubo estéril.
2. Este mismo luego pasó a través de un filtro de jeringa de 22 micras y colocado en el otro tubo falcon.
3. Luego se traspasó otros 3ml del tubo madre a otro tubo falcon. Se siguió el mismo procedimiento para cada uno de los cultivos.

4. Se autoclavó por 15 min tanto los tubos con los cultivos madre como los que contenían el producto filtrado.
5. En cada caja Petri se colocó 100ul de un patógeno a 0,5 McFarland y se realizó un screening.
6. Inmediatamente después se realizaron 3 pocillos (por caja) con ayuda de un sacabocado y se colocó:

en un pocillo 50ul del cultivo madre

en otro pocillo 50ul del cultivo madre autoclavado

en el último 50ul del producto de su filtrado autoclavado.

Luego se lo mantuvo en un refrigerador a 30°C.
7. Se repitieron los pasos 5 y 6 para cada patógeno.
8. Cada 24 horas se revisaron las cajas para observar la aparición del halo de inhibición.

3.3. PRESUPUESTO:

Los costos de los materiales y equipos utilizados en esta tesis se detallan en la tabla IV, dentro de los anexos.

4. RESULTADOS

Los resultados de las diferentes pruebas de inhibición contra los patógenos *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, y *Pseudomona sp.* realizadas en el laboratorio del CIBE-ESPOL se presentan a continuación:

4.1. *V. parahaemolyticus*

Contra éste patógeno se probaron 74 cepas aisladas de la Antártida y 50 del Biol elaborado por el CIBE, de todas las mencionadas ninguna causó la inhibió del crecimiento del *V. parahaemolyticus* en ninguna de las pruebas realizadas.

4.2. *V. vulnificus*

Del total de las cepas probadas (74 Antártida y 50 Biol) se encontraron que dos de la Antártida y tres del Biol produjeron halos de inhibición contra el *V. vulnificus*.

Ninguna de las bacterias probadas resultó positiva en las pruebas de antagonismo número uno y dos.

En la Tabla I se observa el promedio de los halos de inhibición en cada una cepas que resultaron positivas en alguna de las pruebas de antagonismo contra este vibrio.

Tabla I. Resultados de las pruebas de antagonismos contra el *V. vulnificus*

		Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3			Prueba 4	
				Sal. 0%	Sal. 2%		Med A.	Filt A.
Bact Ant	97	0.0	0.0	22.7	0.0	0.0	5.4	0.0
	120	0.0	0.0	9.3	0.0	0.0	5.1	0.0
Bact Biol	A-4 (1)	0.0	0.0	0.0	6.9	7.7	2.8	0.0
	A-5 (1)	0.0	0.0	0.0	7.6	13.5	2.5	0.0
	B-3 (3)	0.0	0.0	0.0	1.3	0.0	0.0	0.0
	B-3 (5)	0.0	0.0	0.0	5.0	5.1	0.0	0.0
	B-3 (6)	0.0	0.0	0.0	3.5	4.5	0.0	0.0
	B-3 (7)	0.0	0.0	0.0	0.5	1.4	0.0	0.0

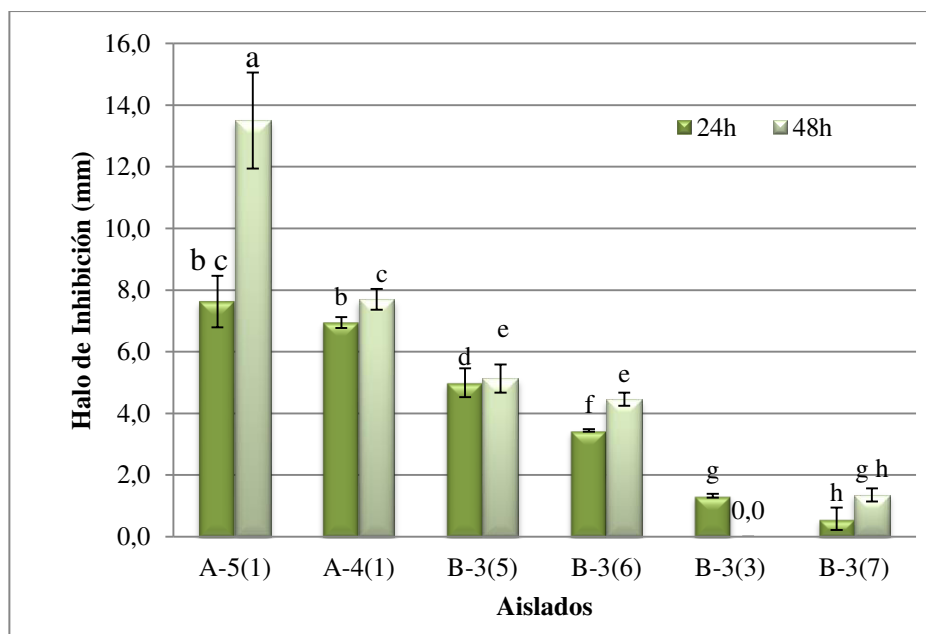
Elaborado por: Autor

La cepa A-5(1) fue la que produjo el halo de inhibición de mayor tamaño seguido de los aislados bacterianos A-4(1), B-3(5), B-3(6). Resultando los de menor tamaño B-3(3), B-3(7).

Ninguna de las cepas de la Antártida cultivadas en PDB con 2% de salinidad, creó un halo de inhibición.

En la figura #5 se puede observar la diferencia en el tamaño de los halos de inhibición medidos a las 24 y 48 horas de efectuadas los ensayos, de esta forma se puede observar si se mantiene el efecto inhibitorio.

Figura # 5. Comparación de los resultados positivos de antagonismo contra *V. vulnificus*

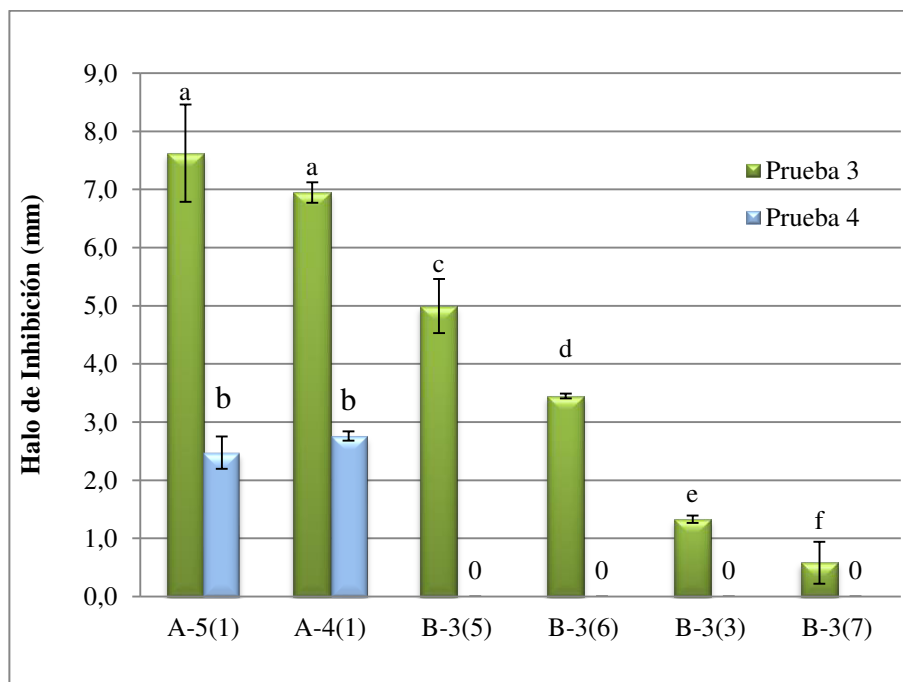


Elaborado por: Autor

En el caso de la cepa B-3(3), sucedió que la medida del halo de inhibición tomada a las 48h de la prueba superó a la efectuada transcurrida 24h desde la prueba, es decir que se evidencia un “crecimiento” del halo de inhibición.

En la figura #6 se observa la diferencia entre los halos de inhibición que se forman por la actividad de las bacterias (prueba 3) en relación a los que causan los metabolitos extracelulares (prueba 4).

Figura # 6. Comparación de resultados entre la prueba de antagonismo 3 y 4 contra *V. vulnificus*



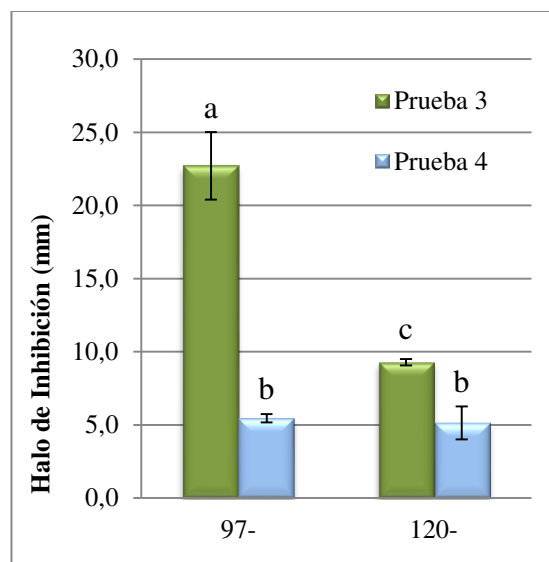
Elaborado por: Autor

De los aislados bacterianos del Biol solo los cultivos autoclavados de A-4(1) y A-5(1) formaron halos en la prueba 4, es decir que no existen metabolitos extracelulares que causen inhibición en el crecimiento del *V. vulnificus*.

Comparando el tamaño de estos halos con los que se obtuvieron al utilizar los cultivos sin autoclavar (prueba 3) los que se formaron en el último ensayo (Prueba 4) tuvieron un tamaño significativamente menor.

En la figura #7 se puede observar la diferencia entre los halos de inhibición ocasionados por las bacterias probadas (prueba 3) y los que producen los metabolitos extracelulares (prueba 4).

Figura # 7. Comparación entre los resultados positivos de las pruebas de antagonismo 3 y 4 (Medio de crecimiento no salino)



Elaborado por: Autor

En la cuarta prueba, las cepas de la Antártida 97 y 120 causaron inhibición del *V. vulnificus* cuando se realizó el ensayo con el cultivo bacteriano autoclavado, mientras que al realizar los ensayos filtrando el cultivo bacteriano antes de autoclavarlo el efecto inhibitorio desaparece. Esto implica que la inhibición del *V. vulnificus* no es causada por metabolitos extracelulares.

Es este gráfico también se puede observar que el tamaño del halo de inhibición alrededor del cultivo bacteriano autoclavado (Prueba 4) que el que produce el cultivo bacteriano normal (Prueba 3).

4.3. *V. harveyi*

Del total de las cepas probadas (74 Antártida y 50 Biol), 2 cepas de la Antártida y 3 cepas del Biol produjeron inhibición del crecimiento de este patógeno.

En la Tabla II se observa el promedio de los halos de inhibición ocasionados por cada una de las cepas que resultaron positivas en las diferentes pruebas de antagonismo contra este vibrio.

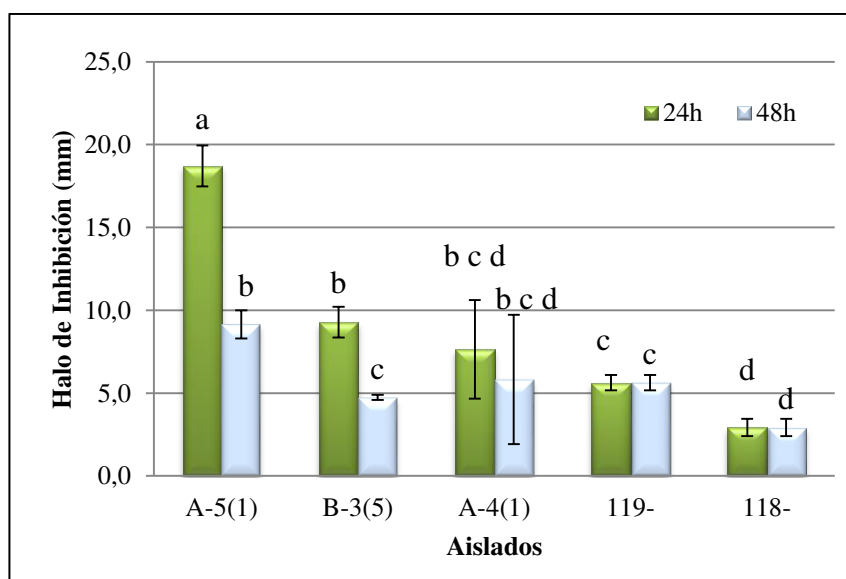
Tabla II. Resultados positivos de las pruebas de antagonismo contra *V. harveyi*.

		Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3			Prueba 4	
				Sal. 0%	Sal. 2%		Med A.	Filt A.
Bact Ant	118	0.0	0.0	19.7	2.9	2.9	0.0	0.0
	119	0.0	0.0	19.0	5.6	5.6	0.0	0.0
Bact Biol	A-4 (1)	0.0	0.0	0.0	7.6	6.9	0.0	0.0
	A-5 (1)	0.0	0.0	0.0	18.9	9.5	0.0	0.0
	B-3 (5)	0.0	0.0	0.0	9.2	4.8	0.0	0.0

Elaborado por: Autor

En la figura #8 se observa la diferencia de tamaños entre los halos de inhibición medidos transcurridas 24 y 48 horas desde la realización de ensayo.

Figura # 8. Comparación entre resultados positivos de inhibición de crecimiento de *V. harveyi* en la prueba 3.



Elaborado por: Autor

En la prueba 3, la cepa A-5(1) del Biol fue la que produjo el halo de inhibición de tamaño significativamente mayor en comparación con las demás, los aislados bacterianos del Biol A-5(1), B-3(5), A-4(1), y las cepas de la antártida 119 y 118 también produjeron halos, aunque de menor tamaño.

En las mediciones de los halos a las 48h, se observó una disminución del radio del halo de inhibición de todas las cepas de Biol que fueron positivas. Esto ocurrió debido a que aunque el límite del halo de inhibición permaneció igual se registró el crecimiento de la colonia de la cepa probada.

A diferencia de los halos de inhibición de las bacterias del Biol, los formados por las cepas de la Antártida mantuvieron el mismo tamaño transcurridas 48h.

El error estándar de la cepa A-4(1) se vio afectado debido a que una de las réplicas presentó un tamaño de halo de 1,7mm.

4.4. *Pseudomona sp.*

De las 74 bacterias de la Antártida utilizadas para las pruebas de inhibición, solo dos produjeron halos de inhibición (118 y 119).

Ninguna de las 50 cepas del Biol empleadas para las pruebas de antagonismo funcionó contra la *Pseudomona sp.*

En la Tabla III se observa el promedio de los halos de inhibición en cada una de las cepas que resultaron positivas en las diferentes pruebas de antagonismo contra este vibrio.

Tabla III. Tabla de resultados positivos de Inhibición de *Pseudomona sp.*

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3		Prueba 4	
			Sal. 0%	Sal. 2%	Med A.	Filt A.
118	-	8.0	13.2	2.0	0.0	0.0
119	-	10.1	15.0	4.7	0.0	0.0

Elaborado por: Autor

Ninguna de las 50 cepas del Biol funcionó contra la *Pseudomona sp* en ninguna de las pruebas de antagonismo realizadas.

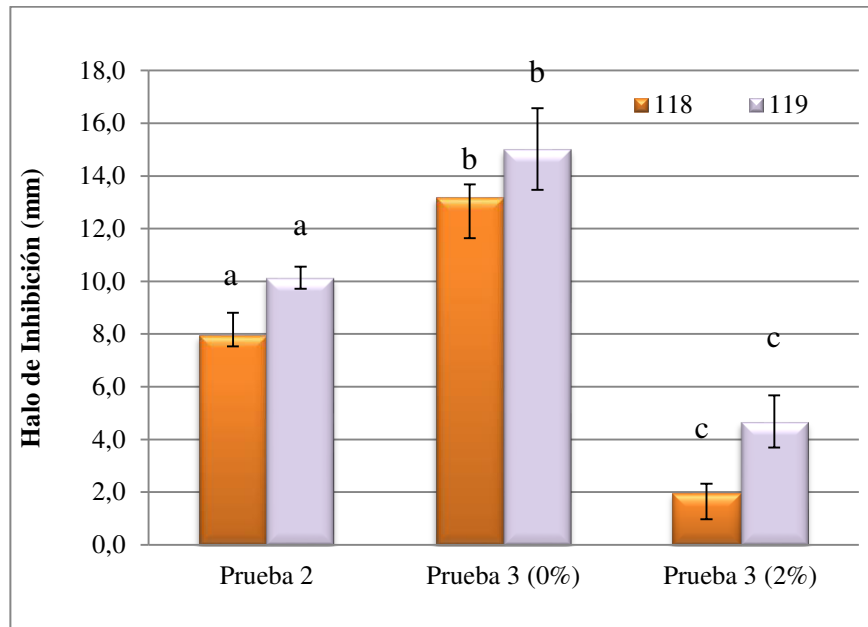
En la primera prueba de antagonismos contra *Pseudomona sp.* Los resultados no fueron concluyentes debido a que la velocidad de crecimiento o desplazamiento de este patógeno era muy lenta. El tiempo de duración de la prueba originalmente era de 1 semana, pero se extendió el periodo de observación hasta 4 semanas en el caso de las bacterias de la Antártida, debido a que éstas tenían un crecimiento muy lento, pero finalmente se decidió finalizar las observaciones debido a que no la falta de desplazamiento pudiera deberse a una competencia por los nutrientes. Sin embargo al realizar las pruebas con las cepas de Bioles se observó que éstas tenían una velocidad de crecimiento muy superior a la del patógeno, lo que no permitía la formación de los halos de inhibición debido a que las cepas probadas colonizaban toda la placa rápidamente.

En las pruebas de antagonismo número 2 y 3, de las 74 cepas de la Antártida, solo los aislados bacterianos 118 y 119 formaron halos inhibitorios.

A pesar de que las cepas 118 y 119 inhibieron el crecimiento de *Pseudomona sp.* en la prueba 3, en la prueba 4 ninguna de éstas fue capaz de formar halos de inhibición.

En la figura #9 se observa las diferencias de tamaños de los halos de inhibición formados por las bacterias de la Antártida en las distintas pruebas.

Figura # 9. Comparación entre los resultados de inhibición de *Pseudomona sp.*



Elaborado por: Autor

En este gráfico se puede apreciar que la salinidad del medio usado para el crecimiento de las bacterias de la Antártida tiene un efecto sobre el tamaño del halo inhibitorio que forman.

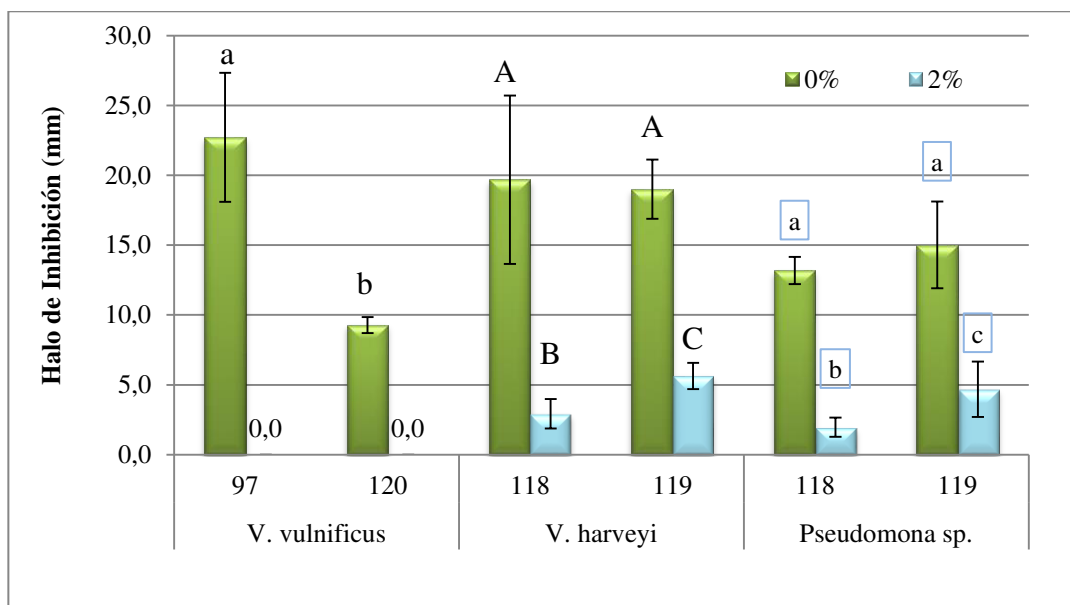
4.5. Diferencia de tamaño según la salinidad (Bacterias de la Antártida)

Las Cepas de la Antártida mostraron diferencias en el tamaño de los halos de inhibición ante la presencia o ausencia de salinidad. La amplitud del halo fue

significativamente superior en las pruebas en las que se utilizó el PDB sin salinidad como medio de crecimiento de las cepas.

En el caso de las cepas 97 y 120, el 2% de salinidad presente en el medio usado para su crecimiento ocasiona que éstas no sean capaces de formar el halo de inhibición, el cual se forma al usar medio no salino para su cultivo.

Figura # 10. Efecto de la salinidad sobre el tamaño de los halos de inhibición de bacterias de la Antártida.



Elaborado por: Autor

DISCUSIÓN

- Los aislados bacterianos de la Antártida y del Biol, arrojaron resultados distintos de inhibición ante un mismo patógeno en las pruebas 1 y 3. Esto podría deberse a que el medio utilizado para su crecimiento no era el mismo (para la prueba 1 se usó Agar base Sangre y para la 3 fue el PDB). Cabe acotar que en la prueba 3 fue donde se observaron cepas con actividad inhibitoria.
- La velocidad de crecimiento de los vibrios usado en las pruebas era superior a la de las bacterias de la Antártida por lo que solo se pudieron obtener resultados de inhibición contra la *Pseudomona sp.* en la prueba 2, muy probablemente porque la velocidad de crecimiento de los organismos experimentales era similar,

mientras que los Vibrios crecían a mayor velocidad que las bacterias de la Antártida.

- En la prueba 3 se evidenció que aunque las bacterias de la Antártida crecieron tanto en medios no salinos como con 2% de salinidad, la actividad inhibitoria de algunos aislados bacterianos fue afectada por la presencia de sal. Los halos de inhibición eran de mayor tamaño cuando las cepas habían crecido en medio sin salinidad.
- Al comparar los resultados de la prueba 3 y 4, se observó una reducción significativa del tamaño de los halos de inhibición de algunas de las bacterias (las cepas codificadas como A⁻⁵(1) y A⁻⁴(1)), mientras que otras dejaron de tener actividad inhibitoria. Esto pudo deberse a que hubo cierta degradación de los metabolitos al ser autoclavados.
- Los metabolitos con capacidad inhibitoria de las bacterias probadas son termolábiles.

CONCLUSIONES

- 1) De los 74 aislados bacterianos de la Antártida se lograron detectar 2 cepas que poseían actividad inhibitoria hacia el *Vibrio vulnificus* y 2 cepas que inhibían el crecimiento tanto del *V. harveyi* como de la *Pseudomona sp.*

- 2) De los 50 aislados bacterianos del Biol, se encontraron 6 cepas que inhibían el crecimiento *Vibrio vulnificus*, sin embargo solo 4 causaban una inhibición significativa. Ninguno de los aislados inhibió el crecimiento de *V. harveyi* ni de la *Pseudomona sp.*

- 3) Entre los aislados bacterianos probados no se encontró ninguno que inhibiera el crecimiento de *V. parahaemolyticus*.

- 4) Las cepas A⁻⁴(1) y A⁻⁵(1), provenientes de la muestra del Biol, y las cepas 97 y 120 provenientes de la Antártida, no producen metabolitos extracelulares capaces de inhibir el crecimiento del *Vibrio vulnificus*.

- 5) Hay potencial de desarrollar productos que ayuden a eliminar las enfermedades ocasionadas por los patógenos oportunistas *Vibrios vulnificus*, *V. harveyi* y *Pseudomona sp.*

RECOMENDACIONES

- 1) Se recomienda realizar pruebas de antagonismo utilizando PDB (0% de salinidad) como medio de crecimiento para las cepas del Biol, para determinar el efecto de la salinidad sobre la producción de los compuestos con características inhibitorias.
- 2) Además, utilizar diferentes medios de cultivo para el crecimiento de los aislados bacterianos del Biol y de la Antártida, para determinar si con diferentes compuestos se pueden producir otros metabolitos con mejores efectos inhibitorios del crecimiento de los patógenos probados.

- 3) Realizar nuevas pruebas de antagonismo contra otros géneros de vibrios.

- 4) Identificar las cepas bacterianas que causan estas inhibiciones.

- 5) Realizar bioensayos *in vivo* para determinar la interacción entre los vibrios patógenos y las cepas antagonistas aisladas.

- 6) Extraer e identificar las sustancias bioactivas de las cepas estudiadas con potencial antibacteriano.

ANEXOS

Tabla IV. Materiales y Costos



	CANT.	DESCRIP	V.U	V.T
AGAR SANGRE DIFCO/USA	2	500 gr	71.00	142.00
TSA DIFCO/USA	1	250 gr	30.00	30.00
NUTRIENT DIFCO/USA	1	250 gr	65.00	65.00
PDB DIFCO/USA	1	500 gr	55.00	55.00
CAJAS PETRI DESECHABLES, ESTÉRILES PLÁSTICAS DE 50mm EN DIÁMETRO	10	Paq x 20	29.80	298.00
CAJAS PETRI DESECHABLES, ESTÉRILES PLÁSTICAS DE 90mm EN DIÁMETRO	6	Paq x 20	40.00	240.00
PUNTAS 200ul	16	Paq x 1000	12.00	192.00
PRE FILTRO DE JERINGA DE 0,45 micras	1	Paq x 50	140.0	140.00
FILTRO DE JERINGA 0,22ul (26ml CELULOSA)	1	Paq x 50	140.00	140.00
JERINGA 10cc	1	Paq x 100	15.00	15.00
PureLink GENOMIC DNA MINI KIT (INVITROGEN)	1	50 preps	126.14	126.14
TUBOS FALCON (tubos cónicos para centrífuga 50ml Estériles)	20	Bolsa x 25	13.60	272.00
GUANTES (UltraCruz Gloves, Nitile Plus, Small)	1	Caja 100	12.50	12.50
Mandil Laboratorio	1		30.00	30.00
Asas de platino	2	6"H	4.88	9.76
Asas Esparcidoras	1	25/PK	20.44	20.44
Probeta 250ml	1		46.65	46.65

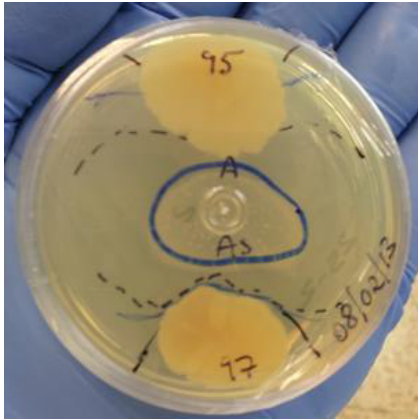
Matraz Erlenmeyer (500ml)	1		10.50	10.50
Matraz Erlenmeyer (1000ml)	1		15.95	15.95
Sacabocado #3	1			
Micropipeta (200ul)	1	20-200ul	290.00	290.00
Balanza (Balance Top Load 200G x 0,01G)	1		342.00	342.00
Medidor Densidad óptica McFarland	1		900.00	900.00
Universal pH Indicador Paper	1		31.25	31.25
Incubadora con Shaker	1		6823.00	6823.00
Incubadora de frío con Shaker	1		8196.00	8196.00
Autoclave (Model 1730M Analog Control w/Display)	1		4067.00	4067.00
Cámara de flujo laminar	1	Class II Biosafety	8240.00	8240.00
SUBTOTAL				30750.19
IVA 12%				3690.02
TOTAL				34440.21

Elaborado por: Autor

Fotos de resultados de las pruebas de antagonismo contra *V. vulnificus*

Prueba 1

 <p>A petri dish with a yellow agar surface. A central yellow spot is labeled 'B-3 (6)'. A blue line is drawn around this spot, indicating an inhibition halo. Another yellow spot at the bottom is labeled 'B-3 (4)'.</p>	 <p>A petri dish with a yellow agar surface. A central yellow spot is labeled 'B-3 (8)'. A blue line is drawn around it. To the right, a larger yellow area is labeled '08/02/13'. Another yellow spot at the bottom is labeled 'B-3 (8)'.</p>
<p>Foto 1. Halo de inhibición alrededor de la cepa B⁻³ (6)</p>	<p>Foto 2. El <i>V. vulnificus</i> no crece cerca de la cepa B⁻³ (8).</p>

 <p>A petri dish with a yellow agar surface. A central yellow spot is labeled '97'. A blue line is drawn around it. To the right, a larger yellow area is labeled '08/02/13'. Another yellow spot at the bottom is labeled '77'. The letter 'A' is written above the central spot, and 'A2' is written below it.</p>	<p>Foto 3. En esta prueba la cepa 97 no inhibe el crecimiento del <i>V. vulnificus</i></p>
---	---

Nota: Cada marca es la delimitación del crecimiento del patógeno por día

Prueba 3

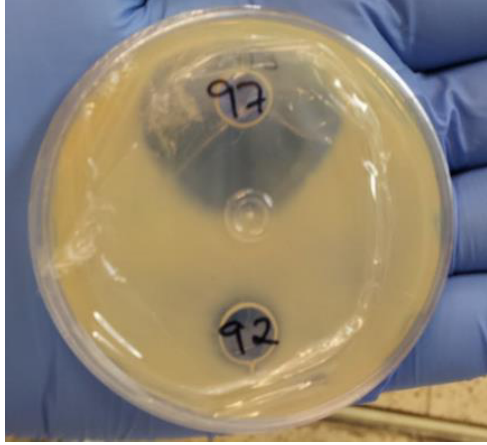


Foto 4. Halo de inhibición de la cepa 97.

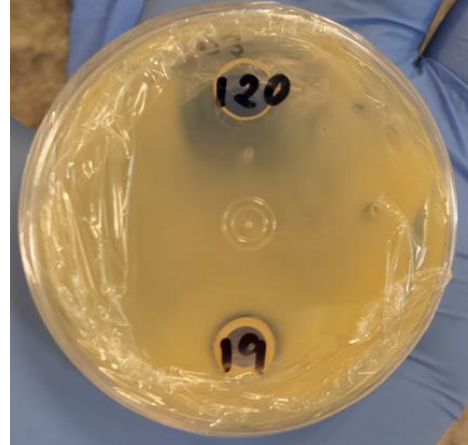


Foto 5. Halo de inhibición de la cepa 120.

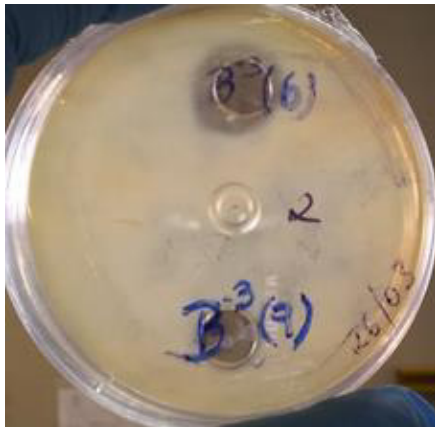


Foto 6. Halo de inhibición de la cepa B³(6).



Foto 7. Halo de inhibición de la cepa B³(5).



Foto 8. Halo de inhibición de la cepa A⁻⁴(1).



Foto 9. Halo de inhibición de la cepa A⁻⁵(1) a las 24h de la prueba.

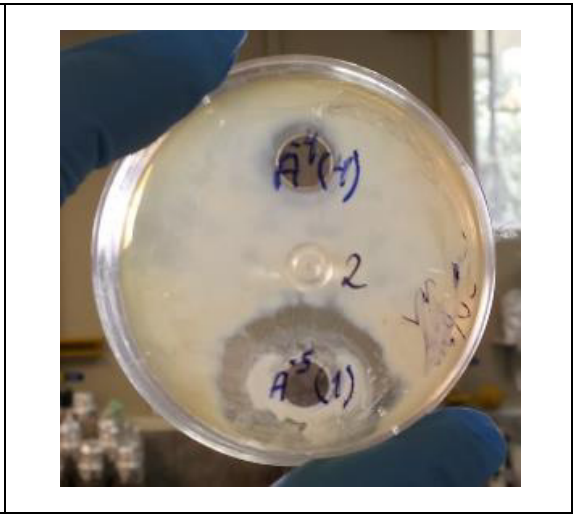


Foto 10. El halo de inhibición de la cepa A⁻⁵(1) aumenta de tamaño con respecto a la foto 9 al transcurrir otras 24h.

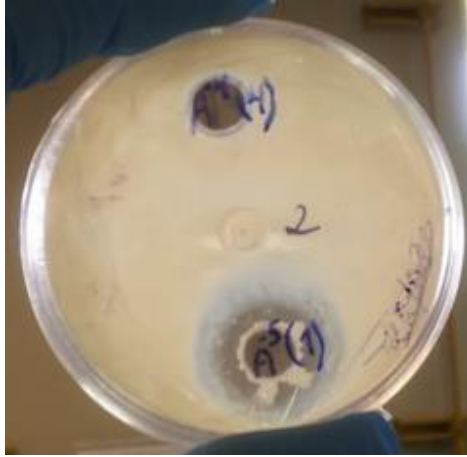


Foto 11. Halo de inhibición de la cepa A⁵(1) a las 24h de la prueba.



Foto 12. Halo de inhibición de A⁵(1) 24h después de la foto 11.

Prueba 4



Foto 13. Placa incubada a 30°C

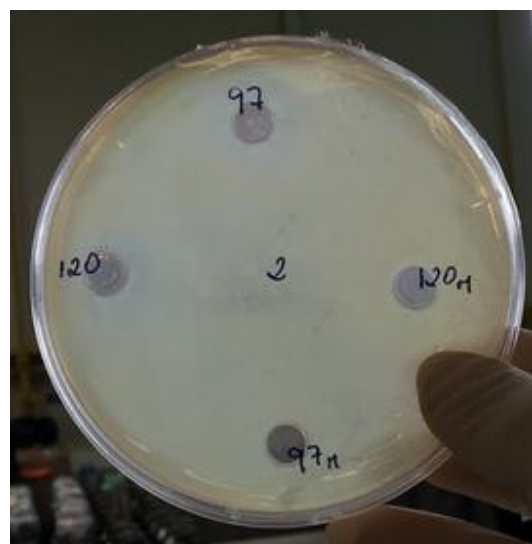


Foto 14. Placa incubada a 15°C.



Foto 15. Halo de inhibición alrededor del cultivo sin filtrar y autoclavado (AM) de la cepa A⁻⁵(1)

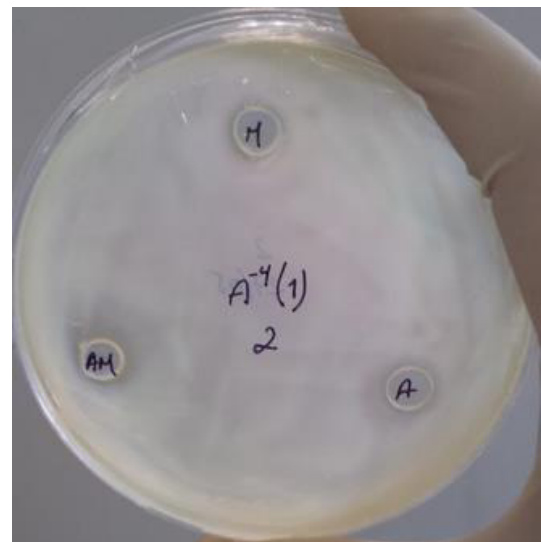


Foto 16. Halo de inhibición alrededor del cultivo sin filtrar y Autoclavado (AM) de la cepa A⁻⁴(1)



Foto 17. No se observa inhibición



Foto 18. No se observa inhibición

Fotos de resultados de las pruebas de antagonismo contra *V. harveyi*

Prueba 3

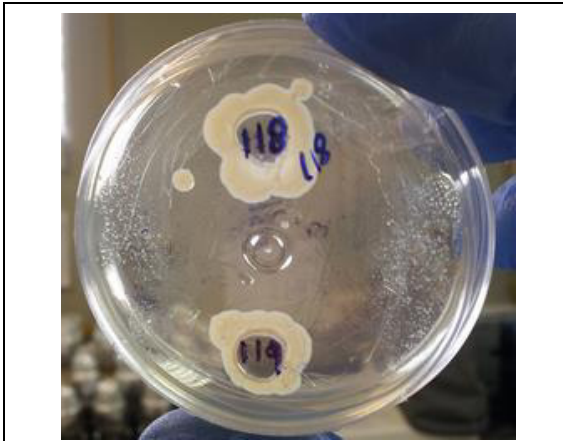


Foto 19. Las cepas 118 y 119, cultivadas en un medio PDB sin salinidad, inhiben el crecimiento del *V. harveyi* en la mayor parte de la placa.

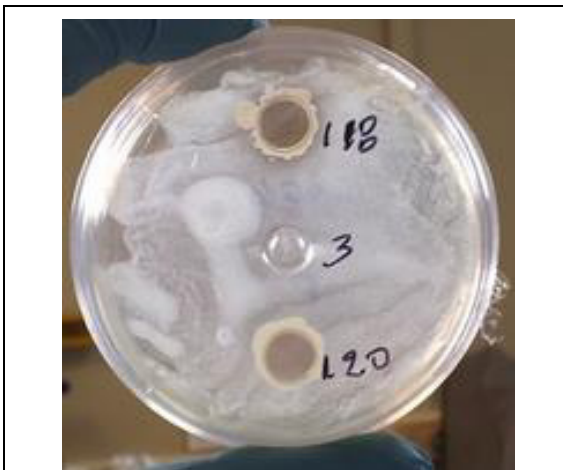


Foto 20. Prueba en medio Agar Sangre, cepa 118 cultivada en PDB con 2% salinidad

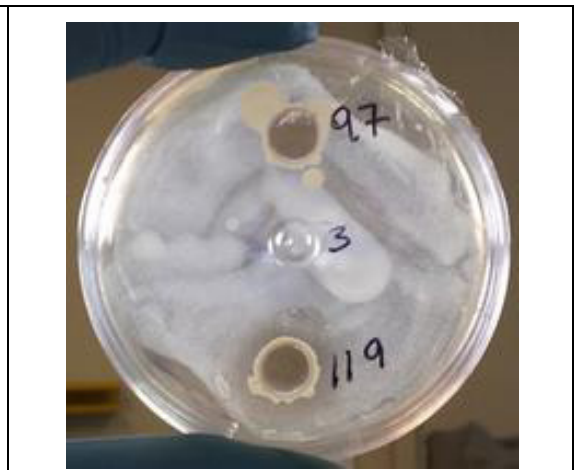


Foto 21. Prueba en medio Agar Sangre, cepa 119 cultivada en PDB con 2% salinidad



Foto 22. Halo de inhibición alrededor del cultivo (PDB 2% salinidad) de la cepa $A^{-5}(1)$

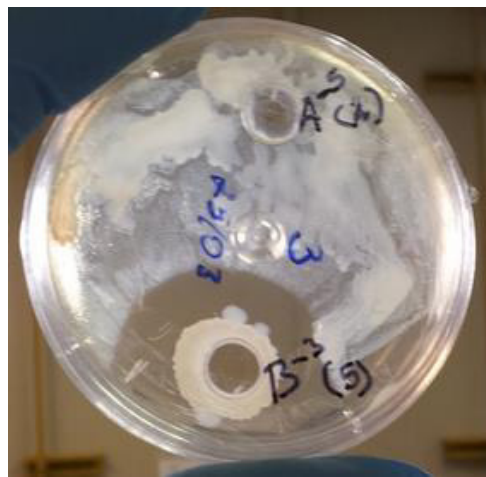


Foto 23. Halo de inhibición alrededor del cultivo (PDB 2% salinidad) de la cepa $B^{-3}(5)$

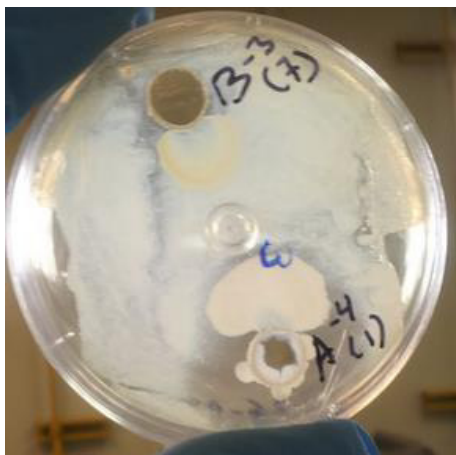


Foto 24. Halo de inhibición alrededor del cultivo (PDB 2% salinidad) de la cepa $A^{-4}(1)$ después de 24h

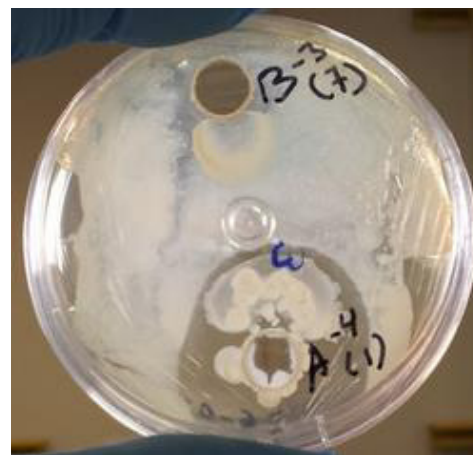


Foto 25. Halo de inhibición alrededor del cultivo (PDB 2% salinidad) de la cepa $A^{-4}(1)$ después de 48h

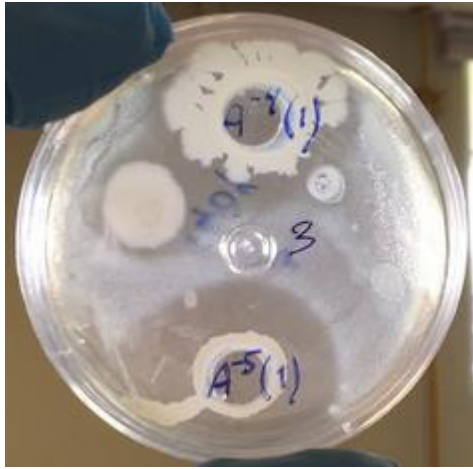


Foto 26. Prueba en medio Agar Sangre, cepa A⁻³(1) cultivada en PDB con 2% salinidad

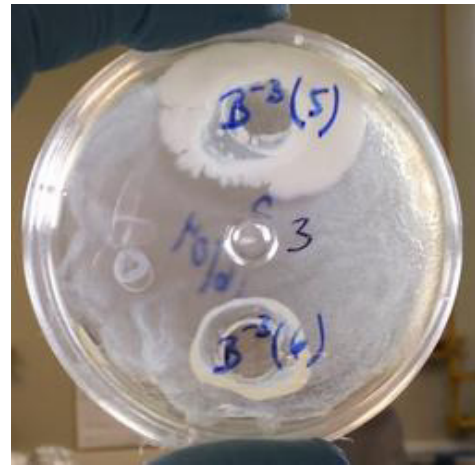


Foto 27. Prueba en medio Agar Sangre, cepa B⁻³(6) cultivada en PDB con 2% salinidad

Prueba 4

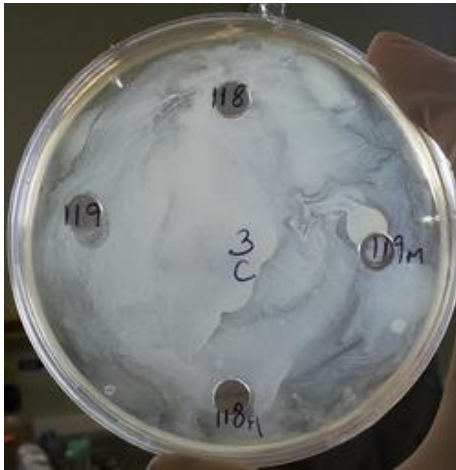


Foto 28. Prueba en medio Agar Sangre al 2% de salinidad, cultivos de la cepas autoclavados (118 y 119), y los cultivos filtrados y autoclavados (118M y 119M). No hay halos de inhibición.



Foto 29. Prueba en medio Agar Sangre al 2% de salinidad, cultivo de la cepa B⁻³(5) en PDB con 2% de salinidad(A), el cultivo autoclavado (AM), y el cultivo filtrado y autoclavado (M).

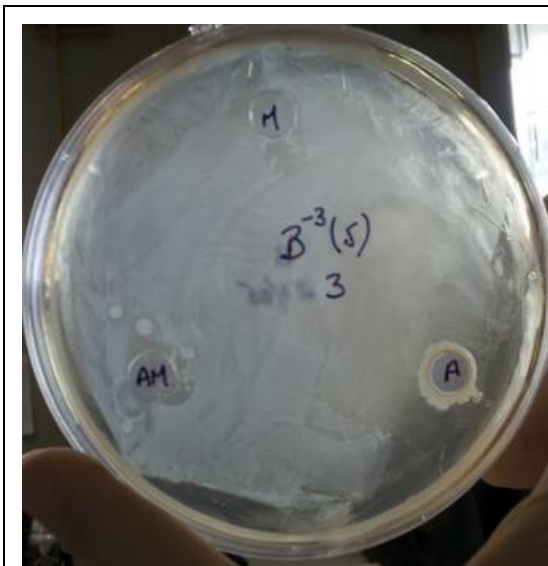


Foto 29. Prueba en medio Agar Sangre al 2% de salinidad, cultivo de la cepa B⁻³(5) en PDB con 2% de salinidad(A), el cultivo autoclavado (AM), y el cultivo filtrado y autoclavado (M).



Foto 30. Prueba en medio Agar Sangre al 2% de salinidad, cultivo de la cepa A-5(1) en PDB con 2% de salinidad(A), el cultivo autoclavado (AM), y el cultivo filtrado y autoclavado (M).



Foto 31. Prueba en medio Agar Sangre al 2% de salinidad, cultivo de la cepa A⁴(1) en PDB con 2% de salinidad(A), el cultivo autoclavado (AM), y el cultivo filtrado y autoclavado (M).

Fotos de resultados de las pruebas de antagonismo contra *Pseudomona* sp.

Prueba 2

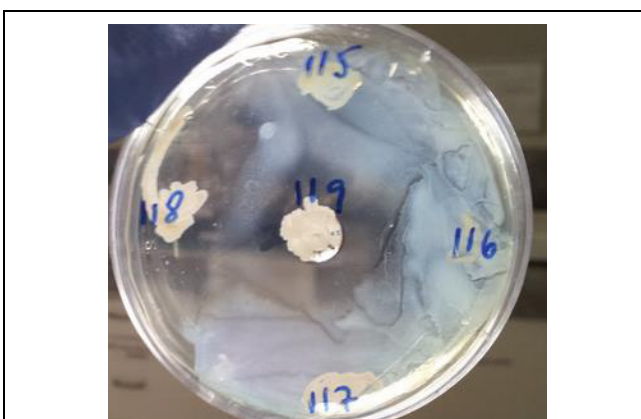


Foto 32. Halo de inhibición alrededor de las cepas 118 y 119

Prueba 3

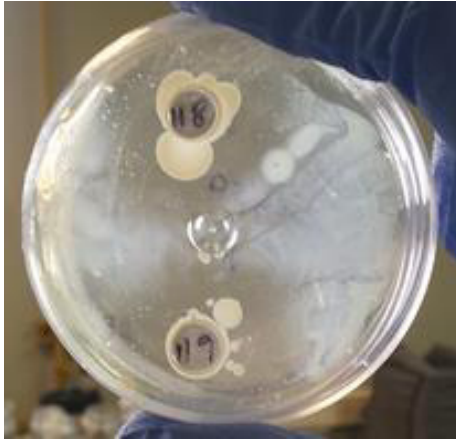


Foto 33. Las cepas 118 y 119 fueron cultivadas en PDB no salino.

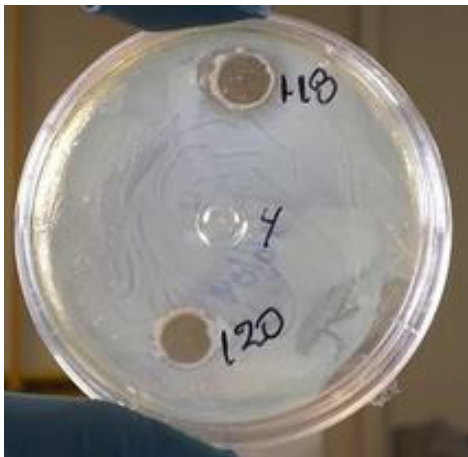


Foto 34. Prueba en medio Agar Sangre, cepas cultivada en PDB con 2% salinidad



Foto 35. Prueba en medio Agar Sangre, cepas cultivada en PDB con 2% salinidad

Prueba 4

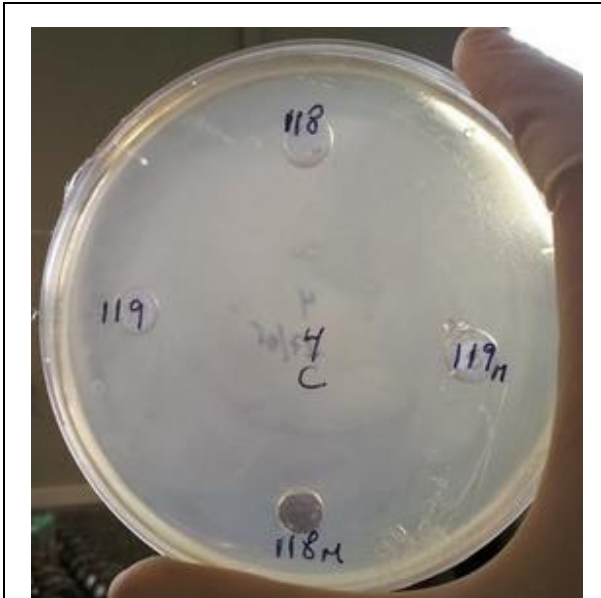


Foto 38. Prueba en medio Agar Sangre al 2% de salinidad, cultivos autoclavados (118 y 119), y cultivos filtrados y autoclavados (118M y 119M).

BIBLIOGRAFÍA

1. Acha, P., & Szyfres, B. (2001). *Zoonoses Volumen I*. Pan American Health Org.
2. Aguirre, G., López, E., & Vázquez, M. (2013). *Efecto de Vibrio harveyi en la sobrevivencia de las larvas de Litopenaeu vannamei*. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Tamaulipas.
3. Ankenman Granata, L., Flick, G., & Martin, R. (2012). *The Seafood Industry: Species, Products, Processing, and Safety* (2da edición ed.). Wiley-Blackweel.
4. Argüello, B. (2013). *Identificación molecular de comunidades bacterianas Gram negativas en agua de un sistema de Pre-criadero de Litopenaeus vannamei*. Guayaquil: FIMCBOR - ESPOL.
5. Austin, B., & Zhang, X.-H. (2006). *Under the Microscope Vibrio harveyi: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates* (Vol. 43). Journa compilation 2006 The Society for Applied Microbiology, Lettes in Applied Microbiology.
6. Baeza, M., Véliz, D., Barahona, S., & Cifuentes, V. (2010). Especial Biodiversidad Antártica. (R. Canales Cabezas, Ed.) *Boletín Antártico Chileno* , 29 (1), 7-9, 9-11.
7. Beaz, R. (2008). *Identificación de bacterias del género Vibrio asociadas al cultivo de la almeja. Caracterización y patogénesis*. Universidade de Santiago de Compostela. Servizo de Publicacións e Intercambio Científico.

8. Camposano, J. (2013). Sector camaronero Motor de Bienestar en el Ecuador del Siglo 21. (C. N. Acuicultura, Ed.) *Aqua Cultura* (97), 16.
9. Carvajal, F. (2008). Probióticos en dieta de camarones evita el uso de Antibióticos. *Agencia AUPEC Agencia Universitaria de periodismo científico* .
10. Chávez, E., & Jiménez, M. (2009). *Determinación de la calidad de biofertilizantes líquidos y estudio del potencial para la inhibición de Mycosphaerellafijiensis Morelet en condiciones controladas y como alternativa en el manejo de sigatoka negra en sistemas de producción orgánica*. Guayaquil: Escuela Superior Politécnica del Litoral.
11. Chávez, E., León, R., Ruíz, O., Averos, C., & Peralta, E. (2011). Aplicación de biofertilizantes líquidos de producción local y su efecto en la rehabilitación de plantaciones de cacao fino y de aroma. ”. *Memorias del I Congreso Binacional de Investigación en Ciencia y Tecnología de las Universidades del Norte del Perú y del Sur de Ecuador* (pág. 6). Piura: Universidad Nacional de Piura-UNP.
12. Dávalos, S. G. (2005). Patógeno oportunista *Vibrio vulnificus*. *Revista Digital Universitaria* , VI (4), 1-6.
13. Díaz, P., Alina, N., & Calderón, C. (s.f.). *Elaboración de Biofertilizante Líquido BIOL*. Asociación para la Conservación de la Cuenca Amazónica.
14. Dworkin, M., & Falkow, S. (2006). *The Prokaryotes: Vol 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*. Springer.
15. Dworkin, M., & Falkow, S. (2006). *The Prokaryotes: Vol. 6: Proteobacteria: Gamma Subclass* (Tercera edición ed., Vol. VI). Singapore: Springer.

16. FAO/OMS. (27 de julio de 2001). *Identificación de Peligros, Caracterización de Peligros y Evaluación de Exposición a Vibrios spp. en Mariscos y Pescados de Mar*. Recuperado el 27 de febrero de 2013, de <http://www.fao.org/docrep/008/ae521s/ae521s07.htm>
17. Franciscus, A. (julio de 2012). *HCSP FACT SHEET Vibrio Vulnificus*. Recuperado el 27 de febrero de 2013, de http://www.hcvadvocate.org/hepatitis/factsheets_pdf/Vibrio%20Vulnificus.pdf
18. Fratamico, P., Bhunia, A., & Smith, J. (2005). *Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology*. Horizon Scientific Press.
19. Gómez Gil, B., Roque, A., & Guerra Flores, A. (2001). *Enfermedades Infecciosas más Comunes en la Camaronicultura en México y el Impacto del Uso de Antimicrobianos*. Sinaloa, México: CIAD, A.C. Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental.
20. Hentschel, U., Schmid, M., Wagner, M., Fieseler, L., Gernert, C., & Hacker, J. (2001). Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiology Ecology* (35), 305, 309.
21. Hernández López, J., Gollas, T., Magallón Barajas, F., & Vargas, F. (1997). Isolation of *Vibrio* and *Pseudomonas* from Brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) intestine. *Revista latinoamericana de microbiología*, 39, 112-115.

22. Huerta Aldaz, N. (2001). *Patogenicidad de vibrio penaeicida cultivado a diferentes condiciones de salinidad y pH en larvas y postlarvas de camarón blanco, Litopenaeus vannamei*. Universidad de Sonora. Ensenada Baja California: VIII Congreso de la Asociación de Investigadores del Mar de Cortés, A. C. y II Simposium Internacional sobre el Mar de Cortés (AIMAC).
23. Ibarra, J. (1999). *Epizootiología de las Enfermedades Detectadas en el Cultivo del Camarón Azul Litopenaeus stylirostris en el Parque Acuícola El Siari, Sonora, México*. San Nicolás de los Garzas: Universidad Autónoma de Nuevo León.
24. INACH. (2010). Bacterias Antárticas: un potencial para la producción de compuestos con actividad antibacteriana. *Boletín Antártico Chileno* , 29 (1), 9-10.
25. Jiménez, E. (2011). *Aplicación de biol y fertilización química en la rehabilitación de praderas, "Aloag – Pichincha"*. Sangolquí: Escuela Politécnica del Ejército.
26. Kan, G., Shi, C., Wang, M., & Wang, M. (2012). Screening of Antarctic Antagonism against *Vibrio anguillarum* and Preliminary Research of the Antibacterial Substances. En *Advanced Materials Research* (pág. 635). Switzerland: Trans Tech Publications.
27. Lavin, P. (2012). Uso de compuestos antimicrobianos, provenientes de bacterias antárticas, para aumentar la seguridad alimentaria. *XXXIV Congreso Chileno de Microbiología* (pág. 44). Sociedad de Microbiología de Chile (SOMICH).
28. León. (Octubre de 1999). *Epizootiología de las enfermedades detectadas en el cultivo del camarón azul Litopenaeus stylirostris en el Parque Acuícola El Siari,*

Sonora, Mexico. Obtenido de
<http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080124387/1080124387.PDF>

29. León, J., Liza, L., Soto, I., Torres, M., & Orosco, A. (2010). *Bacterias Marinas Productoras de Compuestos Antibacterianos Aisladas a partir de Invertebrados Intermareales*. Lima: Rev Peru Med Exp Salud Publica.
30. Leyton, A., Urrutia, H., & Sossa, K. (2012). Detección de Proteínas de cepas antárticas con actividad inhibitoria en la formación de biopelículas de *Flavobacterium psychrophilium*. (pág. 67). Sociedad de Microbiología de Chile (SOMICH).
31. Lightner, D., & Pantoja, C. (2009). *Manual para el diagnóstico de enfermedades del camarón*. (C. Pantoja, Trad.) University of Arizona.
32. Lynn, S. (2008). *The Ecology of Vibrio vulnificus and Vibrio parahaemolyticus from Oyster Harvest Sites in the Gulf of Mexico*. ProQuest.
33. Magdama, F. (2010). *Estudio del Efecto de Bioles y cepas de Trichoderma sp. aisladas de zonas cacaoteras, como alternativa de control de Moniliophthora roreri, en condiciones in vitro*. Guayaquil: Escuela Superior Politécnica del Litoral.
34. Magdama, F., Maridueña, M., Villavicencio, M., & Peralta, E. (2011). *Bioles con propiedades fungicidas y su uso en el control de la moniliasis*. Piura: Memorias del I Congreso Binacional de Investigación en Ciencia y Tecnología de las Universidades del Perú y del Sur de Ecuador.

35. Manuel Rubio Limonta, R. S. (2012). *Enfermedad de la mancha del caparazón en el camarón de cultivo Litopenaeus vannamei*. Obtenido de REDVET: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070712/071211.pdf>
36. Ministerio de Relaciones Exteriores, Comercio e Integración. (2012). *Boletín mensual de Comercio Exterior*. Pro Ecuador.
37. Morales, V., & Cuéllar-Anjel, J. (2008). *Guía Técnica: Patología e Inmunología de camarones penaeidos*. Panamá, Rep. de Panamá: CYTED.
38. Pascual Anderson, M. d., & Calderón, V. (1999). *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas* (Segunda edición ed.). Madrid: Días de Santos.
39. Pavlidis, M., & Mylonas, C. (2010). *Sparidae: Biology and aquaculture of gilthead sea bream and other species*. (J. W. Sons, Ed.) Wiley-Blackwell.
40. Pro Ecuador. (25 de febrero de 2013). *Récord en exportaciones pesqueras de Ecuador, gracias al camarón y enlatados de atún*. Recuperado el 27 de febrero de 2013, de <http://www.proecuador.gob.ec/2013/02/25/record-en-exportaciones-pesqueras-de-ecuador-gracias-al-camaron-y-enlatados-de-atun/>
41. Rubio Limonta, M., & Silveira Coffigny, R. (2012). Enfermedades infecciosas en camarones *Penaeus* y langostas *Panulirus*. Situación actual. *Revista electrónica Veterinaria* , 13 (7), 3-4.
42. Rubio, M., Silveira, R., Pérez, L., & González, N. (2012). Enfermedad de la mancha del caparazón en el camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei*. *REDVET - Revista electrónica de Veterinaria* , 13 (7), 2-8.

43. Ruiz, L. (2007). *Pseudomonas aeruginosa: Aportación al Conocimiento de su Estructura y al de los Mecanismos que contribuyen a su Resistencia a los Antimicrobianos*. Barcelona: Universidad de Barcelona.
44. San Cristóbal, W., Olea, A., Cachicas, V., Fernández, J., Ibáñez, D., Hormazábal, J., y otros. (2008). *Manual de Procedimientos: Aislamiento, Identificación y Caracterización de Vibrio parahaemolyticus*. Chile: Ministerio de Salud - Instituto de salud Pública Chile.
45. SAR, D. o. (1 de septiembre de 2012). *Epidemiology of Vibrio vulnificus associated necrotizing fasciitis in Hong Kong, 2007 to August 2012*. Recuperado el 27 de febrero de 2013, de http://www.chp.gov.hk/files/pdf/cdw_v9_18.pdf
46. Tunung, R., Jeyaletchumi, P., Noorlis, A., Tang, Y., Sandra, A., & Ghazali, F. (2012). *Biosafety of Vibrio parahaemolyticus from vegetables based on antimicrobial sensitivity and RAPD profiling*. Recuperado el 27 de febrero de 2013, de International Food Research Journal: [http://www.ifrj.upm.edu.my/19%20\(02\)%202012/\(13\)IFRJ-2012%20Tunung.pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/19%20(02)%202012/(13)IFRJ-2012%20Tunung.pdf)
47. Venkateswara Rao, A. (s.f.). *Sitio de La Sociedad Cubana de Medicina Veterinaria para Casos de Desastres*. Recuperado el 27 de febrero de 2013, de <http://www.mvd.sld.cu/doc/pescayacuicultura/vibriosis-en-la-acuicultura-del-camaron.pdf>
48. Venkateswara Rao, A. (2008). *Vibriosis in Shrimp Aquaculture*. Neospark Drugs and Chemicals Pvt. Ltd.

49. West, P. A., Brayton, P. R., Bryant, T., & Colwell, R. R. (1986). *Numerical taxonomy o Vibrios isolated from aquatic environments* (Vol. 36). Int. J. Syst Bacteriol.
50. Wong, C., Tam, H., Gonzalez, M., Gonzalez-Rocha, G., Domínguez-Yévenes, M., & Alias, S. (3-5 de Septiembre de 2008). Antarctic bacteria exhibits antimicrobial activity against food borne pathogen. *Proceeding IV Simposio Latinoamericano sobre Investigación Antártica* , 44-47.
51. World Health Organization. (2005). *Risk Assessment of Vibrio vulnificus in Raw Oysters: Interpretative Summary and Technical Report* (Vol. VIII). FAO/WHO.
52. Zamora Pantoja, D., Quiroz, C., Quiñonez, E., & Vázquez, C. (10 de Abril de 2005). *Un enemigo marino silencioso V. parahaemolyticus*. (C. d. Digitales, Editor) Recuperado el 15 de Junio de 2013, de Revista Digital Universitaria: <http://www.revista.unam.mx/vol.6/num4/art33/int33.htm>