



# ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

FACULTAD DE INGENIERIA MARITIMA  
Y CIENCIAS DEL MAR

“Caracterización de una cepa de *Vibrio harveyi* considerada agente causal del Síndrome de bolitas en larvas de *Penaeus vannamei* y estudio de la interacción *in vitro* con una cepa de *Vibrio alginolyticus* utilizada como probiótico”

**TESIS DE GRADO**  
Previa la obtención del título de

**ACUICULTOR**

Presentada por:

**María Teresa Zherdmant Vélez**

GUAYAQUIL-ECUADOR

1996

## DEDICATORIA

Quiero agradecer a  
opportunity de  
ha hecho posible

A mis padres,  
Zacarias y  
educación. No  
todo, espero

A mis hermanos,  
Joel y Friné,  
quien me

Quiero  
investigación  
Calabria, P. U.  
muchas gracias

A mi mamá,  
especialmente  
"amor" y  
por el apoyo  
conmigo

A mis padres, Hermes y Teresa  
y a mis hermanos, Joel y Friné.

A Lucía.

## AGRADECIMIENTO

Quisiera agradecer primeramente a Dios, quien me dio la oportunidad de estar con vida y poder conocer a todas las personas que han hecho posible la realización de este trabajo de tesis.

A mis padres, Sr. Hermes Zherdmant y Sra. Teresa Vélez de Zherdmant por todo el esfuerzo y sacrificio que han puesto en mi educación. No creo que hubiera podido tener mejores padres, gracias por todo, espero no decepcionarlos.

A mis hermanos, Joel y Friné, que siempre me han apoyado, cuando los he necesitado. Tal vez no se los digo muy seguido, pero los quiero mucho, no lo duden nunca.

Quisiera agradecer al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas ( C.E.N.A.I.M. ) "Edgar Arellano M." y a Jorge Calderón, Ph.D., director de este centro, por la oportunidad que me brindaron para la ejecución de esta tesis.

A Eric Mialhe, Ph.D., State Doctorate, director de tesis, tengo que agradecerle todo el cariño y confianza que deposita en cada uno de sus "hijos" tesistas. Quiero que sepas que estoy orgullosa de conocerte y de haber trabajado contigo todo este tiempo, además sabes que puedes contar conmigo para lo que sea y cuando quieras.

A Lucía Carrera, Dra., tengo que agradecerle la paciencia y dedicación en la corrección de esta tesis. Gracias por enseñarme la importancia de la relación estrecha que existe entre la bacteriología y la larvicultura del camarón. Y sobre todo gracias por enseñarme que la vida debe vivirse intensamente a pesar de los obstáculos que podamos encontrar en ella. Además, quiero dejar constancia del profundo afecto y admiración que siento hacia ti, sentimientos que perdurarán por siempre en mi corazón. Nunca te olvidaré, porque fuiste una buena madre. Eternamente gracias.

Mi sincero agradecimiento a Emmerick Motte, Tnlg., quien demostró siempre mucha paciencia en enseñarme todo lo que necesitaba aprender de Biología Molecular. Siempre que necesite su ayuda (fueron muchas veces), él estaba dispuesto a ayudarme desinteresadamente y con muy buen ánimo.

A mi amiga Rafaela Ruiz, muchísimas gracias por ayudarme en la realización de las experimentaciones destinadas a la caracterización genética de la cepa bacteriana analizada. Fuiste una gran maestra.

A Phillipe Audiot, Tnlg., y Gabriel Rivera, Ac., por enseñarme técnicas de inmunodiagnóstico y técnicas de microbiología clásica, respectivamente; sin las cuales, esta tesis no hubiera podido ser realizada.

Quiero agradecer a Peter Robertson, estudiante de Doctorado de la Universidad de Edimburgo en Escocia, por sus acertados comentarios e ideas, que me permitieron una mejor comprensión de la interacción y mecanismos de acción de distintas cepas bacterianas.

A mis compañeros tesisistas: Paola, César, Rubén, Edward, Ricardo, por todo el apoyo que me han brindado.

A Marcelo Muñoz, gracias por tu valiosa ayuda en la realización del formato de esta tesis, sin ti no hubiera terminado nunca.

A Lorena San Miguel, mi ahijada, tengo que darle gracias por que además de ser mi compañera de trabajo, me dio la oportunidad de ser su amiga. El camino aún es largo y difícil, pero estoy segura que podremos avanzar si seguimos juntas.

A mi querida amiga Lilia, tendría que agradecerle muchas cosas, ya que son siete años de conocernos. Tú eres una de las personas que mejor me conocen, y a pesar de todo siempre me has aceptado como soy, incluso cuando estoy de mal genio ( y no soy una buena compañía ). Gracias por todo, y espero que sean muchos años más los que estemos juntas.

Quiero agradecerle a Chabi su amistad y los consejos que siempre me ha dado. Además, quiero que sepas que te admiro por tu personalidad y forma de ser, porque siempre estás de buen humor y con tu alegría no permites que tus amigos estén tristes.

A Ernesto quiero agradecerle su amistad, que a pesar de muchos contratiempos, ha podido mantenerse a través de los años.

A mis amigos Fernando, Isadora, Victor, Arturo, Mario, Pablo y a los tres Xavier ( Arcentales, Serrano y Ramos ) quiero agradecerles el

apoyo que he recibido durante todo el tiempo que llevamos conociéndonos.

Manolo, a ti tengo que agradecerte que esta tesis esté terminada, ya que me ayudaste muchísimo en la escritura de la misma. Tengo que darte gracias por todo el apoyo que me diste durante el Congreso y en muchos momentos difíciles de la realización de este trabajo. Para ti, todo mi cariño y amistad.

A Lorena Schwarz por la ayuda brindada en los trámites necesarios para la presentación de este trabajo.

Y a todas las personas que de una u otra manera me ayudaron en la realización de esta tesis, queda mi más profundo e imperecedero agradecimiento.



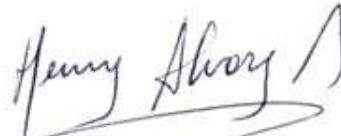
Victor Osorio, Msc.  
Presidente del Tribunal



Jorge Calderón V., Ph.D.  
Supervisor de Tesis



Eric Mialhe, Ph. D.  
Director de Tesis



Henry Alvarez, Ac.  
Miembro Principal

## DECLARACION EXPRESA

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

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

María Teresa Zherdmant Vélez

María Teresa Zherdmant Vélez



## RESUMEN

La producción y el desarrollo de la larvicultura de camarón en Ecuador, así como en otros países, se ha visto afectada por problemas patológicos, particularmente, de origen bacteriano de tipo vibriosis.

El control de enfermedades bacterianas depende de una mejor caracterización y conocimiento de las cepas asociadas a las larvas, con el fin de determinar aquellas que son patógenas y aquellas que son probióticas. Teniendo este objetivo, se ha desarrollado un programa de investigación enfocado al estudio de una cepa de *Vibrio harveyi* ( E<sub>22</sub> ) asociada al síndrome de "bolitas" y de cepas de *Vibrio alginolyticus* (II1 y 158) utilizadas como posibles probióticos.

La caracterización bioquímica de la cepa E<sub>22</sub> de *Vibrio harveyi* fue complementada por una caracterización del material genético con RFLP y determinándose la ausencia de ADN plasmídico y por una caracterización antigénica mediante el uso de anticuerpos monoclonales. Estos anticuerpos permitieron desarrollar un test de tipo colony - blot para detectar y cuantificar a esta bacteria cuando está presente en mezclas de bacterias asociadas al camarón.

Las características de crecimiento de cada cepa fueron analizadas en relación a diferentes parámetros físico-químicos ( pH, salinidad y temperatura ) y a la presencia de diferentes productos utilizados en la larvicultura de camarón ( EDTA, tiosulfato, nitrato sódico, fosfato

sódico, sacarosa, antibióticos ). Estos análisis no permitieron identificar una condición más favorable para las bacterias de tipo probiótico y consecuentemente explotable en larvicultura, con excepción del uso de la oxitetraciclina, que a una concentración de 2.4 ppm tiene un efecto letal para E<sub>22</sub> y solamente inhibidor para las cepas probióticas. Las interacciones entre bacterias de tipo patógeno y probiótico fueron estudiadas mediante experiencias de co-cultivos *in vitro* . Los resultados no revelaron un efecto inhibidor de la cepa ILI sobre la cepa E<sub>22</sub> , pero, mostraron una tasa de multiplicación mayor, que podría estar relacionado con su capacidad probiótica.

Este trabajo que integra nuevas metodologías para la caracterización y el análisis *in vitro* de cepas bacterianas, constituye un primer modelo para el estudio enfocado al control de las bacterias asociadas con larvas de camarón.

## INDICE GENERAL

RESUMEN.....	i
INDICE GENERAL.....	iii
INDICE DE TABLAS.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	viii
INDICE DE FOTOS.....	xi
INTRODUCCION.....	xii

### CAPITULO I

<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>15</b>
1.1. Larvicultura y cultivo de camarón.....	15
1.2. Enfermedades virales.....	17
1.3. Enfermedades bacterianas asociadas al camarón.....	20
1.4. Caracterización bacteriana.....	26
1.4.1. Vibrios.....	31
1.4.2. Características y biología del <i>Vibrio cholerae</i> .....	33
1.4.3. Vibrios marinos.....	36

### CAPITULO II

<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>41</b>
2.1. Material biológico.....	41
2.1.1. Cepas bacterianas.....	41
2.1.2. Anticuerpos monoclonales.....	42

2.2. Técnicas bacteriológicas.....	43
2.2.1. Aislamiento de bacterias.....	43
2.2.2. Medios de aislamiento y cultivo.....	44
2.2.3. Pruebas de identificación bacteriana.....	46
2.2.3.1. Identificación morfológica.....	46
2.2.3.2. Identificación bioquímica.....	47
2.2.3.3. Siembra de bacterias para identificación bacteriana.....	56
2.3. Pruebas antigénicas.....	59
2.3.1. Colony blot.....	59
2.4. Pruebas genéticas.....	61
2.4.1. Obtención de plásmidos.....	61
2.4.2. Eliminación de ARN.....	63
2.4.3. Obtención de ADN genómico.....	64
2.4.4. Digestión con enzimas de restricción.....	65
2.4.5. Preparación de gel de agarosa para electroforesis.....	65
2.5. Antibiograma / MIC.....	66
2.5.1. Cultivo bacteriano.....	67
2.5.2. Lectura de densidad óptica al espectrofotómetro.....	67
2.5.3. Preparación de soluciones stock de antibióticos.....	68
2.5.4. Siembra en microplacas.....	68
2.6. Estudio comparativo de parámetros de cultivo sobre	

el crecimiento de una cepa patógena ( E <sub>22</sub> ) y cepas probióticas ( ILI y 158 ).....	69
2.6.1. Siembra en microplacas.....	70
2.7. Estudio <i>in vitro</i> de las interacciones patógeno / probiótico.....	71

### CAPITULO III

<b>RESULTADOS</b> .....	72
3.1. Caracterización de la cepa bacteriana E <sub>22</sub> .....	72
3.1.1. Caracterización bioquímica.....	72
3.1.2. Caracterización genética.....	75
3.1.3. Caracterización antigénica.....	76
3.1.4. Desarrollo de una prueba inmunológica de tipo “colony-blot”.....	78
3.2. Estudio comparativo de parámetros de cultivo sobre el crecimiento de la cepa “patógena” E <sub>22</sub> y las cepas “probióticas” ILI y 158.....	81
3.2.1. Determinación de las características de crecimiento de las diferentes cepas bacterianas en el medio de referencia.....	82
3.2.2. Comparación del crecimiento de las cepas E <sub>22</sub> , ILI y 158 en relación a la salinidad.....	83
3.2.3. Comparación del crecimiento de las cepas E <sub>22</sub> , ILI y 158 en relación a la temperatura.....	86
3.2.4. Comparación del crecimiento de las cepas E <sub>22</sub> , ILI y 158 en relación al pH.....	88

3.2.5. Comparación del crecimiento de las cepas E <sub>22</sub> , ILI y 158 en relación a la concentración de EDTA.....	92
3.2.6. Comparación del crecimiento de las cepas E <sub>22</sub> , ILI y 158 en relación a la concentración de tiosulfato.....	94
3.2.7. Comparación del crecimiento de las cepas E <sub>22</sub> , ILI y 158 en relación a la concentración de productos utilizados empíricamente en el cultivo de probióticos.....	96
3.2.8. Determinación de concentraciones inhibitoras y letales de antibióticos de uso común (cloranfenicol, oxitetraciclina, cotrimoxazol, eritromicina, furazolidona) o inusuales (kanamicina, ampicilina) en larvicultura.....	102
3.3. Estudio <i>in vitro</i> de las interacciones “patógeno / probiótico”.....	108
CONCLUSIONES.....	116
RECOMENDACIONES.....	118
BIBLIOGRAFIA.....	119

## INDICE DE TABLAS

- Tabla No.1.** Características diferenciales entre géneros y familias en el Grupo 5 del Manual de Bergey.....39
- Tabla No.2.** Diferenciación del género *Vibrionaceae* .....40
- Tabla No.3.** Criterios de identificación morfológica y bioquímica de la cepa E<sub>22</sub> comparados con las reacciones características de una cepa de *Vibrio harveyi* , según el Manual de Bergey (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth Edition, 1994).....74
- Tabla No.4.** Valores medios  $\pm$  desviación estándar del crecimiento de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, en las condiciones de referencia.....85
- Tabla No.5.** Valores medios  $\pm$  desviación estándar del crecimiento de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, en diferentes condiciones de salinidad.....88
- Tabla No.6.** Valores medios  $\pm$  desviación estándar del crecimiento de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, en diferentes condiciones de temperatura.....90
- Tabla No.7.** Valores medios  $\pm$  desviación estándar del crecimiento de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, en diferentes condiciones de pH.....93

- Tabla No.8.** Valores medios  $\pm$  desviación estándar del crecimiento de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, en diferentes condiciones de pH (medio tamponado).....95
- Tabla No.9.** Valores medios  $\pm$  desviación estándar del crecimiento de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, en diferentes condiciones de EDTA.....98
- Tabla No.10.** Valores medios  $\pm$  desviación estándar del crecimiento de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, en diferentes condiciones de tiosulfato.....101
- Tabla No.11.** Valores medios  $\pm$  desviación estándar del crecimiento de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, en diferentes condiciones de nitratos.....104
- Tabla No.12.** Valores medios  $\pm$  desviación estándar del crecimiento de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, en diferentes condiciones de fosfatos.....106
- Tabla No.13.** Valores medios  $\pm$  desviación estándar del crecimiento de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, en diferentes condiciones de sacarosa.....108
- Tabla No.14.** Efecto de distintos antibióticos a diferentes concentraciones sobre las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158 sembradas a una densidad de 100.000 bact/pocillo.....112



**Tabla No.15.** Efecto de distintos antibióticos a diferentes concentraciones sobre las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158 sembradas a una densidad de 1'000.000 bact/pocillo.....113

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura No.1.</b>	Morfología de una célula bacteriana Gram - positiva.....	27
<b>Figura No.2.</b>	Mecanismo de la conjugación bacteriana.....	28
<b>Figura No.3.</b>	Transformación bacteriana.....	30
<b>Figura No.4.</b>	Transducción generalizada por medio de bacteriofagos.....	32
<b>Figura No.5</b>	Técnica de aislamiento por estrías.....	44
<b>Figura No.6.</b>	Inoculación bacteriana para pruebas bioquímicas.....	58
<b>Figura No.7.</b>	Técnica de colony-blot.....	59
<b>Figura No.8.</b>	Siembra en microplacas de bacterias.a diferentes condiciones de cultivo.....	71
<b>Figura No.9.</b>	Curva de crecimiento en función del tiempo de las cepas E <sub>22</sub> , ILI y 158 , en las condiciones de referencia.....	83
<b>Figura No.10.</b>	Curva de crecimiento en función del tiempo de las cepas E <sub>22</sub> , ILI y 158, en diferentes concentraciones de salinidad.....	85
<b>Figura No.11.</b>	Curva de crecimiento en función del tiempo de las cepas E <sub>22</sub> , ILI y 158, a diferentes condiciones	

- de temperatura.....87
- Figura No.12.** Curva de crecimiento en función del tiempo de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, a diferentes condiciones de pH.....89
- Figura No.13.** Curva de crecimiento en función del tiempo de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, a diferentes condiciones de pH con tampón HEPES.....91
- Figura No.14.** Curva de crecimiento en función del tiempo, a distintas concentraciones de EDTA de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158.....94
- Figura No.15.** Curva de crecimiento en función de la presencia de tiosulfato a distintas concentraciones, de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158.....96
- Figura No.16.** Curva de crecimiento en función de la presencia de nitrato sódico a distintas concentraciones, de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158 .....98
- Figura No.17.** Curva de crecimiento en función de la presencia de fosfato sódico a distintas concentraciones, de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158 .....100
- Figura No.18.** Curva de crecimiento en función de la presencia de sacarosa a distintas concentraciones, de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158 .....102

- Figura No.19.** Porcentajes de las cepas  $E_{22}$  e ILI, obtenidos de la interacción  $E_{22}$  / ILI, mediante la observación de colonias verdes y amarillas.....110
- Figura No.20.** Porcentajes de las cepas  $E_{22}$  y 158, obtenidos de la interacción  $E_{22}$  / 158, mediante la observación de colonias verdes y amarillas.....111
- Figura No.21.** Porcentajes de las cepas  $E_{22}$  e ILI, obtenidos de la interacción  $E_{22}$  / ILI, reconocidas por los anticuerpos 2C9 y 2B6.....113
- Figura No.22.** Porcentaje de la cepa  $E_{22}$ , de la interacción  $E_{22}$  / 158, reconocidas por el anticuerpo 2C9 y porcentaje de la presencia de la cepa 158 en la muestra.....114

## INDICE DE FOTOS

<b>Foto No.1.</b> Tinción de Gram de la cepa E <sub>22</sub> .....	46
<b>Foto No.2.</b> Gel de agarosa para electroforesis.....	66
<b>Foto No.3.</b> Lector de ELISA.....	68
<b>Foto No.4.</b> Identificación bioquímica de la cepa E <sub>22</sub> .....	73

## INTRODUCCION

La actividad acuícola en el Ecuador ha desarrollado el cultivo en cautiverio del camarón *Penaeus vannamei*. Uno de los factores claves en la industria camaronera es la regular y creciente provisión de postlarvas que no puede ser cubierta únicamente por la recolección del medio natural.

Esto trajo como consecuencia que a partir de 1984 para garantizar el regular abastecimiento de postlarvas de camarón, fueran instalados laboratorios debidamente equipados para obtener inicialmente, larvas de la especie *P. vannamei*, aunque actualmente también se producen larvas de *P. stylirostris*.

Sin embargo, los sembradores prefieren adquirir las postlarvas silvestres aduciendo que su supervivencia y desarrollo son mejores. Por lo tanto, es necesario una optimización de la producción de postlarvas en laboratorios, para así obtener larvas de buena calidad, que tengan una mejor adaptación a las condiciones de manejo y puedan enfrentar las enfermedades que se producen durante el cultivo.

Diversas enfermedades infecciosas han afectado el rendimiento de muchos laboratorios. Diferentes grupos de bacterias han sido implicados como causantes de enfermedades y mortalidad en peneidos cultivados, siendo los vibrios los agentes bacterianos comúnmente encontrados en estas patologías. Sin embargo, las bacterias son mal entendidas

epidemiológicamente hablando, esto se debe a la falta de métodos de diagnóstico y de controles zoonosanitarios adecuados.

Hasta ahora, las técnicas utilizadas para la identificación de enfermedades bacterianas en los laboratorios de producción de larvas de camarón se basan en la observación del color de las colonias en cultivo en agar TCBS y la caracterización de aislados patógenos y no patógenos en función de su color verde o amarillo, asumiendo que las colonias verdes son patógenas y las amarillas no patógenas. Esto es un criterio primitivo, si se toma en cuenta que la expresión de un color en un medio específico está dado por un gen diferente al involucrado en la patogenicidad de la cepa y no tienen relación obligatoria.

También se recurre a la identificación de bacterias por medio del uso de pruebas bioquímicas, que requieren un tiempo no disponible cuando se presenta una epidemia en un laboratorio y que además no aportan datos que permitan distinguir entre especies ni cepas patógenas y no patógenas o incluso probióticas. Por otro lado, el uso rutinario de antibióticos a concentraciones subletales ha contribuido al desarrollo de cepas resistentes.

Por lo tanto, actualmente se requieren técnicas que permitan obtener una identificación precoz y acertada de los agentes patógenos que afectan a la larvicultura del camarón, lo que permitirá tomar medidas de prevención y control antes de que se manifiesten los síntomas de la enfermedad y se produzcan mortalidades en los tanques de cultivo. A largo plazo, se pretende lograr una mejor utilización de las bacterias probióticas en los laboratorios lo que va a ayudar a controlar las

bacterias patógenas que afectan al camarón; además, se debe tratar de conseguir líneas de camarones resistentes a enfermedades, por medio de la selección genética de los mismos.

El objetivo de este estudio es poder estandarizar técnicas de identificación y caracterización que permitan detectar y diagnosticar rápida y fácilmente cepas bacterianas. Para esto, se ha desarrollado en el CENAIM, en el contexto de tesis de grado, un primer modelo bacteriológico que corresponde a la caracterización de una cepa de *Vibrio harveyi* ( E<sub>22</sub> ) responsable del síndrome de " bolitas ". Tomando como referencia las técnicas de diagnóstico utilizadas en salud pública y veterinaria, se han elaborado sondas moleculares (anticuerpos monoclonales y sondas nucleicas) que permiten caracterizar estas bacterias a nivel antigénico y genético. Estas sondas han sido probadas como reactivos específicos muy útiles en la elaboración de tests de diagnóstico rápido, como el colony blot. Además, estas sondas y los ensayos han permitido iniciar estudios de las interacciones *in vitro* entre una cepa patógena de *Vibrio harveyi* ( E<sub>22</sub> ) y dos cepas de *Vibrio alginolyticus* (111 y 158) potencialmente probióticas, con el objetivo de determinar las condiciones de crecimiento, los mecanismos de acción y la naturaleza patógena o probiótica de las mismas. Esta información es necesaria para establecer modelos que nos servirán para tener un mejor control de las vibriosis que se presentan en los laboratorios de larvas de camarón mediante la utilización adecuada de bacterias probióticas.



# CAPITULO I

## ANTECEDENTES

### 1.1.- LARVICULTURA Y CULTIVO DE CAMARON

Ecuador se ha convertido en el primer país productor de camarón del hemisferio occidental ( 75% de la producción total ), es el quinto productor a nivel mundial y el segundo mayor productor mundial de camarón en cautiverio. La principal especie cultivada es el *Penaeus vannamei* , conocido como Camarón blanco del Pacífico. La tecnología de cultivo puede ser clasificada como semi-intensiva y semi-extensiva con un promedio anual cosechado de 2250 libras por hectáreas de camarones enteros ( Cámara Nacional de Acuicultura, 1995 ).

La industria ecuatoriana del camarón está orientada hacia la exportación. El camarón representa el 35% de las ventas al exterior de productos primarios, siendo el segundo producto no petrolero que mayores ingresos genera al país superado sólo por el banano; en 1994 se exportaron 504 millones de dólares. Estados Unidos es el mercado más importante para las exportaciones ecuatorianas. El 65.4% de las ventas externas de camarón se dirigen a ese país siendo Ecuador el segundo proveedor del producto para ese país. Las exportaciones ecuatorianas a los países de la Unión Europea se incrementan y la demanda del producto

cobra mayor interés e importancia ( Cámara Nacional de Acuicultura, 1995).

Este desarrollo acelerado de la industria de la acuicultura le ha permitido al Ecuador tener una de las infraestructuras más grandes y más altamente especializadas de laboratorios de larvas y de industria de alimentos para especies acuícolas ( Cámara Nacional de Acuicultura, 1995 ).

En 1968 aparecen los pioneros de la industria camaronera ecuatoriana y se instalan fincas en una superficie de 283 hectáreas. Al llegar a 1976 las fincas de camarón habían alcanzado las 6475 hectáreas. Pero realmente fue en 1977 cuando en Ecuador se inicia la industria de la acuicultura, con el cultivo del camarón silvestre en cautiverio. Desde entonces no sólo aumentaron las empresas que invirtieron en los cultivos, sino que el sector se diversificó y cada vez fueron más las empacadoras, laboratorios y fábricas de alimentos para camarón y una serie de industrias relacionadas con la actividad acuícola ( Cámara Nacional de Acuicultura, 1995 ).

El desarrollo de los laboratorios de larvas en Ecuador lo inició Semacua en 1979 con un proyecto integrado de producción de larvas de camarón con tecnología francesa ( Barniol R., 1995 ).

El año de 1984 fue decisivo para el crecimiento de los laboratorios. El fenómeno climático contrario de El Niño, llamado La Niña, sumado a la enorme competencia por encontrar larvas para las camaroneras hizo pensar al sector en la necesidad de

contar con instalaciones de producción de larvas (Barniol R., 1995).

Desde entonces han surgido 343 laboratorios ( Subsecretaría de Recursos Pesqueros, 1995 ) que abastecen un alto porcentaje de la semilla requerida para los cultivos en las camaroneras. Sin embargo, muchos de los laboratorios de larvas actualmente están en crisis debido, en parte, a la aparición de enfermedades, siendo las más importantes las causadas por virus y bacterias, y entre éstas últimas, las vibriosis parecen ser las principales responsables de altas mortalidades.

## 1.2.- ENFERMEDADES VIRALES

Los virus son los más diversos y numerosos de los agentes microbianos descritos para los crustáceos marinos. Actualmente más de 30 virus pertenecientes a las familias: Parvoviridae, Herpesviridae, Baculoviridae, Picornaviridae, Reoviridae, Birnaviridae, Rhabdoviridae y Bunyaviridae han sido descritos.

Ciertos virus encontrados en tejidos de crustáceos no están asociados con ninguna enfermedad descrita. Para algunos de estos agentes, el estadio más crítico del huésped no ha sido examinado. Otros virus simplemente están bien adaptados al huésped y la infección no implica el desarrollo de enfermedad.

Muchos ejemplos de infecciones virales asociados a daños celulares han sido reportados en crustáceos del medio silvestre (Couch, 1974; Sparks and Morado, 1986 en Brock and Lightner,

1990 ); corroborando datos que demuestran que las infecciones resultantes en morbilidad y mortalidad bajo condiciones naturales son deficientes.

En la acuicultura de camarones marinos, los virus producen las mayores pérdidas por enfermedad por lo que el manejo de las enfermedades virales es particularmente importante para el éxito del cultivo. Desde que el cultivo de camarón se inició con la captura de animales salvajes, numerosas patologías de tipo viral han sido detectadas en los sistemas de cultivo. Además, estos patógenos continúan diseminándose sobre amplias áreas geográficas con el traslado de stocks de camarones para propósitos acuícolas (Brock and co-authors, 1983; Lightner and co-authors, 1983; Colorni and co-authors, 1987; Lightner and Redman, in press, en Brock and Lightner, 1990).

Uno de los virus que comúnmente afectan a distintas especies de camarones es el *Baculovirus penaei*, que se encuentra afectando el hepatopáncreas de juveniles y adultos, es el causante de epidemias agudas en las poblaciones de camarones en los laboratorios. El *B. penaei* es uno de los dos virus más comunes en el cultivo de camarón en América, otro es el IHHN. Sin embargo, la infección por *B. penaei* es la causa más frecuente de mortalidad en los laboratorios de *Penaeus vannamei* ( Akamine and Moores, 1989, en Lightner, 1984 ).

Al detectarse inicialmente esta enfermedad, estaciones de cuarentena que revisaban las heces de las hembras se pusieron de

moda en desovaderos y laboratorios integrados. En corto tiempo estas instalaciones o procedimientos se desecharon ya que se comprobó que el porcentaje de hembras infectadas era muy alto en el medio natural, que el método de detección viral no era muy eficiente y que en las instalaciones de maduración se mantenía la presencia del virus pese a la selección por cuarentena. Por lo tanto, el control de la infección por *B. penaei* en laboratorios comerciales de camarón varía dependiendo de la crianza y manejo del sistema de cultivo ( Barniol, R., 1995 ).

Otra enfermedad de tipo viral que afecta el cultivo de camarones peneidos es el Síndrome de Rostrum Deforme y enanismo ( RDS ), provocada por la presencia del virus IHHN. Su diagnóstico se lo hacía por medio de histología observando cuerpos de inclusión. Nuevas técnicas más sensibles de detección de este virus, por medio del uso de sondas généticas confirman el alto índice de presencia viral en los reproductores del medio natural e instalaciones de maduración ( Barniol, R., 1995 ).

Los signos reportados de la enfermedad están basados principalmente en observaciones hechas con juveniles cultivados de *Penaeus stylirostris* . Los juveniles *P. stylirostris* clínicamente afectados se presentan débiles, erráticos, invertidos, con nado en la superficie; eventualmente, detienen sus movimientos y se hunden lentamente hacia el fondo del tanque con reflejos lentos. Otros signos son no específicos e incluyen anorexia, letargia y debilidad. La mortalidad puede exceder el 90% dentro de pocas semanas y

darse la mortalidad en animales de 0.05 a 2.0 g (Bell and Lightner, 1987, en Brock and Lightner, 1990).

### 1.3.- ENFERMEDADES BACTERIANAS ASOCIADAS AL CAMARON

Las bacterias marinas se encuentran entre los principales agentes etiológicos causantes de enfermedades en crustáceos marinos, capturados del medio natural o cultivados. Las bacterias Gram - negativas son predominantes en los ambientes marinos ( Brisou and co-authors, 1965, en Lightner, 1992 ) y usualmente constituyen la mayor parte de la flora intestinal de crustáceos, aunque también son importantes para los crustáceos marinos las bacterias Gram - positivas.

Un número de bacterias han sido implicadas como causantes de enfermedad y mortalidad en peneidos cultivados, especialmente en los estadios de larva, postlarva y juvenil ( Johnson, 1978; Lightner, 1983, en Lightner, 1984 ).

Entre las bacterias Gram - negativas que causan septicemias en crustáceos marinos predominan los miembros de la familia Vibrionaceae, principalmente del género *Vibrio* ( Baticados, 1988, en Brock and Lightner, 1990 ). El *V. parahaemolyticus* es frecuentemente reportado como patógeno para ciertos crustáceos marinos ( Lightner, 1988, en Brock and Lightner, 1990 ). Otros vibrios implicados son *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. algosus*, *V. harveyi* y *V. splendidus*, *V. panulirus*, *V. cholerae*

(non 0-1) y *Vibrio* sp. Otras bacterias Vibrionaceae oxidasa - positiva, implicadas en enfermedades bacterianas del camarón son las *Aeromonas* sp. ( Lightner and Lewis, 1975; Lightner, 1988, en Brock and Lightner, 1990 ). Epidemiológicamente, la vibriosis ocurre cuando el huésped marino es afectado y los mecanismos de defensa no están capacitados ni para prevenir la entrada de las bacterias ni para impedir la multiplicación bacteriana una vez que los organismos han invadido al hospedador.

La vibriosis puede ocurrir tanto en animales cultivados o capturados, en todas las especies y estadios de crecimiento, pero particularmente en animales jóvenes ( larvas a postlarvas ) bajo ciertas circunstancias como la alta temperatura del agua, la mala calidad de la misma, bajo recambio de agua y poco oxígeno disuelto, que pueden ser considerados como factores estresantes (Barkate, 1972; Vanderzant and co-authors, 1970; Lewis, 1973; Lightner and Lewis, 1975; Lightner, 1977, 1983, 1985, 1988; Leong and Fontaine, 1979; Tareen, 1982; Takahashi and co-authors, 1985; Sunaryanto, 1986; Baticados, 1988, en Brock and Lightner, 1990).

Las infecciones bacterianas en camarones puede tomar cuatro formas generales: erosiones de la cutícula de la superficie del cuerpo, agallas, y apéndices ( necrosis bacterial y enfermedad del caparazón ), lesiones localizadas dentro del cuerpo, septicemias generalizadas y evacuaciones significativas de heces ( Lightner, 1983, en Lightner, 1984 ).

Los signos y las lesiones que se presentan incluyen letargia y debilidad, conducta hiperactiva antes de gran inactividad, desorientación en el nado, reclinación sobre el lado dorsal, ventral o lateral, flexión dorsal de la cola o una posición baja de la cabeza, movimiento lento y continuo de los pleópodos y periópodos. La muerte por septicemias bacterianas es rápida en peneidos infectados experimentalmente y ocurre dentro de 2 a 4 horas después de iniciarse la presencia de los signos clínicos.

En general, los bacilos Gram - negativos crecen fácilmente en agar de soya ( Tryptic Soy Agar, TSA ), agar de infusión de cerebro y corazón ( Brain Heart Infusion Agar, BHI ), agar marino, y el medio selectivo Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (TCBS), por lo que estos medios son utilizados habitualmente en los laboratorios de larvas de camarón para la determinación de la carga bacteriana presente en los mismos.

La prevención de las enfermedades bacterianas en los laboratorios de larvas de camarón se basa en una serie de medidas de manejo y tratamientos químicos. Entre las medidas de manejo se destaca el mantenimiento de la calidad de agua con una baja biomasa de bacterias mediante el uso de desinfección o filtración del agua de entrada o de recirculación; el control de las temperaturas extremas o variaciones bruscas; el uso de dietas nutricionalmente balanceadas, la reducción al máximo posible de la manipulación de los animales y el uso de bacterias probióticas.



Los productos químicos se utilizan tanto como profilaxis como terapéuticamente. Los químicos utilizados son de dos tipos: sustancias antibióticas y no antibióticas. Algunos de los compuestos usados para el tratamiento de larvas de peneidos son el ácido etilen diamino tetracético ( ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA de 10 a 50 ppm ), verde de malaquita ( 5 a 10 ppb ). Entre los antibióticos de uso más frecuente en acuicultura destacan el cloranfenicol ( 1 a 10 ppm ), la furazolidona ( 1 a 5 ppm ) y otros ( Baticados, 1988, en Brock and Lightner, 1990 ). En juveniles y adultos peneidos los antibióticos son administrados de forma rutinaria en el alimento ( Takahashi, 1985, en Brock and Lightner, 1990 ).

En acuicultura, el uso de probióticos en laboratorios comerciales de *P. vannamei* en el Ecuador, ha sido reportado por Morales ( 1992 ), y Garriques y Arévalo ( 1995 ). Los probióticos surgen como una alternativa al uso de antibióticos para el control de enfermedades en larvas de camarón ( Austin *et al.*, 1995 ). Giovanni Chasin en 1990, fue la primera persona en utilizar este tipo de bacterias e implantar su uso en los laboratorios de larvas.

Los probióticos se definen como: "preparaciones que contienen microorganismos cuyos metabolitos, cuando se utilizan como aditivos alimenticios benefician al huésped. En la mayoría de los casos, los probióticos incluyen microorganismos que son capaces de crecer y/o funcionar en el tracto digestivo del animal" (Smoragiewicz *et al.*, 1993).

Varias enfermedades de tipo bacteriano han afectado la producción de los laboratorios ecuatorianos, especialmente a los de mayor tamaño, produciendo elevados porcentajes de mortalidad en los sitios afectados ( Depto. de Comercio de los Estados Unidos, 1991 ).

### Síndrome de bolitas

Las primeras mortalidades atribuidas a esta enfermedad fueron observadas a finales del año 1987 por el equipo de biólogos de INBIOSA ( Morales I., 1992 ). En Ecuador este síndrome se ha desarrollado tanto en laboratorios de cultivo de *Penaeus vannamei*, como de *P. stylirostris* ( Bell T. A. and Lightner D., 1991 ).

Al inicio, se pensó que la enfermedad se limitaría a los laboratorios existentes en el área del Guayas pero algunos laboratorios de Manabí reportaron brotes epidémicos. Los observadores consideraron que esta enfermedad estaba relacionada con cambios experimentados en la calidad del agua, que a su vez afectan las algas, con altos recuentos bacterianos, con bajas temperaturas y con nauplios débiles. Los operadores de laboratorios reportaron que se logró un éxito creciente en el control de las "bolitas" con el uso de grandes dosis de antibióticos y filtración del agua ( Depto. de Comercio de los Estados Unidos, 1991 ).

No obstante, la constante presencia de niveles significativos de bacterias quitinofílicas en la cutícula de los apéndices bucales,

esófago, estómago, hepatopáncreas e intestino, la eficacia aparente de ciertos antibióticos y la filtración del agua en el control de las mortalidades en las fases tempranas de la enfermedad hicieron pensar que la enfermedad era de etiología bacteriana ( Bell T. A. and Lightner D., 1991 ).

Los primeros signos clínicos son anorexia y ausencia de alimento en el tracto intestinal. Al microscopio óptico se observa descamación de las células epiteliales del hepatopáncreas e intestino, que se observan individualizadas dentro de la luz intestinal, los túbulos hepatopancreáticos generalmente contienen grandes cantidades de células epiteliales desprendidas ( Bell T. A. and Lightner D., 1991 ), dando el aspecto de bolitas, lo que dio el nombre a la enfermedad. Por último, los movimientos contráctiles del tubo digestivo cesan y la muerte llega rápidamente ( Morales I., 1992 ).

La mayor incidencia del síndrome se observa durante los estadios de postlarva, pero las mortalidades son mayores cuando se presenta en estadios más jóvenes como zoea y mysis, pudiendo llegar a perderse el 90% de la población en 24 horas ( Morales I., 1992 ).

Cuando macerados de larvas procedentes de tanques afectados eran cultivados en TCBS las colonias encontradas a las 24 horas eran concéntricas, verdes y de aproximadamente 5 mm de diámetro. Estas colonias fueron identificadas bioquímicamente como *V. harveyi*, por lo que se consideró que este vibrio era el

agente causal del síndrome de bolitas. En muestras de cultivos sanos no se encuentra esta dominancia ( Morales I., 1992 ).

Como conclusión, se conoce que las especies de *Vibrios* son los principales causantes de enfermedades para los camarones peneidos, pero existen muchos problemas en cuanto a la identificación y caracterización de las mismas. Por lo tanto, es importante realizar una caracterización más detallada, por medio de pruebas bioquímicas, antigénicas y genéticas, antes de poder pensar en términos de diagnóstico.

#### 1.4.- CARACTERIZACION BACTERIANA

##### Morfología de las bacterias

Las bacterias son organismos procariotas pequeños y simples en estructura cuando son comparados con las células eucariotas. Las bacterias representan uno de los grupos más importantes de organismos debido a la importancia ecológica y práctica que tienen para los humanos ( Prescott L., Harley J., Klein D., 1993 ).

El tamaño de las células individuales van de  $<1 \mu\text{m}$  a  $250 \mu\text{m}$ ; pero la mayoría están aproximadamente entre 1 y  $10 \mu\text{m}$ . Las formas más comunes de las bacterias son: bacilos, cocos y espirales ( Singleton P. and Sainsbury D., 1993 ).

Dependiendo de las especies, las bacterias pueden tener ciertos apéndices como flagelos, pili, etc. ( Figura 1 ) Las bacterias

pueden estar solas o en pares, cadenas, paquetes, etc. Algunas presentan motilidad (Singleton P. and Sainsbury D., 1993).

Según la especie, las bacterias pueden ser aerobios o anaerobios obligados o facultativos; pueden ser quimiotrofos y/o fototrofos; heterótrofos o autótrofos. La energía pueden obtenerla por medio de procesos de fermentación, respiración o fotosíntesis ( Singleton P. and Sainsbury D., 1993 ).

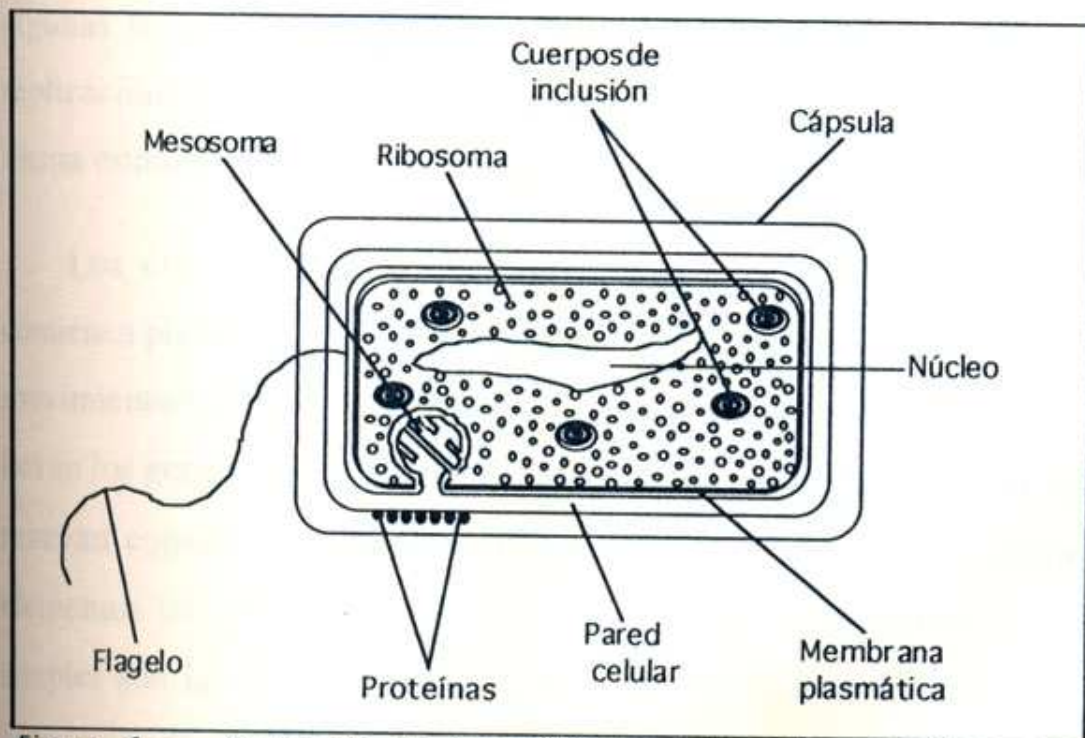


Figura 1.- Morfología de una célula bacteriana Gram-positiva. Las bacterias Gram-negativas son similares en morfología.

### Genética bacteriana

La reproducción ocurre asexualmente, comúnmente por fisión binaria y algunas veces por gemación o fisión ternaria. Algunas bacterias forman endosporas, cistos u otras formas resistentes. Aunque la reproducción sexual no se da, la transferencia de genes

entre bacterias puede ocurrir por medio de conjugación, transducción o transformación ( Singleton P. and Sainsbury D., 1993 ).

La conjugación o transferencia directa se da por el contacto físico temporal entre bacterias y depende de la presencia de una pieza extra de ADN circular o plásmido (Fig. 2). Los plásmidos son pequeñas moléculas de ADN circular, independientes del ADN cromosómico y presentes en numerosas bacterias ( también en algunas levaduras y hongos ). Tienen sus propios orígenes de replicación, se replican de forma autónoma y son heredados de forma estable ( Prescott L., Harley J., Klein D., 1993 ).

Los cromosomas de bacterias, virus y células eucarióticas contienen piezas de ADN que se mueven en torno al genoma. Este movimiento se llama transposición. Los fragmentos de ADN que llevan los genes necesarios para este proceso, y que por lo tanto se muevan constantemente alrededor de los cromosomas se llaman elementos transposables o transposones. Los transposones más simples son las secuencias de inserción o elementos IS, que son secuencias cortas de ADN que contienen los genes de aquellas enzimas que se requieren para su transposición y que se unen en ambos extremos a secuencias idénticas o muy similares de nucleótidos en orientación inversa o repeticiones inversas ( IR ). Entre las IR hay un gen que codifica una enzima llamada transposasa y algunas veces algún gen para otra proteína esencial.

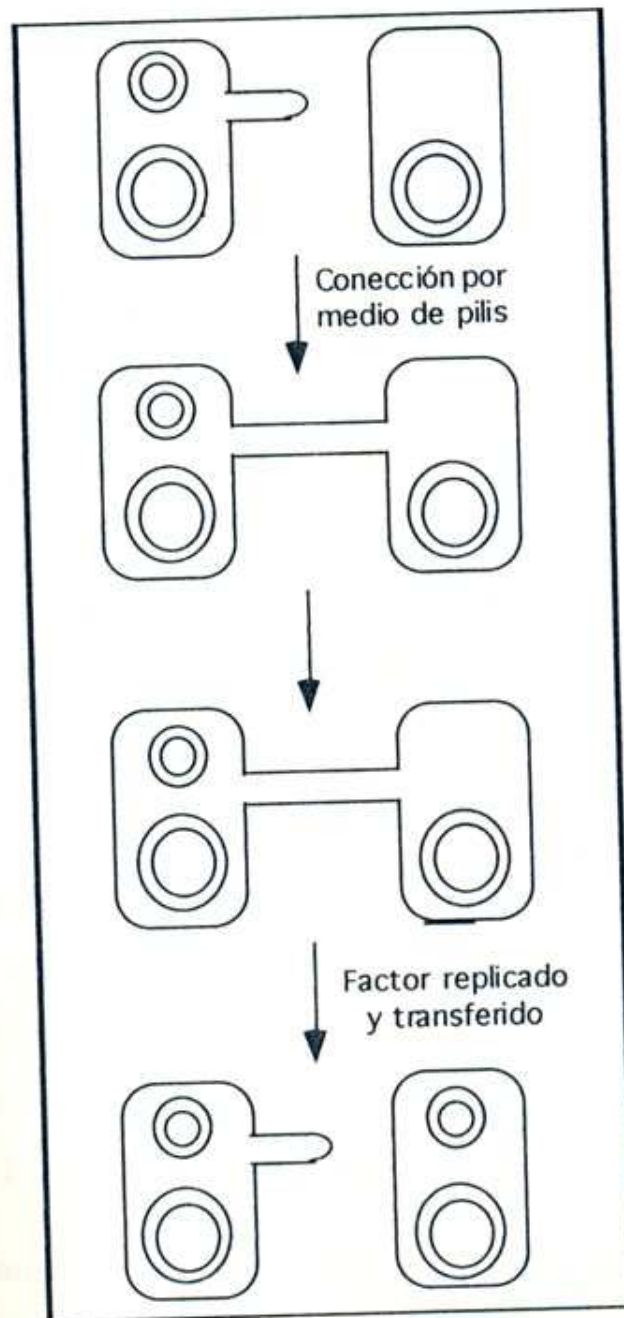


Figura 2.- Mecanismo de la conjugación bacteriana.

Esta enzima se requiere para la transposición y reconoce los extremos de las IS de forma muy específica. Los transposones pueden contener otros genes, como los de resistencia a antibióticos o genes de toxinas. Estos transposones se llaman transposones compuestos. Parece que plásmidos con resistencias a varias drogas

son frecuentemente producidos por una acumulación de transposones en un solo plásmido. Como los transposones también se mueven entre plásmidos y entre cromosomas primarios, genes resistentes a fármacos pueden intercambiarse entre plásmidos y cromosomas, aumentando la resistencia a antibióticos ( Prescott L., Harley J., Klein D., 1993 ).

Otra forma de intercambio de ADN entre células, es la transformación de ADN. La célula receptora incorpora e integra en su cromosoma un fragmento de ADN del medio de forma hereditable. En la transformación natural, el ADN viene de una bacteria donadora. El proceso es aleatorio, y cualquier porción del genoma puede transferirse entre bacterias ( Figura 3 ).

Cuando las bacterias se lisan, liberan considerables cantidades de ADN al medio ambiente. Estos fragmentos pueden ser relativamente grandes y contienen varios genes. Si un fragmento contacta una célula competente, se une a la célula y es internalizado ( Prescott L., Harley J., Klein D., 1993 ).

La transducción es la transferencia de genes bacterianos por medio de virus (Figura 4). Los genes bacterianos son incorporados dentro de la cápsida de un fago durante el ciclo de vida del virus. Los virus que contienen estos genes los introducen dentro de otra bacteria, completando la transferencia. La transducción es el mecanismo más común para un intercambio de



son frecuentemente producidos por una acumulación de transposones en un solo plásmido. Como los transposones también se mueven entre plásmidos y entre cromosomas primarios, genes resistentes a fármacos pueden intercambiarse entre plásmidos y cromosomas, aumentando la resistencia a antibióticos ( Prescott L., Harley J., Klein D., 1993 ).

Otra forma de intercambio de ADN entre células, es la transformación de ADN. La célula receptora incorpora e integra en su cromosoma un fragmento de ADN del medio de forma hereditable. En la transformación natural, el ADN viene de una bacteria donadora. El proceso es aleatorio, y cualquier porción del genoma puede transferirse entre bacterias ( Figura 3 ).

Cuando las bacterias se lisan, liberan considerables cantidades de ADN al medio ambiente. Estos fragmentos pueden ser relativamente grandes y contienen varios genes. Si un fragmento contacta una célula competente, se une a la célula y es internalizado ( Prescott L., Harley J., Klein D., 1993 ).

La transducción es la transferencia de genes bacterianos por medio de virus (Figura 4). Los genes bacterianos son incorporados dentro de la cápsida de un fago durante el ciclo de vida del virus. Los virus que contienen estos genes los introducen dentro de otra bacteria, completando la transferencia. La transducción es el mecanismo más común para un intercambio de

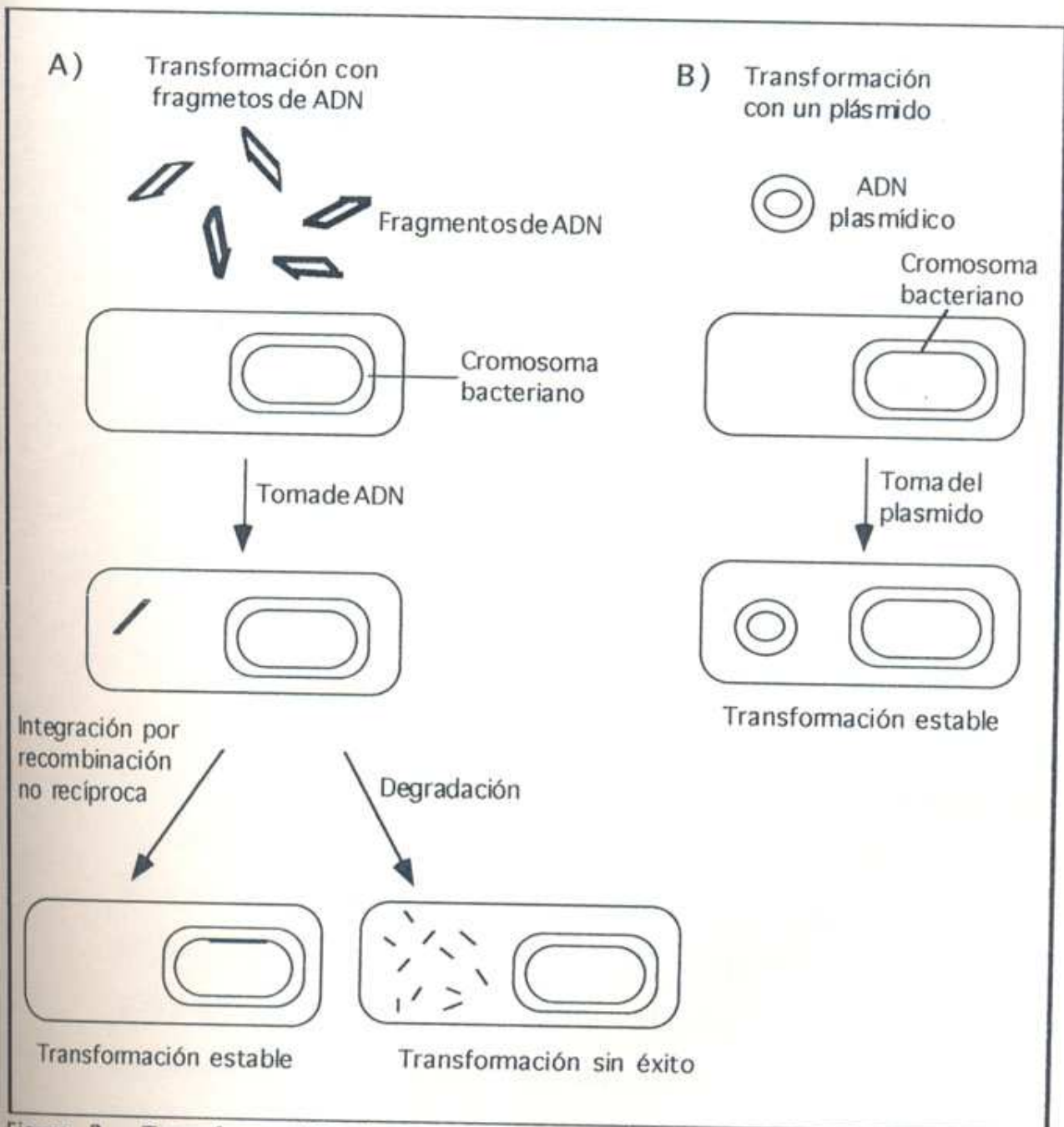


Figura 3.- Transformación bacteriana. Transformación con (a) fragmentos de ADN y (b) plásmidos. La transformación con plásmidos puede ser también inducida artificialmente en el laboratorio.

genes y recombinación bacteriana ( Prescott L., Harley J., Klein D., 1993 ).

## Taxonomía bacteriana

La taxonomía de las bacterias hasta ahora, estaba basada en criterios como reacciones Gram, morfología, requerimientos de sustratos, presencia o posición de flagelos, etc. Actualmente, se está dando mayor importancia a criterios de tipo antigénico y de biología molecular ( Singleton P. and Sainsbury D., 1993 ).

### **1.4.1.- Vibrios**

Pertenecen a la familia Vibrionacea y son bacterias que presentan forma de varillas rectas o curvas, de 0.5 - 0.8  $\mu\text{m}$  de ancho y 1.4 - 2.6  $\mu\text{m}$  en longitud. Son Gram - negativas, de motilidad por medio de uno o más flagelos polares, son anaerobios facultativos, quimiorganotróficos teniendo metabolismo de tipo respiratorio y fermentativo. Temperaturas óptimas varían considerablemente, todas crecen a 20° C, muchas a 30° C. Son oxidasa positiva, fermentan carbohidratos, -incluidas maltosas, D - manosa y trehalosa. Muchas son sensibles al agente vibriostático (bacteriostático) 0/129 ( Daiichi Seiyaku Co. Ltd., DTI - 11129 ). Iones de sodio estimulan el crecimiento de todas las especies y son requerimientos importantes para muchas especies. Son de hábitats acuáticos con amplio rango de salinidades; muy comunes en medios marinos y estuarinos y en la superficie y dentro del contenido intestinal de animales marinos, algunas especies son de agua dulce. Ciertas especies

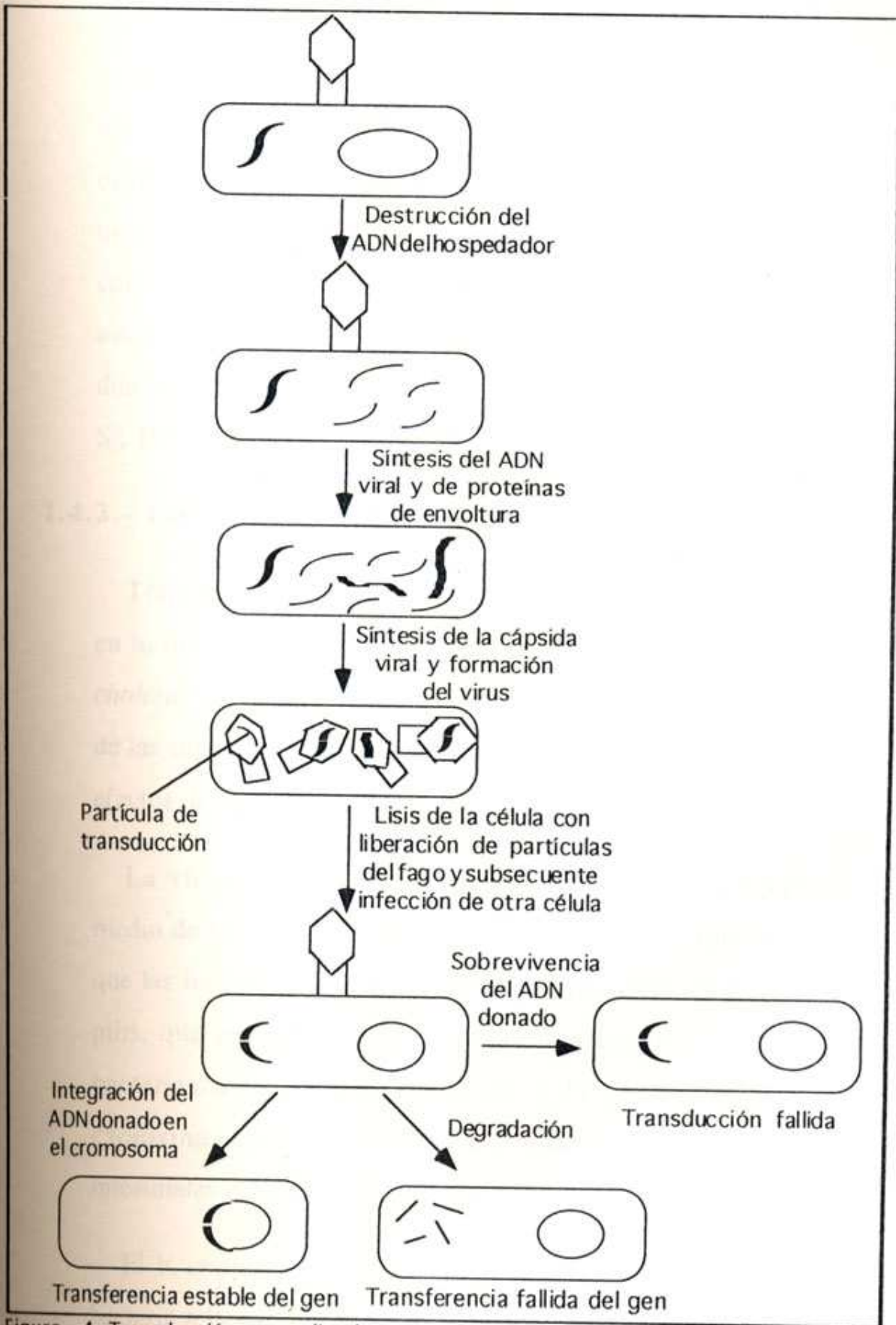


Figura 4- Transducción generalizada por medio de bacteriófagos.

son patógenas para humanos, pero muchos lo son para vertebrados e invertebrados marinos. Los patógenos humanos más representativos son *V. cholerae* el agente causante del cólera; *V. parahaemolyticus* , el mayor causante de envenenamiento por ingestión de peces y moluscos contaminados; y *V. vulnificus* , que causa septicemia. Todas estas especies están asociadas con infecciones intestinales y diarreas ( Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P., Staley J., Williams S., 1994 ).

#### 1.4.2.- Características y biología del *Vibrio cholerae*

Tomando como referencia los estudios de ciertas bacterias en lo que respecta a salud pública, se ha probado que el *V. cholerae* es un excelente modelo para estudiar la colonización de las superficies mucosas del intestino en el humano y ver los efectos de la toxina en las células del hospedador.

La virulencia del *V. cholerae* puede ser explicada por medio de tres factores: la presencia de flagelos, que permiten que las bacterias se muevan hacia la superficie de la mucosa; pilis, que son estructuras que permiten la adherencia de las bacterias a las células mucosas; y la producción de una exotoxina, cholera toxin ( Ct ), que actúa en las células intestinales produciendo diarreas severas.

El *V. cholerae* tiene un solo flagelo polar, que ayuda a la bacteria a llegar a la mucosa intestinal, ya que existe evidencia

de que mutantes no móviles son menos virulentos que aquellas cepas que presentan el flagelo.

Los largos filamentos pili se encuentran formando paquetes en la superficie de la bacteria y juegan un papel muy importante en la colonización de la mucosa intestinal. Los pili han sido denominados Tcp pili ( toxin coregulated pili ) por que los genes que codifican para la formación de estos pili están regulados igualmente por genes que codifican a la toxina Ct. Cepas mutantes sin Tcp no son virulentos, pero aún se desconoce la forma de interacción entre los Tcp y las células del hospedador y los receptores de las mismas no han sido identificados.

Debido a su importancia como un factor de virulencia y su interesante mecanismo, la Ct ha sido intensamente estudiada a nivel bioquímico y genético. Los mutantes que no producen la Ct no son capaces de producir los síntomas del cólera y tampoco son capaces de colonizar la mucosa intestinal. Por lo tanto, aunque aún es desconocido, se cree que la Ct puede tener una función en la colonización de la bacteria en las células intestinales.

Sin lugar a dudas, la Ct es la causa principal de los síntomas de la enfermedad del cólera, pero hay ciertas cepas del *V. cholerae* que producen otras toxinas, además de la Ct. Estas toxinas pueden ser la **Zot** ( zonal occludens toxin ) que afecta la unión de las células de la mucosa intestinal y la **Ace**

(accessory cholera enterotoxin) que puede causar diarreas moderadas.

Los factores CtxA y CtxB ( de la toxina del cólera ) están localizados en un elemento genético móvil que puede ser un transposón, y solo las cepas mutantes que adquieren este transposón producen toxinas. Algunas cepas producen más toxinas que otras y en muchos casos esto es debido a la duplicación del elemento portador del CtxAB.

Además, se conoce que los genes de la Zot y Ace están localizados cerca del gen de la CtxAB dentro del cromosoma y pueden estar en el mismo elemento móvil; lo que indica, la posibilidad de que estos genes se encuentren formando un paquete de virulencia que puede ser amplificado durante la infección, dándole a las bacterias una mayor ventaja selectiva bajo una variedad de condiciones.

Ciertas cepas de *V. cholerae* producen una proteína superficial que aglutina eritrocitos ( **hemaglutinina** ). Estas proteínas se ha comprobado que son adhesivas en otros patógenos bacterianos y podrían contribuir a la adherencia del *V.cholerae* en el intestino.

Otro posible adherente o factor colonizador está codificado por un grupo de genes denominados genes del factor accesorio de colonización (accessory colonization factor, **acf**). Estos genes producen proteínas externas de la membrana que parece

que tienen un rol importante en la colonización, por que cepas que no presentan acf muestran poca habilidad para colonizar el tracto digestivo de los animales ( Salyers A., Whitt D., 1994 ).

#### 1.4.3.- **Vibrios marinos**

Al igual que los estudios realizados con el *V. cholerae* se pueden realizar investigaciones de diferentes tipos para otros vibrios como los que afectan al cultivo de especies de interés en la acuicultura.

Avances significativos se han hecho en la caracterización de luciferasas y otras proteínas específicas de *lux* , así como de los mismos genes de *lux* de un número significativo de especies de bacterias luminiscentes marinas y terrestres (Meighen EA., 1993).

Para muchas especies, la intensidad de luz por célula es altamente dependiente del crecimiento celular, dando como resultado una mayor incidencia de la luminiscencia a altas densidades de cultivo. Según estudios realizados por Wright *et al.* ( 1994 ) con cepas de *V. harveyi* la luminiscencia se verá afectada por la concentración de moléculas extracelulares ( autoinducers ) en el medio de cultivo y también por la presencia en cepas mutantes de transposones de genes de *lux*, lo que a su vez, indica que no hay relación directa con genes de toxina o de factores de virulencia.



La utilización de sondas nucleicas específicas permiten separar diferentes especies de bacterias por grupos y familias. Kita-Tsukamoto y sus colaboradores en 1993, separaron a la familia Vibrionaceae en 7 grupos mediante el uso de una secuencia 16S rRNA.

La presencia de plásmidos en ciertas bacterias puede estar involucrada con la virulencia de la cepa o la resistencia de la misma a ciertos antibióticos. En 1992 en un trabajo realizado por Valla S. *et al.*, se utilizaron cepas de *Vibrio salmonicida* y *Vibrio anguillarum* del medio natural que presentaban plásmidos, para obtener cepas libres de los mismos mediante un sistema de transferencia de genes basados en el plásmido replicón RSF 1010. La cepa que se obtuvo sin plásmido se comportaba igual que las cepas "salvajes" en pruebas de patogenicidad en peces. Por lo tanto, se puede concluir que en ciertas cepas bacterianas el ADN extracromosómico no es requerido para la expresión de la virulencia, pero si es una herramienta útil para la caracterización y clasificación de bacterias.

Otro método de caracterización muy útil para las bacterias es el uso de pruebas inmunológicas, que con una gran exactitud nos permite tener dentro de una misma especie de bacteria, diferentes serotipos. En 1991, en el National Veterinary Institute de Noruega, de 264 cepas clasificadas tentativamente como *V. anguillarum* por otros métodos,

fueron identificadas dentro de esta especie solo 179 cepas y clasificadas en dos serotipos 01 y 02, mediante el uso de pruebas antigénicas.

Por lo tanto, teniendo nuevas técnicas de identificación y caracterización de cepas bacterianas se puede dar un gran avance en lo que respecta al estudio de agentes patógenos que afectan a la acuicultura. Además, estas técnicas no solo ayudan a identificar a las bacterias sino también a tener un mayor control de las enfermedades mediante el diagnóstico de cepas patógenas antes de que se presenten los síntomas de la enfermedad.

Tabla 1.- Características diferenciales entre géneros y familias en el Grupo 5 del Manual de Bergey.

Características	Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	Familia <i>Vibrionaceae</i>	Familia <i>Pasteurellaceae</i>
Diámetro celular, $\mu\text{m}$	0.3-1.5	0.3-1.3	0.2-0.4
Forma celular:			
Bacilos rectos	+	D	+
Curvos o vibrios	-	D	-
Tinción Gram variable	-	-	-
Acidez desde D-glucosa	+	+	+
Productos de fermentación del azúcar:			
Ethanol	-	-	-
Acido láctico	-	-	-
Acido acético	-	-	-
Colonias violetas	-	-	-
Motilidad	D	+ <sup>e</sup>	-
Presencia de flagelos:			
Polar	-	+	
Lateral	+ <sup>f</sup>	-	
Ambos	-	D	
Oxidasa	-	D	D
Catalasa	+ <sup>e</sup>	D	D
Reducción de NO <sub>3</sub> a NO <sub>2</sub>	+ <sup>e</sup>	+ <sup>e</sup>	+ <sup>e</sup>
Producción de Indol	D	D	D
Cepas que corroen al agar	-	-	-
Requerimiento de Na para crecimiento	-	D	-
Requerimiento de nitrógeno orgánico	- <sup>e</sup>	- <sup>e</sup>	+
Patogenicidad en plantas	D	-	-
Causante de donovanosis (granuloma inguinal) en humanos	-	-	-
Causante de vaginitis en humanos	-	-	-

+ = todas las especies son positivas

- = todas las especies son negativas

D = algunas especies son positivas, algunas negativas

e = Pueden darse pocas excepciones

f = Excepto *Tatumella*, que puede flagelos polares, subpolares o laterales

Tabla 2.- Diferenciación del género *Vibrionaceae*

Características	<i>Vibrio</i>	<i>Photo bacterium</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Plesio monas</i>	<i>Enhydro bacter</i>
Flagelo polar cubierto	+	-	-	-	-
Motilidad	+	+	(+) <sup>e</sup>	+	-
Acumulación de poly-B-hydroxybutyrate con la inhabilidad de utilizar B-hydroxybutyrate	-	+			
Requerimiento de Na para crecimiento	+	+	-	-	-
Lipasa	(+) <sup>b</sup>	D	(+)	-	+
Utilización de D-manitol	(+) <sup>c</sup>	-	(+)	-	-
Sensibilidad al compuesto vibriostático O/129	+	+	-	+	-
Mol% G+C de ADN	38-51	40-44	57-63	51	66

+ = todas las especies son positivas

(+) = muchas especies son positivas

- = todas las especies son negativas

D = algunas especies son positivas, algunas negativas

b = *V. nereis*, *V. anguillarum* biovar II, y *V. costicola* son negativos

c = *V. nereis*, *V. anguillarum* biovar II, y *V. marinus* son negativos

d = Hay ciertas excepciones

e = Excepto *A. medio* y *A. salmonicida*

## CAPITULO II

### MATERIALES Y METODOS

#### 2.1.- MATERIAL BIOLÓGICO

##### 2.1.1.- Cepas bacterianas

E<sub>22</sub> ( *Vibrio harveyi* )

ILI ( *Vibrio alginolyticus* )

158 ( *Vibrio alginolyticus* )

La cepa bacteriana E<sub>22</sub> fue aislada de un laboratorio de larvas de camarón en la Península de Santa Elena e identificada bioquímicamente como *V. harveyi* en 1994 por Jenny Aráuz en el CENAIM.

La cepa ILI fue aislada por Iliana Morales en 1994 en el laboratorio de larvas de camarón EBISA de una muestra de agua de mar y fue identificada como *V. alginolyticus* .

La cepa bacteriana codificada como 158 fue aislada de tanques de producción de larvas del laboratorio EBISA en 1995, y así mismo fue identificada bioquímicamente como *V. alginolyticus* .

### 2.1.2.- Anticuerpos monoclonales

2C9 ( líquido ascítico )

9H4 ( líquido ascítico )

2B6 ( líquido sobrenadante )

Los hibridomas 2C9 y 9H4 fueron obtenidos por medio de la inmunización de ratones Balb/c con la cepa bacteriana de *V. harveyi* codificada como "S<sub>2</sub>", patógeno causante de la enfermedad conocida como "Síndrome de bolitas". Junto a tres hibridomas más (6E7, 10F4 y 10H11) fueron seleccionados mediante un cribado con el método de ELISA. Cuatro cepas bacterianas: *V. parahaeomolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* y *Aeromonas sp* fueron probados para demostrar la especificidad de los mismos. Estos hibridomas fueron obtenidos en una fusión efectuada en agosto de 1993 y producidos en fluído ascítico ( Philippe Audiot, 1995, comunicación personal ).

Se realizaron inmunizaciones a ratones Balb/c con suspensiones de una cepa bacteriana probablemente probiótica ( ILI ) y mediante una fusión efectuada en mayo de 1995 se obtuvieron los hibridomas 2B6, 12G6 y 2G1. Se probó la especificidad de los mismos mediante la técnica de dot-blot, analizándose una cepa de *V. harveyi* ( E<sub>22</sub> ), dos cepas de *V. alginolyticus* ( ILI y 158 ) y con otros dos género de bacterias: *Yersenia sp.* y *Escherichia coli*. El

sobrenadante 12G6 reconoce tanto a la cepa ILI como a la codificada como 158, mientras que los sobrenadantes 2B6 y 2G1 reconocen específicamente a la cepa ILI.

## 2.2.- TECNICAS BACTERIOLOGICAS

### 2.2.1.- Aislamiento de bacterias

Los procedimientos de aislamiento en microbiología consisten en obtener una colonia pura proveniente de un solo microorganismo. Siempre hay que tener presente que es indispensable el mantenimiento de condiciones asépticas durante todos los pasos de esta operación, para lo cual es necesario trabajar en una cámara de flujo laminar ( Air Tech Japan,Ltd. Mod. BCM-1002W ).

El aislamiento se realiza tomando una pequeña cantidad de la colonia deseada con la punta de un asa de platino y sembrando en una caja Petri que contenga medio sólido, rayándolo en forma de estrías ( Figura 5 ). Las placas inoculadas son incubadas a 28°C por 24 horas. La siembra en estrías se realiza por agotamiento, de tal manera que se puedan obtener colonias aisladas.

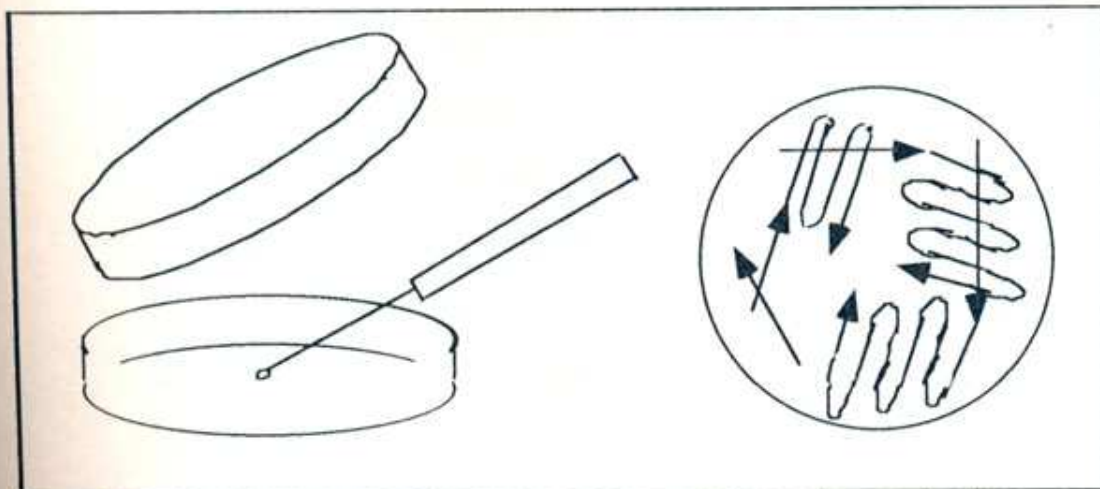


Figura 5.- Técnica de aislamiento por estrías. Se puede observar una caja petri de agar sembrada en estrías con una asa de inoculación.

## 2.2.2.- Medios de aislamiento y cultivo

### Medios sólidos

#### *Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar, TCBS:*

Es un medio selectivo para vibrios. Para preparar 1 litro de agar se disuelven 88 g del mismo en agua destilada y se lleva a ebullición hasta que no queden grumos en el medio. Por recomendación del distribuidor este medio no debe ser autoclavado, por lo tanto, es importante trabajar con materiales completamente estériles.

*Agar Marino 2216:* Es un medio específico para bacterias marinas, en el cual pueden crecer distintas especies. Se disuelve 55.1 g del medio deshidratado en 1 litro de agua destilada y se autoclava por 15 minutos a 121°C y 15 libras de presión. Este agar tiene la característica de no ser muy duro al solidificarse, por lo que es necesario agregar 0.5 a 0.85% de bacto - agar.



***Tryptic Soy Agar (TSA):*** Es un medio general que permite el crecimiento de distintas especies bacterianas y es recomendado para el aislamiento y purificación de bacterias antes de realizar pruebas de identificación bioquímica. Para preparar 1 litro de este medio, se disuelven 40 gramos del mismo en 1 litro de agua destilada y se autoclava por 15 minutos a 121°C y 15 libras de presión.

### **Medios líquidos**

***Luria - Bertani Medium, LB:*** Para la preparación de 1 litro de este medio se disuelve en 1 litro de agua destilada 0.5 gramos de extracto de levadura ( Difco Laboratories, 0127-01-7 ), 1 gramo de bacto - tripton ( Difco Laboratories, 0123-01-1 ), 2% de ClNa y 1% de D-glucosa. Se ajusta el pH a 7.0 - 7.5 y se autoclava por 15 minutos a 121°C y 15 libras de presión.

***Tryptic Soy Broth, TSB:*** Es un caldo de cultivo que se prepara disolviendo 30 gramos del medio deshidratado en 1 litro de agua destilada. Se autoclava por 15 minutos a 121°C y 15 libras de presión.

***Caldo marino 2216:*** Un litro de este caldo puede prepararse disolviendo en 1 litro de agua destilada 37.4 gramos del medio deshidratado. Se autoclava a 121°C y 15 libras de presión por 15 minutos.

**NOTA.-** A todos los medios sólidos y líquidos, para el aislamiento y cultivo de bacterias marinas, se les debe ajustar la concentración de ClNa entre un 2 y 2.5%, para facilitar el crecimiento de dichas bacterias.

### 2.2.3.- Pruebas de identificación bacteriana

#### 2.2.3.1.- Identificación morfológica

**Tinción de Gram:** Es un proceso de tinción diferencial que permite detectar la forma de la bacteria y las divide dentro de dos grupos: Gram (+) o Gram (-), según la estructura de la pared celular y la habilidad de las mismas de retener el cristal violeta cuando son decoloradas con un solvente orgánico como el etanol.

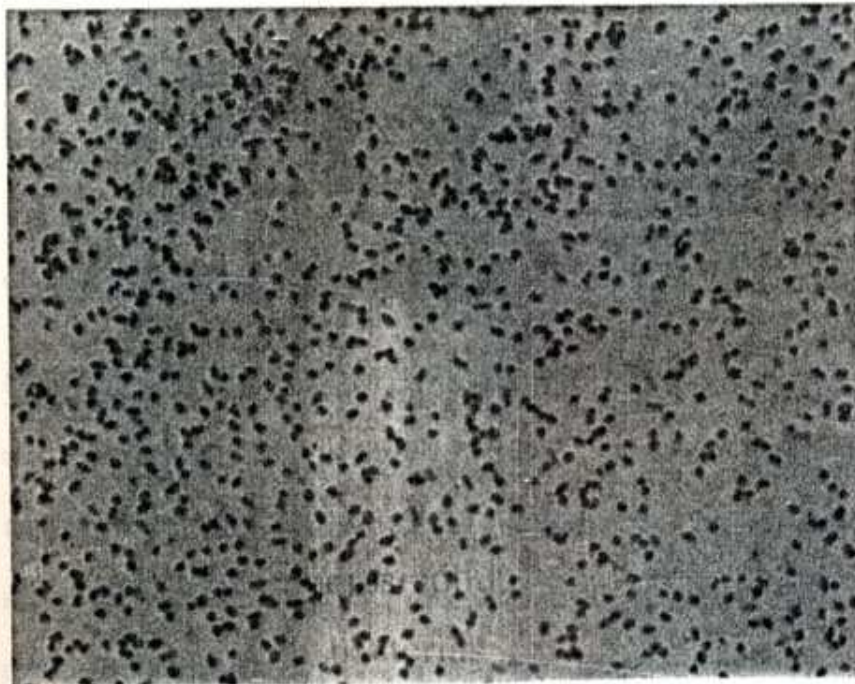


Foto 1.- Fotografía de la cepa E22 ( *V. harveyi* ), usando la tinción de Gram (x 100 ).

**Motilidad:** El movimiento característico de una bacteria se debe a la presencia o ausencia de flagelos; y se puede observar usando una lámina excavada de Koch mediante la técnica de la gota pendiente. El inóculo puede ser un caldo bacteriano de 24 horas de incubación o una suspensión preparada con un caldo estéril y una pequeñísima cantidad de bacterias de un cultivo de 24 horas.

#### 2.2.3.2.- Identificación bioquímica

**Catalasa:** Ciertas bacterias tienen la capacidad de producir la reacción de catálisis del peróxido de hidrógeno; esto se puede observar cuando al poner en contacto un inóculo bacteriano con una gota de peróxido de hidrógeno (  $H_2O_2$  ), se producen burbujas que representan al oxígeno y el agua liberados. Esta prueba se debe hacer con asa de níquel-cromada o con palillos de madera estéril; el asa de platino da una respuesta falsa positiva.

**Oxidasa:** Con esta prueba se detecta la presencia de la enzima citocromo-oxidasa, que es capaz de reducir el oxígeno. Al contrario de la prueba anterior, se recomienda el asa de platino debido a que el asa de níquel-cromada da un resultado falso positivo. Para esta prueba existe el papel impregnado con el reactivo ( Cytochrome-oxidase

reagent "Nissui", Yaku Code 05180 ), que se debe humedecer con agua destilada, luego se toma el inóculo bacteriano y se frota sobre el papel reactivo. El desarrollo de un color violeta fuerte dentro de uno o dos minutos significa un resultado positivo.

**OF:** La prueba del OF indica el tipo de metabolismo oxidativo o fermentativo de la bacteria al utilizar la glucosa como sustrato. Dos tubos conteniendo el medio OF ( Difco Laboratories, 0688-01-8 ), son inoculados con 0.5 ml de suspensión bacteriana; en uno de los tubos, se adiciona aceite mineral ( 5 mm ), esto evitará el contacto con el aire, proporcionando un ambiente anaeróbico a la bacteria, mientras que el otro tubo para prueba de metabolismo oxidativo, siempre estará en contacto con el aire. Colocar en la incubadora ( Sibata Scientific Technology Ltd. Modelo SI-450 ) a 28°C por 24 horas o más. La formación de ácido ( amarillo ) solo en el tubo abierto indica utilización oxidativa de glucosa. La formación de ácido en ambos tubos indica una reacción fermentativa. Si no se produce ninguna reacción ácida, significa que la bacteria no utiliza la glucosa por ningún método.

**Urea:** Si la bacteria contiene enzima ureasa, liberará amoníaco a partir de la urea que contiene el medio ( Difco Laboratories, 0283-15-1 ), produciendo un cambio de color ( rosado ) del indicador del rojo fenol. La inoculación se hace en la superficie de un agar inclinado en un tubo de ensayo.

**Lisina y Ornitina Descarboxilasa:** Inocular el caldo ( Difco Laboratories, 0215-01 ) con la bacteria a identificar y cubrir con una capa (5 mm) de aceite mineral estéril, incubar a 28°C por 24 horas hasta 3 ó 4 días. La reacción positiva es indicada por una reacción alcalina ( violeta ). El medio se vuelve amarillo debido a la producción de ácido a partir de la glucosa. La reacción es negativa si la reacción permanece ácida (amarillo).

**Arginina Dehidrolasa:** La arginina es transformada en ornitina, amonio y dióxido de carbono. Inocular el caldo ( Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 014-04622 ) con la bacteria a identificar y cubrir con una capa ( 5 mm ) de aceite mineral estéril, incubar a 28°C por 24 horas hasta 3 o 4 días. La reacción positiva es indicada por una reacción alcalina ( violeta ). El medio se vuelve amarillo debido a la producción de ácido a

partir de la glucosa. La reacción es negativa si permanece ácida ( amarillo ).

**MR-VP:** El caldo MR-VP ( Difco Laboratories, 0016-01-1 ) es utilizado simultáneamente para dos pruebas: Rojo de Metilo y Voges Proskauer. Inocular dos tubos conteniendo caldo MR-VP, con la bacteria a identificar, incubar a 28°C por 48 horas.

***Rojo de metilo:*** Colocar 5 a 6 gotas del reactivo por cada 5 ml de cultivo. La reacción debe ser leída inmediatamente. La reacción es positiva si el color es rojo, débilmente positivo si es rojo-anaranjado y negativo de color amarillo. Esta prueba indica la capacidad de acidez de la bacteria al crecer en el medio MRVP.

***Voges Proskauer.*** Transferir 1 ml del cultivo de 48 horas a un tubo de ensayo y adicionar 0.6 ml de la solución 1 ( alpha naphtol, 5 g; alcohol absoluto, 100 ml ) y 0.2 ml de la solución 2 ( solución de hidróxido de potasio al 40% ). Agitar después de adicionar cada solución. Para intensificar la velocidad de reacción, adicionar pequeña cantidad de cristales de creatinina a la mezcla. Leer los resultados después de las 4 horas de la adición de los reactivos. El desarrollo de un color rosado

indica prueba positiva. La prueba depende de la formación de acetilmetilcarbinol, la cual es oxidado en un medio alcalino, en presencia de aire para formar diacetil. El diacetil reacciona con la creatinina para formar el compuesto de color rosado.

**Citrato:** Inocular en la superficie del agar citrato ( Difco Laboratories, 0268-01-6 ) inclinado en un tubo de ensayo. Incubar a 28°C por 24 horas hasta 4 días. Una reacción positiva es indicada por el cambio de color del medio ( verde ) a azul intenso. Resultado negativo si no hay cambio de color. La prueba positiva indica que la bacteria utiliza el citrato como fuente de carbono.

**Indol:** Inocular un tubo que contiene agua de Triptona ( Difco Laboratories, 1810-17-9 ) al 1% estéril, con la bacteria; incubar a 28 °C por 24 a 48 horas. Adicionar 0.2 a 0.3 ml del reactivo de Kovac. Si se desarrolla un color rojo fuerte en la capa de la superficie, el resultado es positivo, si no lo hay es negativo, lo que indica la producción de indol por parte de las bacterias.

**TSI:** Inocular un tubo de agar inclinado de agar hierro-tres azúcares ( Nissui Pharmaceutical Co.,Ltd. Code 05103 ) en la superficie y por

picadura, incubar a 28°C por 24 a 48 horas. La lectura se hace observando la reacción de la superficie y de la columna de medio, si es alcalina ( K ) o ácida ( A ), es decir si se tiene una reacción alcalina en la superficie y en la columna del medio es ácida, la lectura será K/A. Esta prueba es recomendada para la identificación de bacilos gram-negativos basados en la fermentación de la dextrosa, lactosa y sucrosa, se puede observar también si la bacteria produce gas ( burbujas dentro del medio ) y SH<sub>2</sub> ( precipitado negro ).

**Nitrito** : La reducción del nitrato a nitrito se puede detectar inoculando un tubo que contiene caldo nitrato ( Difco Laboratories, 0091-01-9 ) con la bacteria a identificar e incubando a 28°C por 24 a 48 horas. Adicionar al cultivo el reactivo 1 (Acido sulfanílico 1 gr, acido acético 5N, 125 ml) y el reactivo 2 ( N-(1-naphthyl) ethylenediamine ) o el reactivo 3 ( alpha-naphthol 1 g y ácido acético 5N ). El desarrollo de un color rojo-violeta con los reactivos 1 y 2 ó el color anaranjado con los reactivos 1 y 3 indica que el nitrato ha sido reducido a nitrito. El color producido con los reactivos 1 y 2, puede atenuarse o desaparecer en pocos minutos por lo que hay que registrar la reacción tan pronto como el color aparezca. Si no



se desarrolla ningún color, se puede detectar la presencia de nitrito adicionando una pequeña cantidad de polvo de zinc. Si el color se produce, significa que el nitrato ha sido reducido.

**Gelatina:** Inocular un tubo conteniendo medio gelatina ( Difco Laboratories, 0143-01 ), incubar a 28°C por 24 a 48 horas. Colocar el tubo de medio gelatina inoculado en un baño a 22°C por 10 minutos. Si la gelatina no se coagula, la prueba es positiva, caso contrario es negativa. La no coagulación de la gelatina se debe a que las enzimas gelatinolíticas ( gelatinasas ), han causado la licuefacción de la gelatina.

**SIM:** Inocular un tubo que contiene medio SIM (Difco Laboratories, 0271-01) por siembra en picadura con la bacteria a identificar, incubar a 28°C por 24 a 48 horas. Es un medio recomendado para la determinación de la producción de gas sulfídrico (  $\text{SH}_2$  ) que es indicada por la presencia de una coloración negra en la superficie o en la columna del medio; además, permite observar la motilidad de la bacteria, debido al crecimiento de la misma en diferentes direcciones alrededor del lugar de inoculación.

**TCBS:** Inocular un tubo que contiene agar TCBS (Difco Laboratories, 0650-01-2) inclinado, incubar a 28°C por 24 horas. Si el crecimiento bacteriano es amarillo indica que la bacteria ha fermentado la sacarosa y por ser un agar selectivo puede servir de ayuda para la clasificación de la bacteria dentro de la familia de los Vibrios.

**Agar MacConkey :** Inocular un tubo que contiene agar inclinado de medio MacConkey (Difco Laboratories, 0075-01-9), incubar a 28°C por 24 horas. Esta prueba se basa en la fermentación de la lactosa. Las colonias capaces de fermentar la lactosa producen una bajada del pH y la absorción del rojo neutral del medio lo que permite la formación de colonias de coloración rosada o rojas. Indica que la bacteria puede ser de la familia de los coliformes o de las enterobacterias, por tratarse de un agar selectivo.

**Cetrimide:** Es un medio selectivo recomendado para el aislamiento e identificación de *Pseudomonas aeruginosa*.. Se inocula en un tubo que contiene medio cetrimide (Difco Laboratories, 0854-01-6) inclinado y se siembra en superficie, se incuba a 28°C por 24 horas. La lectura se hace

observando si hay crecimiento bacteriano en la superficie.

**Acetato Diferencial:** Inocular un tubo que contiene agar inclinado de medio de acetato diferencial ( Difco Laboratories, 0742-17-4 ) por siembra en superficie, incubar a 28°C hasta 4 días. El desarrollo de un color azul indica resultado positivo, esto es, la bacteria utiliza el acetato como fuente de carbono.

**Pruebas de fermentación de carbohidratos:**

Para esta prueba, es necesario preparar tubos que contengan individualmente medio base OF con los diferentes tipos de carbohidratos en una concentración al 1%: dextrosa, manosa, manitol, mioinositol, sacarosa, sorbitol, glicerol, galactosa, xilosa, arabinosa, trehalosa, celobiosa, melibiosa, lactosa, fructosa, adonitol. Inocular los tubos mediante siembra por picadura, incubar a 28°C hasta 4 días. Observar diariamente la reacción. Si se desarrolla un cambio de color a amarillo indica que la bacteria ha fermentado el carbohidrato que contiene el medio.

**Pruebas de halofilia:** Recomendado para bacterias marinas y otras no marinas que tienen tolerancia al cloruro de sodio en diversas

concentraciones. Preparar agua de peptona (Difco Laboratories, 1807-17-4) al 1% que contenga: 0%, 3%, 6%, 8%, 10% de ClNa. Inocular con 200  $\mu$ l de suspensión bacteriana, cada uno de los tubos con las concentraciones de ClNa indicadas, incubar a 28°C por 24 a 48 horas. La presencia de turbidez en el caldo incubado indica crecimiento bacteriano con tolerancia a la concentración de ClNa.

Es importante indicar que para la identificación de una bacteria hay que considerar cada uno de los resultados de cada una de las pruebas mencionadas y finalmente comparar cuidadosamente los resultados con las tablas para identificación del Manual de Bergey.

### **2.2.3.3.- Siembra de bacterias para identificación bacteriana**

La forma de sembrar las bacterias en los diferentes medios para una bioquímica dependerá del tipo de medio. Para inoculación en medios líquidos primero debe hacerse una suspensión bacteriana en solución salina estéril 0.85% de NaCl (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 191-01665), tomando con un asa de platino cierta cantidad de la colonia bacteriana sembrada en agar. La colonia bacteriana preferiblemente debe haber

sido sembrada en un agar general ( TSA, Beef Heart Infusion agar, Nutrient agar ). El uso de agares selectivos, que contienen carbohidratos o los que son elaborados con agua de mar causan falsas reacciones en algunas de las pruebas bioquímicas, haciendo difícil la identificación del organismo. Estas falsas reacciones pueden ser un problema con cualquier sistema de identificación.

Una vez realizada la suspensión bacteriana se toma 0.5 ml de la misma y se la inoculara en cada uno de los medios a usarse ( OF, urea, lisina, arginina, ornitina, indol, nitrito, gelatina, pruebas de halofilia ). Además, existen otros medios que después de ser inoculados con la suspensión bacteriana requieren de aceite mineral estéril para crear un ambiente de crecimiento anaeróbico para las bacterias ( OF, lisina, arginina, ornitina ).

Para el resto de medios, los que son sólidos, la inoculación se hace tomando una pequeña cantidad de la colonia bacteriana con un asa de platino en forma de aguja y sembrándola sobre la superficie del medio, haciendo una línea recta y luego sobre la misma un estriado, esto se realiza en los siguientes medios: TSI, Urea, CIT, TCBS, MAC, CET, ACD. Para la inoculación en el medio SIM

la siembra se hace en picadura, metiendo el asa de platino con la bacteria de manera recta y sacándola en el mismo sitio ( Figura 6 ).

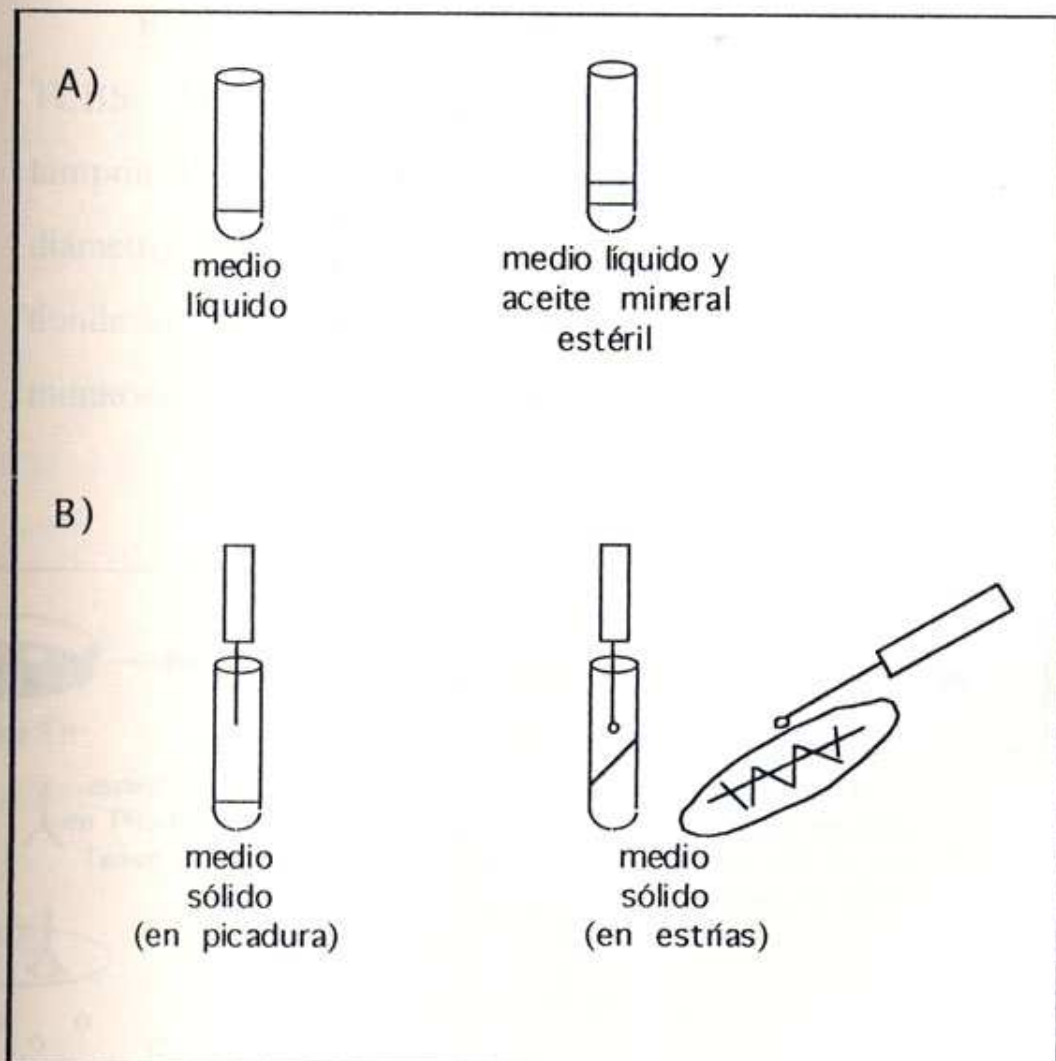


Figura 6.- Forma de inoculación bacteriana para pruebas bioquímicas. ( A ) en medio líquido y ( B ) en medio sólido.

## 2.3.- PRUEBAS ANTIGENICAS

### 2.3.1.- Colony blot

#### Protocolo básico ( Protocolo según Evelyne Bachère, 1992 )

Realizar un cultivo bacteriano en cajas Petri con agar TCBS. Humedecer las membranas de nitrocelulosa con tampón PBS. Colocar las membranas ( 82,5 mm de diámetro, con poros de 0.45 mm ) en la superficie del agar donde se han desarrollado las bacterias y dejar por 30 minutos.

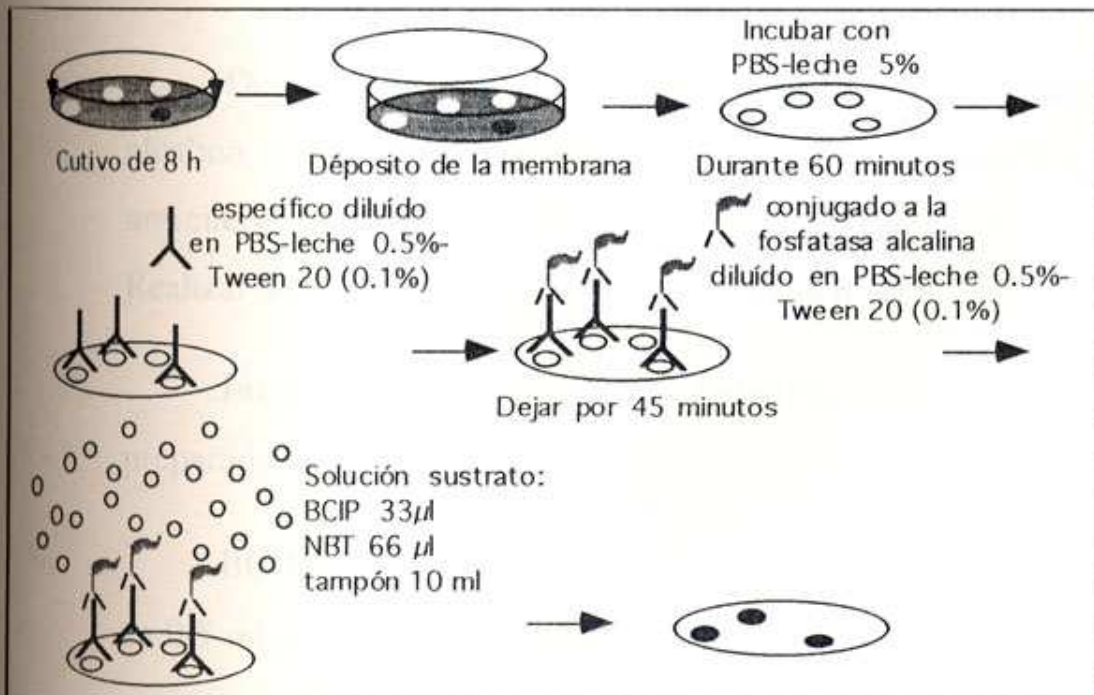


Figura 7.- Técnica de colony - blot, en donde ocurre la formación del complejo antígeno - anticuerpo.

Colocar la membrana en una caja Petri vacía, asegurándose que las bacterias estén en la parte superior de la membrana y secar 45 min la membrana antes de realizar la prueba.

Saturar la membrana mediante incubación con PBS (Phosphate buffer saline solution)-leche descremada 5% (peso/volumen) en una caja Petri agitando suavemente por 45 min a temperatura ambiente. Realizar 2 lavados de 3 min c/u con PBS-Tween 20 ( 1% ).

Depositar el anticuerpo ( fluido ascítico a la dilución adecuada en PBS-Tween 0,1%-leche 0,5% ó sobrenadante de cultivo sin diluir ) e incubar por 45 min a temperatura ambiente. Realizar 3 lavados de 3 min con PBS-Tween 20 (1%).

Depositar el anticuerpo conjugado ( a la fosfatasa alcalina ) e incubar por 45 min: dilución empleada del anticuerpo 1/8000 en PBS-Tween 0,1%-Leche 0.5 %. Realizar 3 lavados de 3 min con PBS-Tween 20 ( 1% ).

Incubar con la solución sustrato recientemente preparada:

BCIP ( 25 mg de 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolyfosfato en 0.5 ml de dimethyl-formamida )= 33  $\mu$ l.



NBT ( 25 mg de Nitro Blue Tetrazolium en 1 ml de agua deionizada )= 66  $\mu$ l.

Tampón Fosfatasa Alcalina ( Na Cl 5.84g/l, Mg Cl<sub>2</sub> 0.5 g/l, Tris base 12.11 g/l, pH 9.5 )= 10 ml.

Detener la reacción con EDTA.

## 2.4.- PRUEBAS GENÉTICAS

El primer paso para realizar una caracterización genética es tener una cantidad suficiente de la bacteria a ser analizada, para esto es necesario tener un cultivo bacteriano suficientemente concentrado.

Se toman alícuotas de 50  $\mu$ l de la bacteria y se siembra en un medio determinado de cultivo, en este caso Luria Bertani Medium, LB, enriquecido con 2% de NaCl y 1% de D - glucosa ( Sigma Chemical Co., G-8270 ). Se deja incubar a 28 °C por una noche.

### 2.4.1.- Obtención de plásmidos

**Método miniprep de lisis alcalina** ( Protocolo según Birnboim, 1983; He et al., 1991; Holmes y Quigley, 1981 )

Inocular de 5 a 40 ml de medio Luria-Bertani ( LB ) estéril ( más 2% de NaCl y de 1% de glucosa en el caso de

bacterias marinas ) con un tipo de bacteria y cultivar hasta saturación a 28 °C.

Microcentrifugar 1.5 ml de cultivo bacteriano 2 veces durante 25 segundos ( con microcentrífuga HERAEUS Sepatech Biofuge 13 ). Para cultivos mayores a 5 ml centrifugar primero a 3200 rpm, 5 minutos y guardar 2 ml del sobrenadante junto al sedimento (resuspender), y microcentrifugar 1.5 ml como se describió anteriormente.

Resuspender el sedimento en 100  $\mu$ l de solución GTE:

50 mM glucosa

25 mM Tris-Cl, pH 8.0

10 mM EDTA

y dejar 5 minutos a temperatura ambiente.

Añadir 200  $\mu$ l de solución NaOH/SDS (Sodium Dodecyl Sulphate):

0.2 M NaOH

1% SDS ( preparar la solución en el momento a partir de una solución de NaOH 10 M y una solución de SDS 10% ), mezclar invirtiendo el tubo 10 veces e incubar sobre hielo 5 minutos.

**Nota.-** La solución bacteriana se vuelve transparente después de la mezcla.

Añadir 150  $\mu$ l de solución de acetato de potasio pH 4.8, 5M:

29.5 ml ácido acético glacial

KOH en pastillas hasta que el pH sea de 4.8

H<sub>2</sub>O hasta 100 ml

Almacenar a temperatura ambiente, agitar con vortex 2 segundos inmediatamente e incubar 5 minutos sobre hielo.

Microcentrifugar 3 minutos y transferir 400  $\mu$ l del sobrenadante en un microtubo nuevo. Añadir 800  $\mu$ l de Et-OH 100% y 1  $\mu$ l de glicógeno, dejar a temperatura ambiente 2 minutos.

Microcentrifugar 3 minutos y lavar el sedimento con 1 ml de Et-OH 70% y secar al vacío. Resuspender el sedimento en TE ( Tris-EDTA ).

#### 2.4.2.- Eliminación de ARN

La ARNasa es una enzima que permite eliminar el ARN que se obtiene en el proceso de extracción de ADN plasmídico.

Añadir en cada microtubo 1  $\mu$ l de una solución de 10 mg/ml de ARNasa e incubar a 37°C por 1 hora.

### 2.4.3.- Obtención de ADN genómico

#### Miniprep: Protocolo base ( Según Murray y Thompson, 1980 )

Microcentrifugar 1.5 ml del cultivo bacteriano a 3500 rpm por 5 minutos.

Resuspender el sedimento en 567  $\mu$ l del tampón TE. Añadir 30  $\mu$ l de una solución al 10% de SDS y 3  $\mu$ l de una solución de 20 mg/ml de proteinasa K, mezclar e incubar 1 hora a 37°C.

Añadir 100  $\mu$ l de una solución 5M de NaCl y mezclar continuamente. Agregar 80  $\mu$ l de CTAB/NaCl, mezclar e incubar 10 minutos a 65°C.

Añadir igual volumen de cloroformo/alcohol isoamílico, mezclar y microcentrifugar de 4 a 5 minutos. Transferir el sobrenadante a un microtubo nuevo. Si se dificulta eliminar el sobrenadante, se aconseja retirar primero la interfase con un palillo de dientes o la micropipeta.

Añadir igual volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, mezclar y microcentrifugar durante 5 minutos. Transferir el sobrenadante a un microtubo nuevo.

Agregar un equivalente de 0.6 del volumen total de isopropanol y mezclar suavemente hasta que el ADN se precipite. Transferir y lavar el precipitado en 1 ml de etanol al 70%.

Microcentrifugar por 5 minutos, desechar el sobrenadante y secar brevemente en un liofilizador o en una bomba de vacío. Resuspender en 100  $\mu$ l del tampón TE.

#### **2.4.4.- Digestión con enzimas de restricción ( RFLP )**

La digestión del ADN mediante el uso de enzimas de restricción fueron realizadas según las recomendaciones del proveedor.

El ADN fue digerido en un volumen final de 30  $\mu$ l, con 1  $\mu$ l de enzima ( 10 u ) y 3  $\mu$ l de tampón 10 X, incubando 2 horas a 37°C.

#### **2.4.5.-Preparación de gel de agarosa para electroforesis**

El gel de agarosa sirve para analizar las muestras de ADN que se obtienen mediante diferentes métodos de extracción, ya que actúa a manera de red, permitiendo la migración del ADN a distintas velocidades en función del tamaño de los fragmentos.

El ADN fue analizado en geles de electroforesis que contenían de 0.8 a 1% de agarosa diluídos en tampón TAE 1X ( 40 mM de Tris-acetato, 2 mM EDTA, pH 8 ).

Para visualizar las bandas se añadió al gel bromuro de etidio a una concentración de  $0.5 \mu\text{g/ml}$  ADN y el gel es observado sobre una lámpara de rayos u.v.

Los tamaños de los fragmentos observados son estimados con respecto a un marcador de peso molecular (ADN bacteriófago lambda digerido con Hind III). Los fragmentos de este marcador son 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 pb.

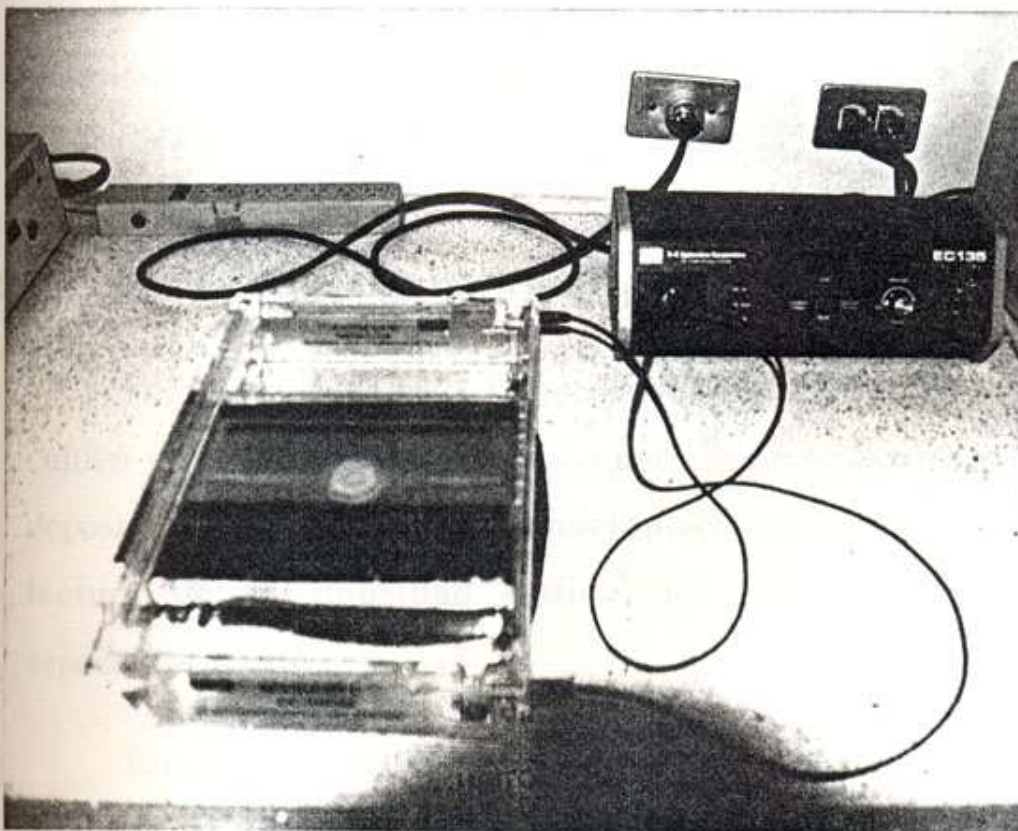


Foto 2.- Gel de agarosa para electroforesis.

## 2.5.- Antibiograma/MIC

En este trabajo se realizaron antibiogramas en microplacas de titulación de 96 pozos ( Corning Glass Works, Round bottom 25850 ), con distintos antibióticos a diferentes concentraciones, y se analizaron tres cepas bacterianas: E<sub>22</sub> ( patógena ), Ili y 158 (estudiadas como probióticos, trabajo de tesis de Lorena San Miguel).

### 2.5.1.- Cultivo bacteriano

Se descongelan las bacterias que están conservadas a -80 °C. Se toman 30  $\mu$ l de cada cepa bacteriana y se inoculan en medio de cultivo líquido, LB. Se dejan en incubación durante la noche a 28°C.

### 2.5.2.-Lectura de densidad óptica al espectrofotómetro

Para establecer la concentración de bacterias en el cultivo y poder saber que volumen del mismo se tiene que depositar en cada pozo de la microplaca, se realiza una lectura de la densidad óptica del cultivo en el espectrofotómetro.

Para poder efectuar la lectura se realiza una dilución 10X de la muestra en solución salina estéril 0.85%. Se usa como blanco el medio de cultivo diluído en la misma

solución y se procede a efectuar la lectura en el espectrofotómetro ( Shimadzu corporation, modelo uv - 2100 ) a 550 nm.

### **2.5.3.- Preparación de soluciones stock de antibióticos**

Los antibióticos usados fueron: kanamicina, furazolidona, ampicilina, oxitetraciclina, cloranfenicol y cotrimoxazol ( todos ellos fueron donados por laboratorios del sector ). Estos antibióticos fueron mantenidos en refrigeración ( 4 °C ).

Las concentraciones usadas de los antibióticos fueron: 60 ppm, 12.5 ppm, 2.5 ppm, 0.5 ppm y 0.1 ppm.

### **2.5.4.- Siembra en microplacas**

Se siembran 100.000 bact/pozo en la mitad de la placa y 1'000.000 bact/pozo en la otra mitad.

Se hace una primera lectura en el lector de ELISA (Labsystems Multiskan Bichromatic, tipo 348), para saber con que concentración de cultivo se comienza.

Se deja incubar a 28 °C, y se hacen lecturas a partir de las 4 horas de cultivo, para tener datos de crecimiento o inhibición de las bacterias al estar en contacto con los antibióticos. Cada una de las concentraciones de los antibióticos se probó por triplicado.





Foto 3.- Lector de ELISA, utilizado en estas pruebas.

## 2.6.- Estudio comparativo de parámetros de cultivo sobre el crecimiento de una cepa patógena ( E<sub>22</sub> ) y cepas "probióticas" ( ILI y 158 )

Estas pruebas se realizan para determinar parámetros ( pH y salinidad ) que favorezcan el crecimiento de una cepa bacteriana. También se prueban diferentes concentraciones de nutrientes utilizados para el cultivo de bacterias probióticas en los laboratorios de larvas de camarón ( nitratos, fosfatos y sacarosa ) y productos que se usan en la rutina diaria de un laboratorio (EDTA y tiosulfato) que pueden ayudar o inhibir el crecimiento de una bacteria. Se usaron las cepas bacterianas, E<sub>22</sub> , Ili y 158.

Se realiza un cultivo bacteriano de cada una de las cepas a 28°C por 12h y se lee la densidad óptica de las bacterias en el espectrofotómetro, el protocolo que se sigue para el realizar el

cultivo es igual al descrito anteriormente para el antibiograma/MIC.

Se usaron los siguientes valores de pH para las experimentaciones: 7.5, 8.0, 8.2, 8.5; las salinidades analizadas fueron 20 ppt, 27 ppt, 32 ppt y 37 ppt.

Las concentraciones que se prueban de los diferentes nutrientes son las siguientes: 40, 20, 10 y 5 ppm de nitratos; 4, 2, 1, 0.5 ppm de fosfatos; 10, 5, 2.5, 1.25 ppm de EDTA; 40, 20, 10 y 5 ppm de tiosulfato; y, 2400, 1200, 600 y 300 ppm de sucrosa.

Todas las soluciones después de haber sido preparadas son llevadas al autoclave ( Sibata Scientific Technology Ltd., DS300 ) por 15 minutos a 121 °C y 15 p.s.i.

### **2.6.1.- Siembra en microplacas**

Para sembrar las bacterias a diferentes pH y salinidades se deposita la cantidad estimada de bacterias en 150  $\mu$ l del medio LB modificado ( con pH y salinidades deseadas ). Mientras que para obtener las concentraciones de los otros nutrientes, el medio modificado debe ser diluído en 150  $\mu$ l de medio LB de referencia ( pH 7.5, 2% NaCl ) antes de inocular las bacterias ( Figura 8 ).

Las placas son incubadas a 28 °C y se hacen lecturas periódicas en el lector de ELISA a medida que se va observando crecimiento bacteriano en el medio.

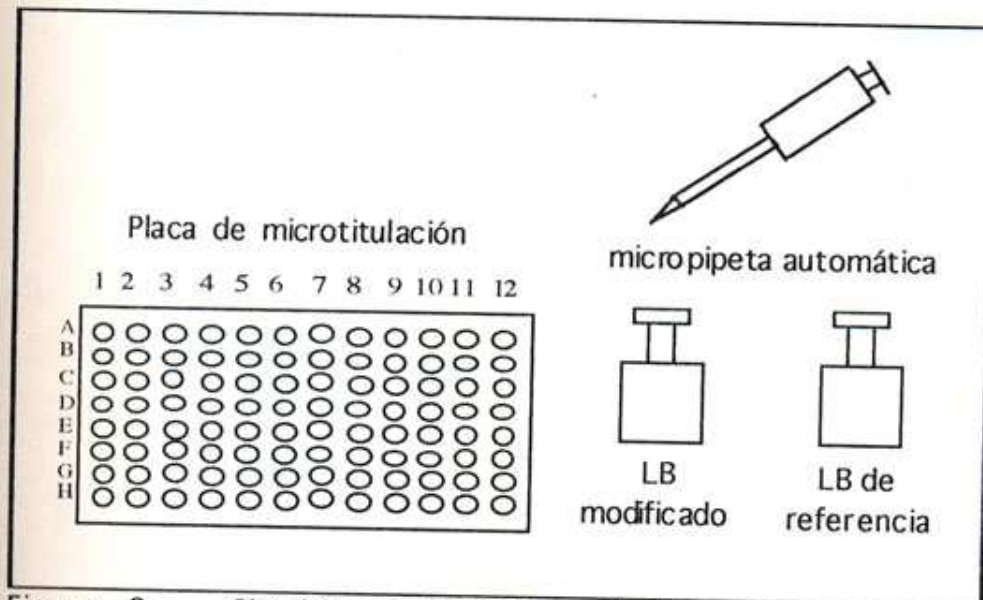


Figura 8.- Siembra en microplacas de bacterias a diferentes condiciones de cultivo.

### 2.7.- Estudio *in vitro* de las interacciones patógeno/probiótico

En esta prueba se siembra en un mismo pozo con medio de crecimiento LB, la bacteria patógena ( $E_{22}$ ) y la bacteria probiótica (ILI y 158). Las concentraciones de las bacterias van desde  $10^6$  bact/ml hasta 10 bact/ml, y mientras de una cepa se pone la concentración más alta, de la otra se pone la más baja.

Se dejan las placas en incubación a 28 °C por un tiempo de 3 a 4 horas, luego de lo cual se hacen diferentes diluciones para sembrar en cajas Petri con medio TCBS y poder cuantificar las

colonias bacterianas presentes, por medio del color ( verdes y amarillas ). Al mismo tiempo de sembrar en las cajas Petri, de las mismas diluciones se toman 10  $\mu$ l y se siembran en 90  $\mu$ l de medio LB en microplacas.

## CAPITULO III

### RESULTADOS

#### 3.1.-CARACTERIZACION DE LA CEPA BACTERIANA E<sub>22</sub>

##### 3.1.1.- Caracterización bioquímica

La cepa bacteriana analizada, E<sub>22</sub> fue aislada de un laboratorio de larvas de camarón en la Península de Sta. Elena ( Provincia del Guayas, Ecuador ) durante un brote epidémico de "síndrome de bolitas". Su patogenia fue demostrada experimentalmente por Jenny Aráuz en el CENAIM.

La cepa fue identificada anteriormente mediante caracterización bioquímica como *Vibrio harveyi* , pero en este trabajo se realizó una nueva caracterización con dos objetivos: en primer lugar, confirmar la caracterización realizada y que la cepa seguía manteniendo las mismas características; en segundo lugar, familiarizar a la tesista con las técnicas clásicas de identificación bacteriana.

Esta caracterización fue muy amplia, asociando criterios morfológicos ( coloración Gram, presencia de flagelos, motilidad, forma ) y bioquímicos.

Este patrón de criterios bioquímicos permitió identificar el aislado como *Vibrio harveyi* .

Los resultados de los 32 criterios de identificación estudiados según Bergey ( Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth Edition, 1994 ), y que fueron explicados en el capítulo Materiales y Métodos, se expresan en la siguiente tabla.

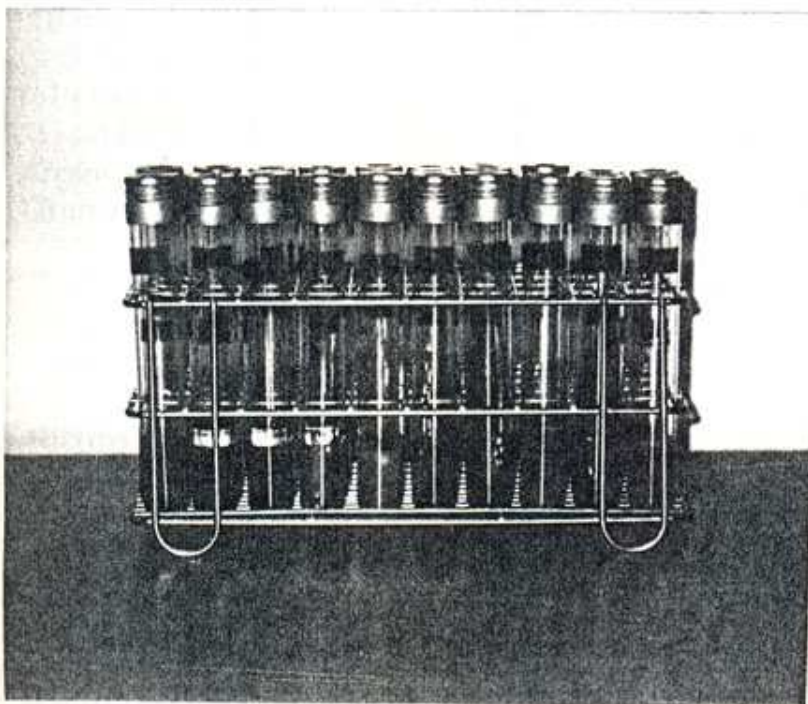


Foto 4- Identificación bioquímica de la cepa bacteriana E<sub>22</sub>, donde puede observarse la reacciones enzimáticas y fisiológicas de la bacteria sobre algunos de los medios utilizados.

Tabla 3.- Criterios de identificación morfológica y bioquímica de la cepa E<sub>22</sub> comparados con las reacciones características de una cepa de *Vibrio harveyi*, según el Manual de Bergey (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth Edition, 1994).

Caracteres	Cepa E <sub>22</sub>	<i>Vibrio harveyi</i> (Manual de Bergey)
Forma	bacilos cortos	bacilos rectos
Gram	-	-
Motilidad	+	-
Catalasa	+	D
Oxidasa	+	+
O-F	+ / +	+
Urea	+	-
Lisina	+	+
Arginina	-	-
Ornitina	+	-
MR	-	+
VP	-	d
Citrato	+	+
Indol	+	+
TSI	K/A	
Nitrito	+	+
Gelatina	+	+
SIM	+	-
TCBS	-	d
MacConkey	+ / +	-
Acetato diferencial	+	+
Descarboxilasa	-	
Manitol	+	+
Mioinositol	-	-
Sucrosa	-	d
Sorbitol	-	-
Glicerol	+	+
0% CINA	-	-
3% CINA	+	+
6% CINA	+	+
8% CINA	-	-
10% CINA	-	d
O/129	+	+
Luminiscencia	+	d

+ = 90% o más de las cepas son positivas

- = 90% o más de las cepas son negativas

d = 11- 89% de las cepas son positivas

D = Diferentes reacciones pueden en diferentes clasificaciones (especies de un género o género de una familia)

### 3.1.2.- Caracterización genética

Entre los criterios de tipo genético clásicamente utilizados en la caracterización de cepas bacterianas, la detección de un plásmido y posterior determinación de su patrón de enzimas de restricción han sido ampliamente utilizados.

Previo a este trabajo diferentes ensayos de extracción de ADN plasmídico fueron estudiados: Qiagen, lisis con SDS, Triton X100, lisis por calor y lisis alcalina, usándose como control positivo una cepa bacteriana de *Escherichia coli* con un plásmido Hsp luciferasa.

Se mantuvo como protocolo de referencia la extracción por el método de lisis alcalina. Los productos obtenidos de los distintos métodos de extracción fueron depositados en geles de agarosa al 1% y sometidos a electroforesis para analizar la presencia de plásmidos.

Ninguno de los métodos utilizados permitió la observación de ADN plasmídico en la cepa bacteriana E<sub>22</sub>.

Las preparaciones de ADN total ( genómico ) fueron analizadas después de la digestión con distintas enzimas de restricción disponibles en ese momento ( EcoRI, AluI, BamHI ).



El marcador de peso molecular corresponde al ADN del bacteriófago lambda digerido con la enzima HindIII, teniendo fragmentos con los siguientes pesos: 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027 y 564 kb.

El ADN sin digerir mostró un fragmento de aproximadamente 23130 kb, que corresponden al tamaño del ADN genómico de la bacteria. Cuando el ADN fue digerido con EcoRI, se observaron fragmentos repetidos de ADN entre los valores de 23130 y 6557 kb.

La enzima BamHI, sin embargo, no parece reconocer sitios de corte puesto que mostró un patrón electroforéticamente igual al del ADN sin digerir. La mayor intensidad de la banda observada se debió probablemente a una mayor concentración de ADN en la muestra.

La enzima de restricción AluI permite la formación de fragmentos repetidos muy pequeños, lo que no permite una buena visualización de los mismos en el gel de electroforesis.

### **3.1.3.- Caracterización antigénica**

En este trabajo la cepa E<sub>22</sub> es considerada como un modelo para estudiar el proceso de patogenicidad de tipo "bolitas" y la interacción de esta bacteria con otra de tipo probiótico. Consecuentemente, era imprescindible obtener

un reactivo específico que permitiera el reconocimiento y caracterización de esta bacteria en las distintas investigaciones.

La carencia de marcadores genéticos de tipo plasmídico, convenientes para desarrollar una técnica de diagnóstico, hizo que el uso de anticuerpos monoclonales previamente producidos y seleccionados contra la cepa bacteriana S<sub>2</sub>, fuese considerado como una alternativa interesante para el diagnóstico. S<sub>2</sub> es una cepa de *Vibrio harveyi* causante del "síndrome de bolitas". Esta bacteria no fue utilizada en nuestras investigaciones por una aparente pérdida de patogenicidad, probablemente debida a su cultivo continuo en el laboratorio.

Entre los diferentes anticuerpos monoclonales seleccionados como específicos contra la cepa S<sub>2</sub> de *Vibrio harveyi* ( 2C9, 9H4, 6E7, 10F4, 10H11 ), los anticuerpos 2C9 y 9H4 fueron evaluados con la técnica de dot-blot, utilizando simultáneamente bacterias de control negativo (cepas IL1 y 158 de *Vibrio alginolyticus* ) y anticuerpos control ( IgG de chivo contra ratón conjugada con fosfatasa alcalina ).

Los resultados indicaron que los dos anticuerpos reaccionaban de forma específica frente a E<sub>22</sub>. Consecuentemente, estos dos anticuerpos fueron considerados como reactivos de diagnóstico adecuados para

estas investigaciones, previo desarrollo de una prueba de diagnóstico.

### 3.1.4.- Desarrollo de una prueba inmunológica de tipo “colony-blot”

Con el objetivo de establecer un modelo de estudio *in vitro* e *in vivo* de interacción bacteria patógena/bacteria probiótica/camarón, se hizo necesario disponer de una prueba de diagnóstico que permitiera reconocer de forma específica cada bacteria protagonista. En lo que respecta a la bacteria patógena, E<sub>22</sub>, la reactividad de los anticuerpos monoclonales 2C9 y 9H4 permitió considerar el desarrollo de una prueba de tipo inmunológico.

Entre las pruebas inmunológicas, la prueba colony-blot es particularmente interesante, ya que permite un análisis cuali y semi-cuantitativo de la presencia de una bacteria en una muestra correspondiente a una mezcla más o menos compleja de bacterias. Por ejemplo, en un sistema simple en el que se pongan en contacto E<sub>22</sub> con una bacteria presumiblemente probiótica es posible cuantificar las colonias de E<sub>22</sub> que reaccionan con el anticuerpo y deducir por recuento de colonias totales presentes, el número de colonias correspondientes a la otra bacteria.

El desarrollo de la prueba colony-blot fue realizado con el anticuerpo 2C9. Uno de los parámetros a controlar

fue la concentración del anticuerpo específico, que fue analizado paralelamente en dot-blot. En función del lote de líquido ascítico utilizado las concentraciones adecuadas del anticuerpo 2C9 oscilaron entre 1/3000 y 1/1000. Además se estableció la concentración óptima del anticuerpo conjugado de 1/10000, inferior a la recomendada por el proveedor (1/8000).

El uso inicial de dos medios de cultivo, TSA y TCBS, mostró variabilidad en los resultados de la prueba de colony-blot realizada sobre TSA. Por lo tanto, se seleccionó el TCBS como medio de cultivo para evaluación de la especificidad y sensibilidad del colony-blot (Edward Donoso, tesis de grado). La sensibilidad del colony-blot corresponde al tiempo mínimo de cultivo necesario para detectar una colonia. Diferentes experimentaciones mostraron que colonias correspondientes a 6-8 horas de cultivo pueden ser detectadas por el anticuerpo, aunque su observación todavía no sea posible. Esta observación es más fiable, y el recuento de bacterias más fácil cuando las bacterias son cultivadas cerca de 8 horas y las colonias aparecen como un punto definido, con bordes bien delimitados y fuertemente teñido. Después de este tiempo, pueden aparecer problemas de interpretación del colony-blot porque las reacciones presentan aspecto variable: pigmentación periférica, atenuada, irregular, difusa.

En distintos tiempos de cultivo, particularmente 8 horas, esta prueba de colony-blot fue totalmente específica, en cuanto a la ausencia de reacción con las cepas bacterianas probablemente probióticas ( ILI y 158 ) de *Vibrio alginolyticus* . Consecuentemente, para los análisis de experimentaciones *in vitro* sobre las interacciones patógeno/probiótico, las pruebas colony-blot permiten cuantificar los dos tipos bacterianos.

Al protocolo básico de colony-blot descrito en el capítulo de Materiales y Métodos se necesitó realizar una serie de modificaciones para la adaptación del mismo a nuestras condiciones de trabajo. El protocolo optimizado se describe a continuación.

Realizar un cultivo bacteriano en cajas Petri con TCBS a diluciones de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ . Incubar entre 6 a 8 horas a  $28^{\circ}\text{C}$ .

Colocar las membranas ( 82,5 mm de diámetro, con poros de 0.45 mm ) en la superficie del agar donde se han desarrollado las bacterias y dejar 5 minutos. Retirar la membrana y dejar secar por 30 minutos.

Incubar con PBS - leche descremada 5% (peso/volumen) en una caja Petri agitando suavemente por 60 min. a temperatura ambiente. Realizar 3 lavados de 3 min. c/u con PBS - Tween 20 ( 0,1% ).

En distintos tiempos de cultivo, particularmente 8 horas, esta prueba de colony-blot fue totalmente específica, en cuanto a la ausencia de reacción con las cepas bacterianas probablemente probióticas ( ILI y 158 ) de *Vibrio alginolyticus* . Consecuentemente, para los análisis de experimentaciones *in vitro* sobre las interacciones patógeno/probiótico, las pruebas colony-blot permiten cuantificar los dos tipos bacterianos.

Al protocolo básico de colony-blot descrito en el capítulo de Materiales y Métodos se necesitó realizar una serie de modificaciones para la adaptación del mismo a nuestras condiciones de trabajo. El protocolo optimizado se describe a continuación.

Realizar un cultivo bacteriano en cajas Petri con TCBS a diluciones de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ . Incubar entre 6 a 8 horas a  $28^{\circ}\text{C}$ .

Colocar las membranas ( 82,5 mm de diámetro, con poros de 0.45 mm ) en la superficie del agar donde se han desarrollado las bacterias y dejar 5 minutos. Retirar la membrana y dejar secar por 30 minutos.

Incubar con PBS - leche descremada 5% (peso/volumen) en una caja Petri agitando suavemente por 60 min. a temperatura ambiente. Realizar 3 lavados de 3 min. c/u con PBS - Tween 20 ( 0.1% ).

Depositar el anticuerpo ( fluido ascítico a la dilución adecuada en PBS - Tween 0,1% - leche 0,5% ó sobrenadante de cultivo sin diluir ) e incubar por 60 min. a temperatura ambiente. Realizar 3 lavados de 3 min. con PBS - Tween 20 ( 0,1% ).

Depositar el anticuerpo conjugado ( a la fosfatasa alcalina ) e incubar por 45 min., dilución empleada del anticuerpo 1/10000 en PBS - Tween 0,1% - Leche 0.5 %.

Realizar 3 lavados de 3 min. con PBS - Tween 20 (0,1%). Incubar con la solución substrato recientemente preparada:

- BCIP ( 25 mg de 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolyfosfato en 0.5 ml de dimethyl-formamida ) 33  $\mu$ l.
- NBT ( 25 mg de Nitro Blue Tetrazolium en 1 ml de agua deionizada ) 66  $\mu$ l.
- Tampón Fosfatasa Alcalina ( Na Cl 5.84g/l, Mg Cl<sub>2</sub> 0.5 g/l, Tris base 12.11 g/l, pH 9.5 ) 10 ml.

### **3.2.-ESTUDIO COMPARATIVO DE PARAMETROS DE CULTIVO SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA CEPA "PATOGENA" E<sub>22</sub> ( *Vibrio harveyi* ) Y LAS CEPAS "PROBIOTICAS" ILI y 158 ( *Vibrio alginolyticus* )**

El estudio comparativo del efecto de distintas condiciones de cultivo de cada una de las bacterias estudiadas fue iniciado con el

objetivo de identificar algunas condiciones que sean ventajosas para las bacterias "probióticas". Tales condiciones se podrían utilizar más adelante a nivel de tanques en los laboratorios de larvas, para favorecer la colonización de bacterias probióticas y subsecuentemente prevenir el desarrollo de cepas patógenas.

Se estudiaron diferentes parámetros. En primer lugar, parámetros físico-químicos de tipo ambiental ( pH, temperatura, salinidad ); también se estudió el efecto de compuestos relacionados con la tecnología de laboratorio de larvas ( tiosulfato, EDTA, sacarosa, nitrato, fosfato ) y de antibióticos clásicamente usados en acuicultura (cloramfenicol, oxitetraciclina, cotrimoxazol, eritromicina, furazolidona) o inusuales (kanamicina, ampicilina).

### **3.2.1.- Determinación de las características de crecimiento de las diferentes cepas bacterianas en el medio de referencia**

Como medio de referencia se utilizó LB modificado (ver Materiales y Métodos), salinidad 20%, pH 7.5, temperatura 28°C. Las características de crecimiento fueron determinadas mediante la variación de la densidad óptica de los cultivos en microplacas. Cada ensayo repetido al menos dos veces por duplicado.

La variación de la densidad óptica fue determinada a las 7, 14 y 17 horas después de la siembra. Los resultados



mostrados en la figura 9, indican que el crecimiento fue lineal hasta las 14 horas para las cepas E<sub>22</sub> e ILI, mientras que la cepa 158 detuvo antes su crecimiento, a las 10 horas aproximadamente. Además es interesante resaltar que la cepa 158 en estas condiciones de cultivo tiene un crecimiento más lento, alcanzando valores máximos inferiores a las otras dos cepas, por lo que parece que esta bacteria no está bien adaptada a estas condiciones de cultivo consideradas como referencia.

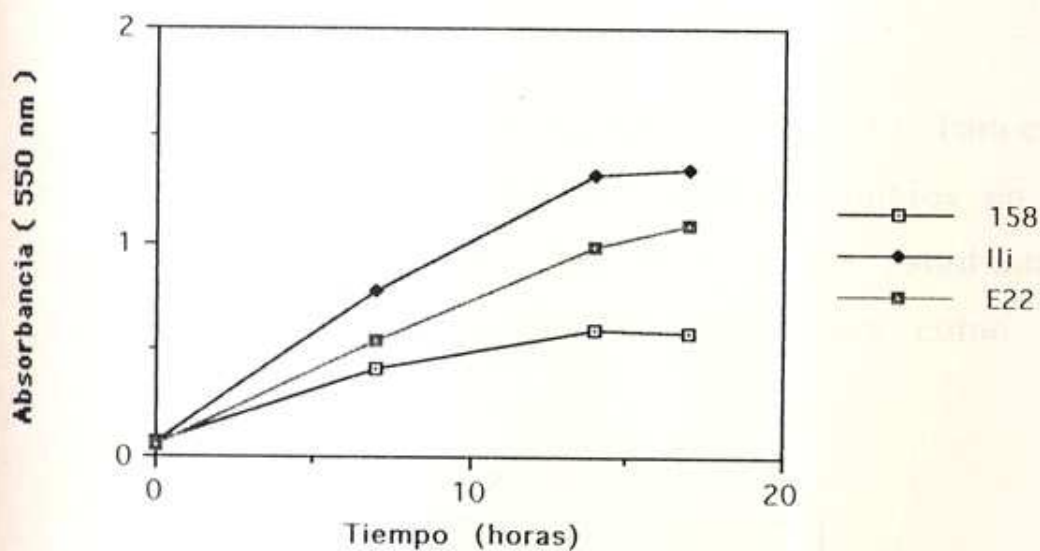


Figura 9. Curva de crecimiento en función del tiempo de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, en las condiciones de referencia (medio LB modificado, salinidad 2%, pH 7.5, temperatura 28 °C). La siembra se realizó con 10<sup>5</sup> bacterias/pocillo, concentración estimada a partir de A<sub>550</sub>.

Tabla 4.- Valores medios  $\pm$  desviación estándar del crecimiento de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, en las condiciones de referencia.

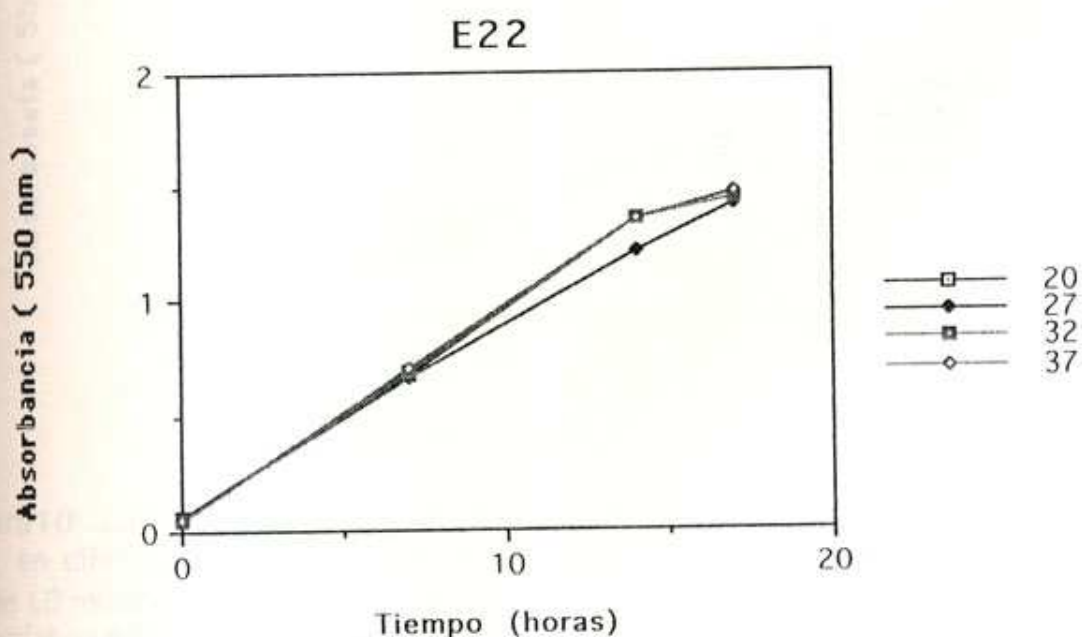
Control	
E22	1.024 $\pm$ 0.0379 <sup>a</sup>
ILI	1.287 $\pm$ 0.1133 <sup>a</sup>
158	0.518 $\pm$ 0.1298 <sup>b</sup>

Valores con la misma letra no tuvieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ )

### 3.2.2.- Comparación del crecimiento de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158 en relación a la salinidad

Los crecimientos de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158 fueron analizados para las salinidades 2%, 2.7%, 3.2% y 3.7%. Estas salinidades fueron seleccionadas por corresponder a niveles de variaciones observadas localmente. Además, la salinidad es un parámetro que se puede fácilmente controlar en los tanques con una perspectiva de manipulación de este parámetro para favorecer el desarrollo de cepas probióticas.

Los resultados se presentan en la figura 10. Para este rango de salinidad, no se observan cambios en el comportamiento de las tres cepas estudiadas. Consecuentemente, este parámetro aparece como no explotable.



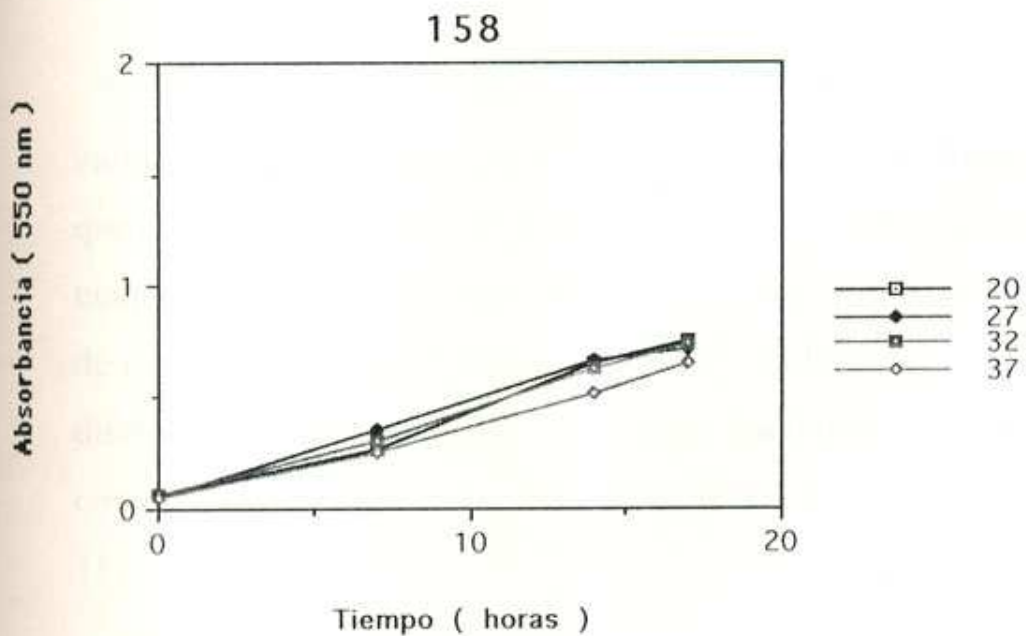
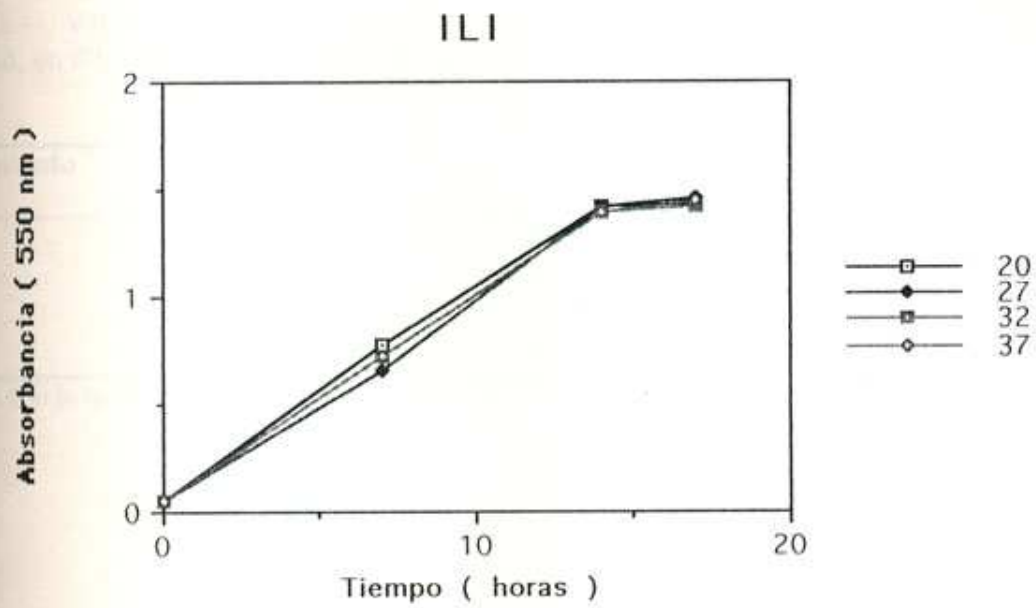


Figura 10 Curva de crecimiento en función del tiempo de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, en diferentes condiciones de salinidad ( 2%, 2.7%, 3.2% y 3.7% ) en medio LB modificado (pH 7.5, temperatura 28 °C). La siembra se realizó con 10<sup>5</sup> bacterias/pocillo, concentración estimada a partir de A<sub>550</sub>.

Tabla 5.- Valores medios  $\pm$  desviación estándar del crecimiento de las cepas E<sub>22</sub>, I1I y 158, en diferentes condiciones de salinidad.

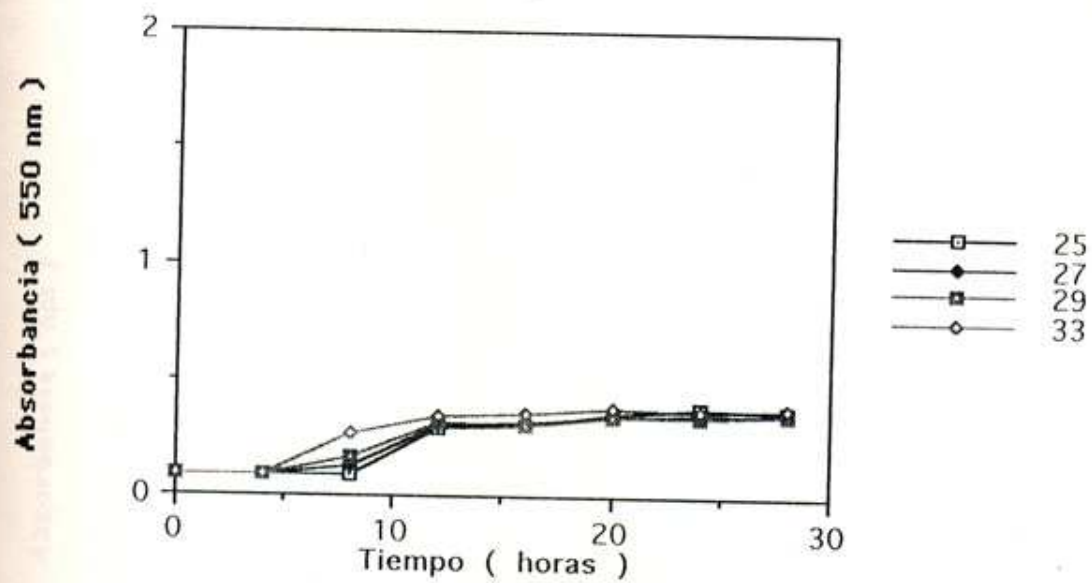
Tratamiento	E22	I1I	158
20 ppt	1.382 $\pm$ 0.0311 <sup>a</sup>	1.378 $\pm$ 0.0255 <sup>a</sup>	0.701 $\pm$ 0.0042 <sup>a</sup>
27 ppt	1.365 $\pm$ 0.0007 <sup>a</sup>	1.397 $\pm$ 0.0028 <sup>a</sup>	0.661 $\pm$ 0.0071 <sup>b</sup>
32 ppt	1.389 $\pm$ 0.0092 <sup>a</sup>	1.360 $\pm$ 0.0057 <sup>a</sup>	0.681 $\pm$ 0.0127 <sup>ab</sup>
37 ppt	1.419 $\pm$ 0.0049 <sup>a</sup>	1.391 $\pm$ 0.0134 <sup>a</sup>	0.594 $\pm$ 0.0042 <sup>c</sup>

Valores con la misma letra no tuvieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ )

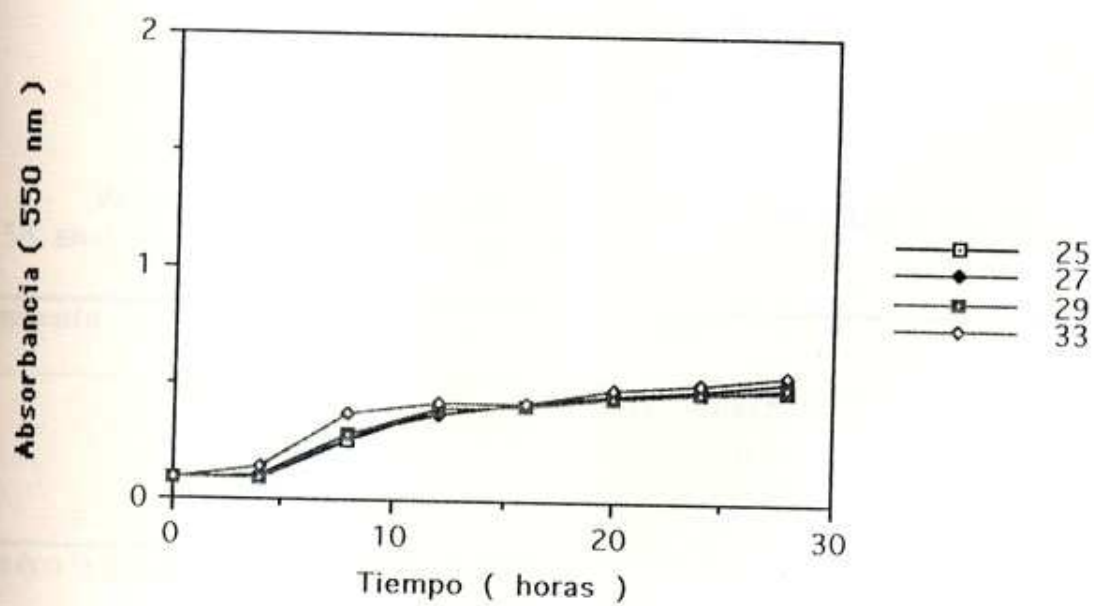
### 3.2.3.- Comparación del crecimiento de las cepas E<sub>22</sub>, I1I y 158 en relación a la temperatura

La temperatura es otro parámetro que presenta variaciones importantes en la tecnología de larvicultura y que es interesante estudiar porque se puede controlar en los tanques. Los experimentos fueron realizados con extremos de temperatura comprendidos entre 25 y 33 °C. No se vió diferencia de crecimiento de las cepas bacterianas con los controles, a las diferentes temperaturas analizadas (Figura 11).

## E22



## ILI



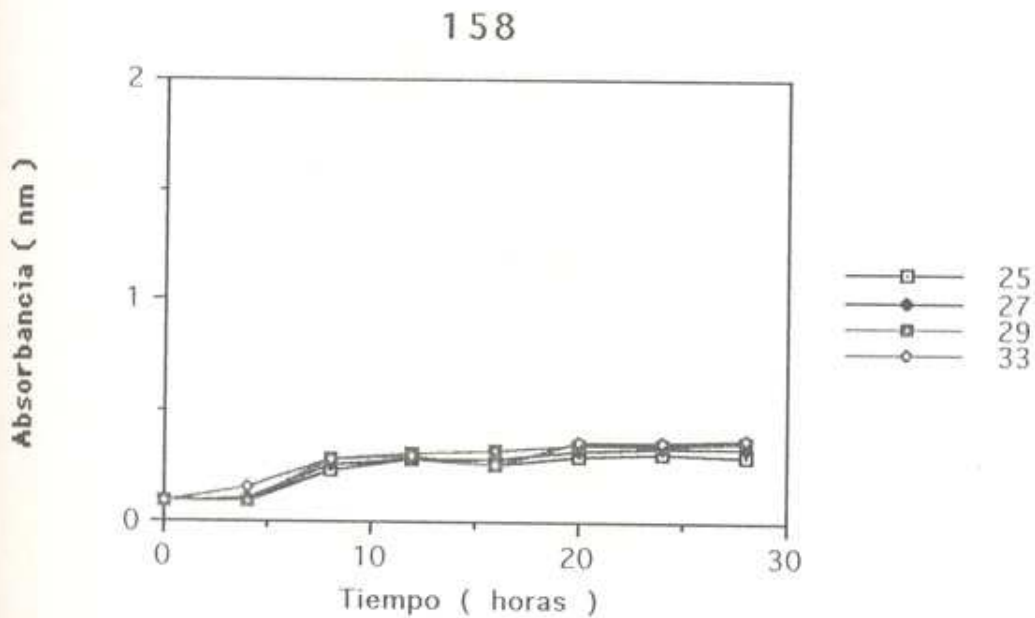


Figura 11. . Curva de crecimiento en función del tiempo de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, a diferentes condiciones de temperatura (25 °C, 27 °C, 29 °C y 33 °C) en medio LB modificado ( pH 7.5, temperatura 28 °C ). La siembra se realizó con 10<sup>5</sup> bacterias/pocillo, concentración estimada a partir de A<sub>550</sub>.

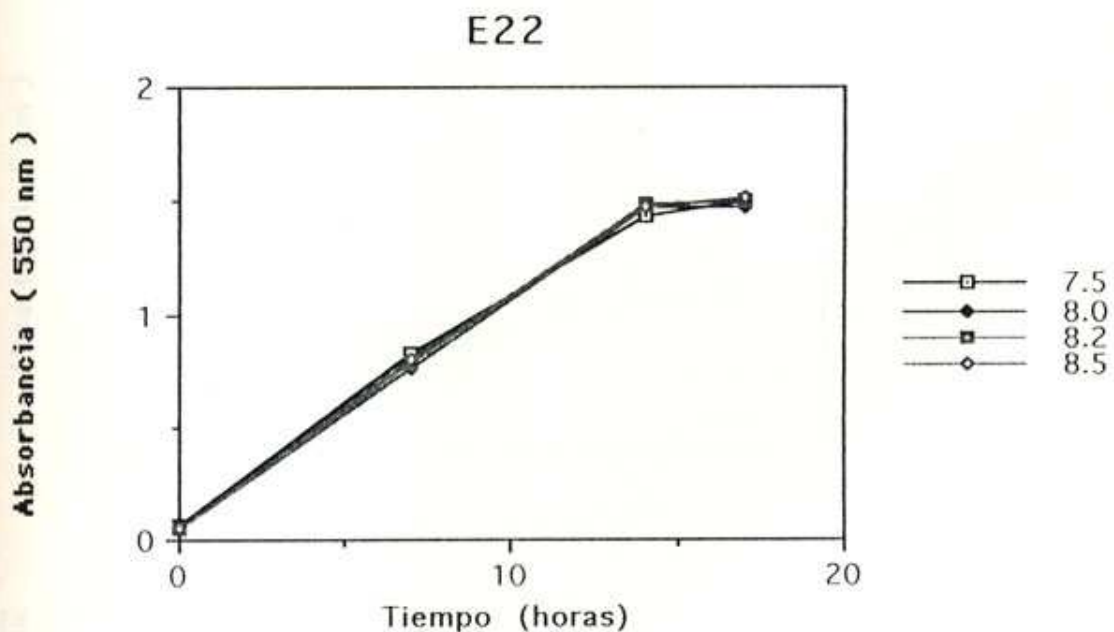
Tabla 6.- Valores medios  $\pm$  desviación estándar del crecimiento de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, en diferentes condiciones de temperatura.

Tratamiento	E22	ILI	158
25°C	0.279 $\pm$ 0.0042 <sup>a</sup>	0.400 $\pm$ 0.0007 <sup>a</sup>	0.212 $\pm$ 0.0057 <sup>a</sup>
27°C	0.275 $\pm$ 0.0085 <sup>a</sup>	0.436 $\pm$ 0.0064 <sup>b</sup>	0.242 $\pm$ 0.0035 <sup>b</sup>
29°C	0.272 $\pm$ 0.0071 <sup>a</sup>	0.412 $\pm$ 0.0057 <sup>a</sup>	0.277 $\pm$ 0.0049 <sup>c</sup>
33°C	0.300 $\pm$ 0.0078 <sup>a</sup>	0.458 $\pm$ 0.0057 <sup>c</sup>	0.291 $\pm$ 0.0070 <sup>d</sup>

Valores con la misma letra no tuvieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ )

### 3.2.4.- Comparación del crecimiento de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158 en relación al pH

El pH del medio es un caracter físico-químico que puede afectar el crecimiento bacteriano. En el tanque es difícil controlar este parámetro pues depende sólomente de la capacidad tampón del agua del mar. Por este motivo se realizaron en un principio pruebas en las que no se utilizaron sustancias tampón en el medio de cultivo, ajustando el pH a 7.5 ( condiciones de referencia ), 8.0. 8.2 y 8.5. Los resultados de esta serie de ensayos son mostrados en la siguiente figura.



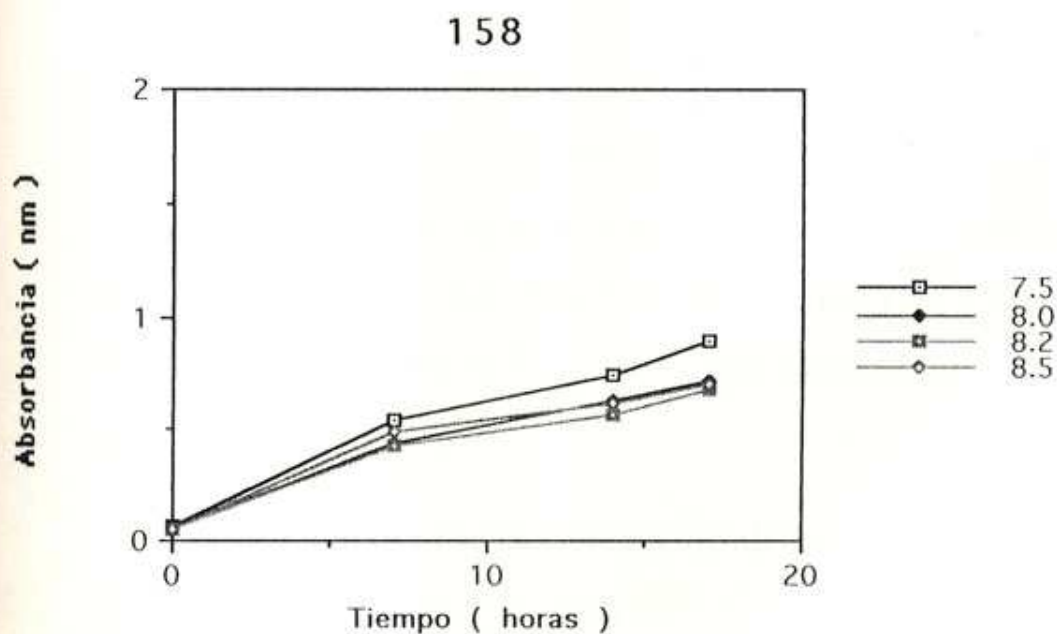
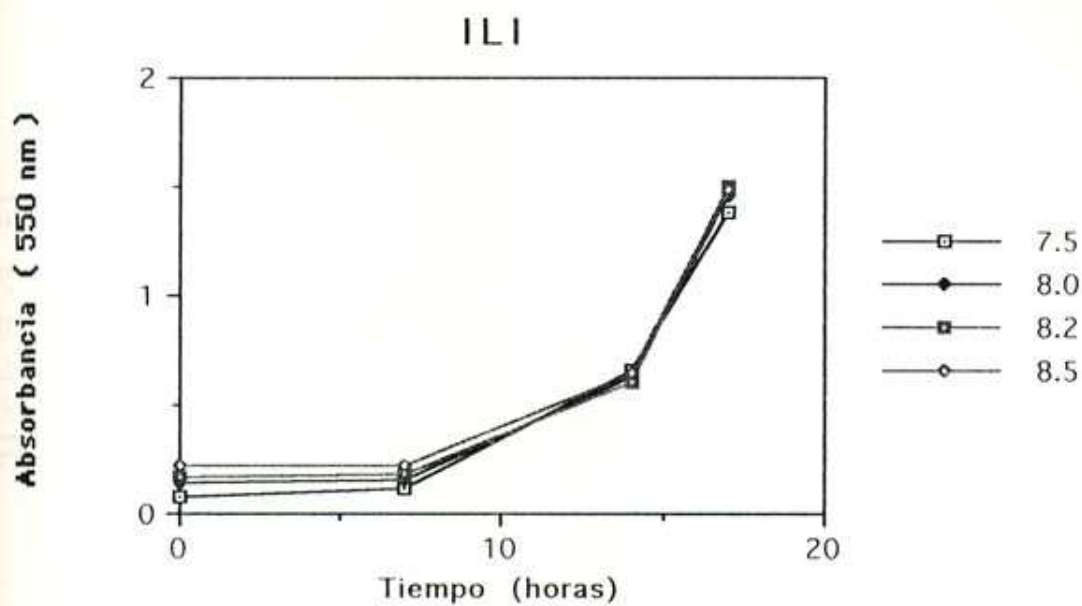


Figura 12. Curva de crecimiento en función del tiempo a diferentes condiciones de pH (7.5, 8.0, 8.2, 8.5) de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, en medio LB modificado (sin tampón, 2% salinidad, temperatura 28 °C). La siembra se realizó con 10<sup>5</sup> bacterias/pocillo, concentración estimada a partir de A<sub>550</sub>.



Tabla 7.- Valores medios  $\pm$  desviación estándar del crecimiento de las cepas E22, ILI y 158, en diferentes condiciones de pH.

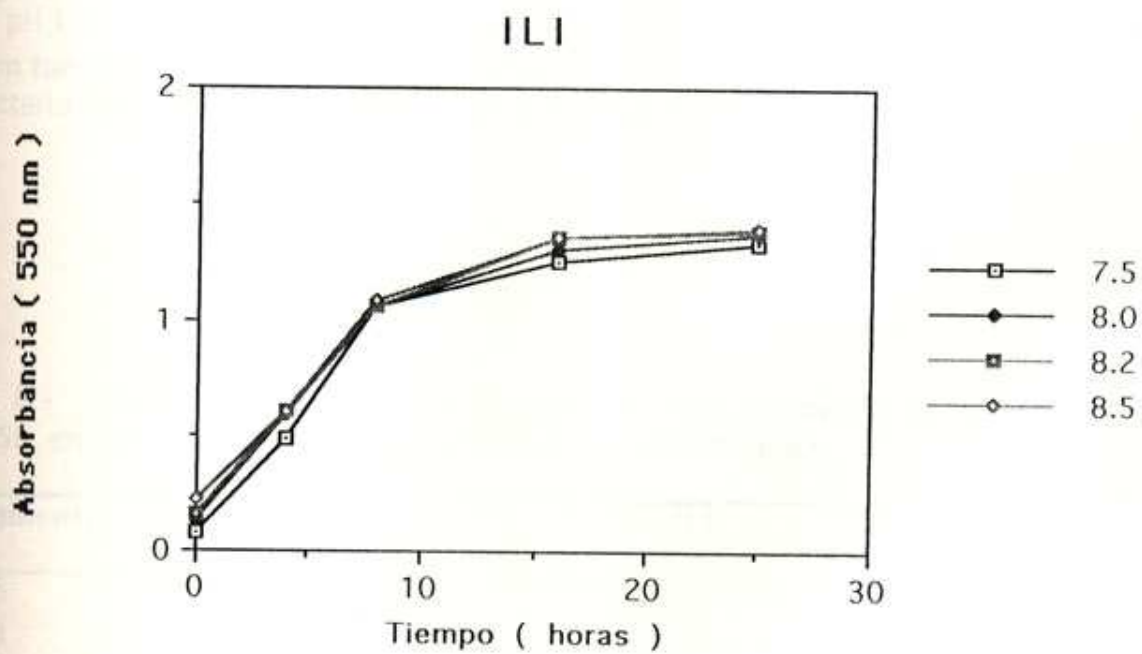
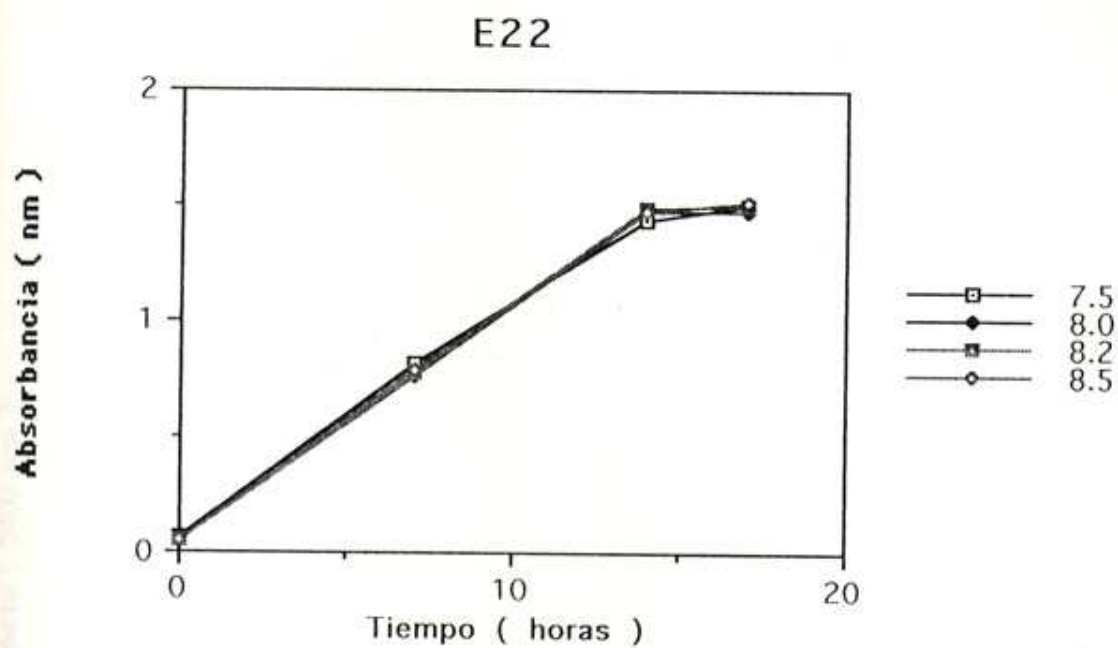
Tratamiento	E22	ILI	158
pH 7.5	1.437 $\pm$ 0.0120 <sup>a</sup>	1.410 $\pm$ 0.0177 <sup>a</sup>	0.841 $\pm$ 0.0021 <sup>a</sup>
pH 8.0	1.428 $\pm$ 0.0255 <sup>a</sup>	1.428 $\pm$ 0.0255 <sup>a</sup>	0.667 $\pm$ 0.0827 <sup>a</sup>
pH 8.2	1.451 $\pm$ 0.0396 <sup>a</sup>	1.414 $\pm$ 0.0332 <sup>a</sup>	0.632 $\pm$ 0.0431 <sup>a</sup>
pH 8.5	1.456 $\pm$ 0.0361 <sup>a</sup>	1.416 $\pm$ 0.0113 <sup>a</sup>	0.652 $\pm$ 0.0021 <sup>a</sup>

Valores con la misma letra no tuvieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ )

No se observaron diferencias de crecimiento aparentes en relación con el pH para ninguna de las cepas estudiadas.

En una segunda serie de ensayos, se añadió un tampón HEPES ( Sigma Chemical Co., H-0763 ) 20 mM en el medio para una mejor evaluación el efecto del pH, aún conociendo que es muy difícil la extrapolación de este tipo de experimentos a nivel de tanques, por razones prácticas y de costo.

Tampoco se observó un efecto del pH para ninguno de los aislados, cuando se tamponó el medio con el fin de mantener el pH.



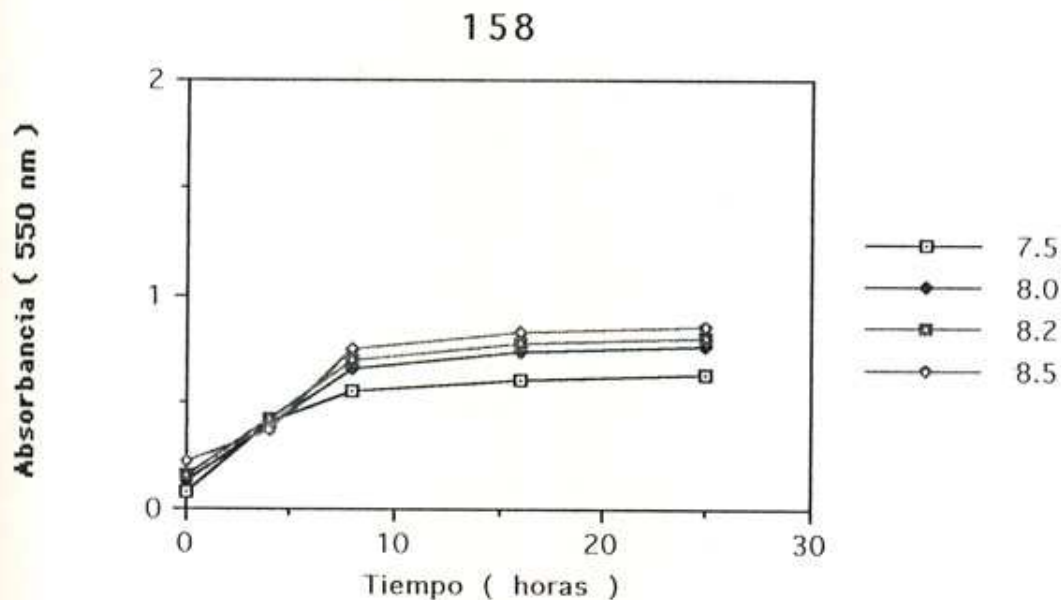


Figura 13. Curva de crecimiento en función del tiempo a diferentes condiciones de pH (7.5, 8.0, 8.2, 8.5) de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, en medio LB modificado (con tampón, 2% salinidad, temperatura 28 °C). La siembra se realizó con 10<sup>5</sup> bacterias/pocillo, concentración estimada a partir de A<sub>550</sub>.

Tabla 8.- Valores medios  $\pm$  desviación estándar del crecimiento de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, en diferentes condiciones de pH (medio tamponado).

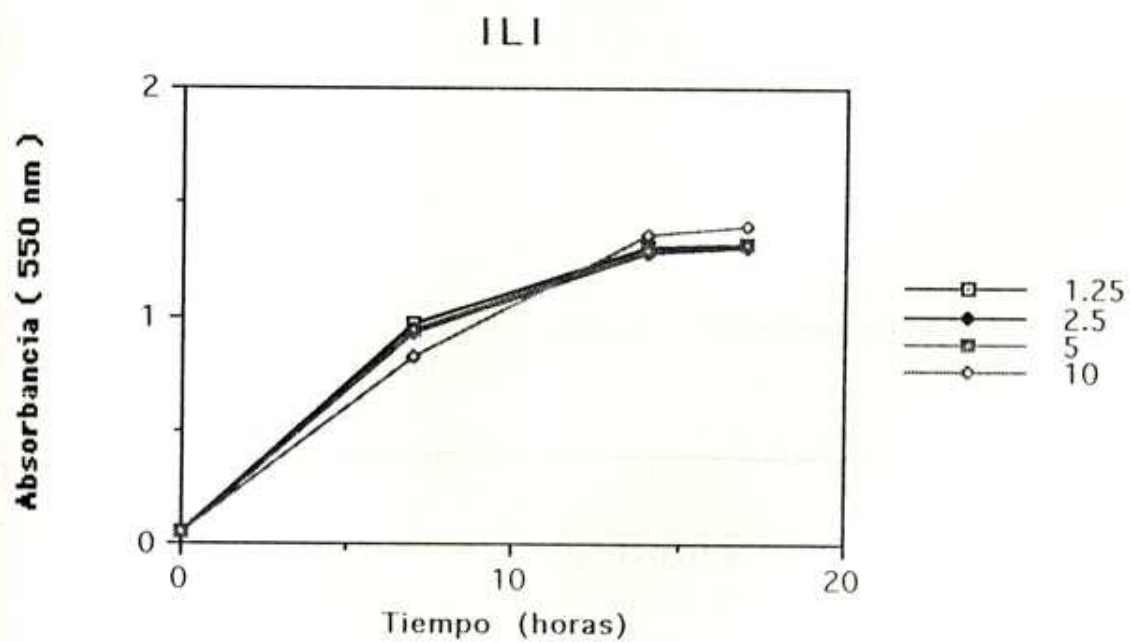
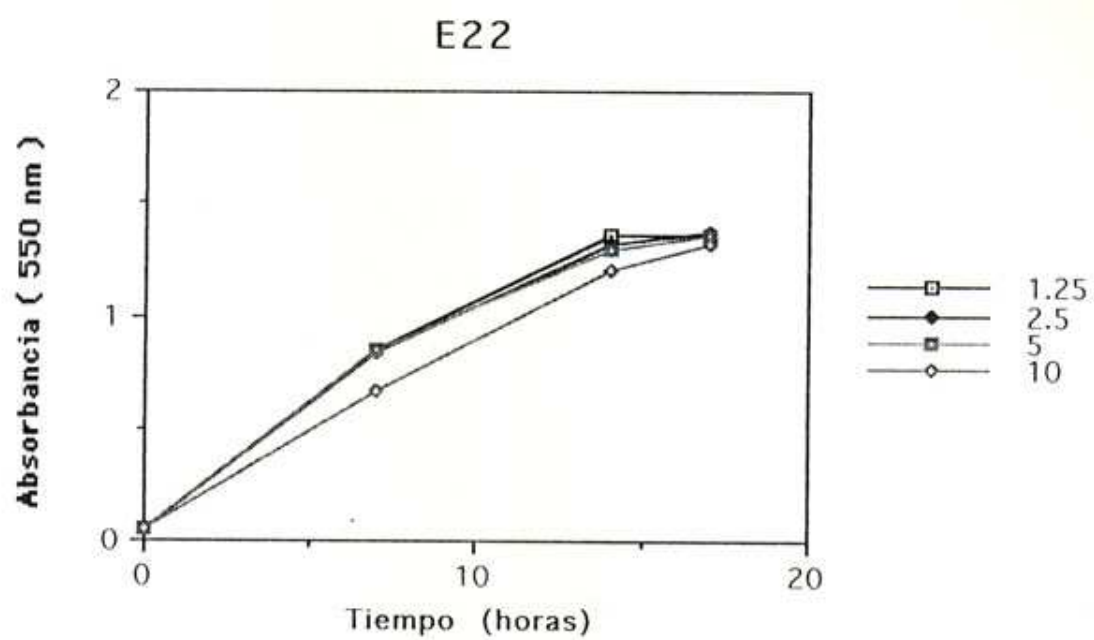
Tratamiento	E22	ILI	158
pH 7.5	1.271 $\pm$ 0.0050 <sup>a</sup>	1.246 $\pm$ 0.0131 <sup>a</sup>	0.541 $\pm$ 0.00080 <sup>a</sup>
pH 8.0	1.235 $\pm$ 0.0126 <sup>a</sup>	1.232 $\pm$ 0.0021 <sup>a</sup>	0.628 $\pm$ 0.0096 <sup>b</sup>
pH 8.2	1.243 $\pm$ 0.0333 <sup>a</sup>	1.224 $\pm$ 0.0085 <sup>a</sup>	0.641 $\pm$ 0.0085 <sup>b</sup>
pH 8.5	1.171 $\pm$ 0.0115 <sup>b</sup>	1.174 $\pm$ 0.0057 <sup>b</sup>	0.627 $\pm$ 0.0540 <sup>b</sup>

Valores con la misma letra no tuvieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ )

### 3.2.5.- Comparación del crecimiento de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158 en relación a la concentración de EDTA

El EDTA ( C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 2H<sub>2</sub>O ) es utilizado habitualmente en los laboratorios como agente quelante de metales pesados presentes en el agua. Este producto se utiliza a concentraciones comprendidas entre 5 y 15 ppm con una determinación relativamente empírica basada en criterios como la turbidez o el aguaje. Como este producto puede reducir la disponibilidad de iones importantes para las bacterias, una serie de experimentos fueron realizados para determinar la influencia del EDTA en el crecimiento bacteriano.

Los resultados de la figura 14 corresponden al crecimiento de las cepas bacterianas a concentraciones de EDTA de 1.25 ppm, 2.5 ppm, 5 ppm y 10 ppm. En ausencia o en presencia de EDTA a las concentraciones mencionadas anteriormente, el crecimiento de cada cepa bacteriana fue similar, indicando que no existe un efecto de este producto.



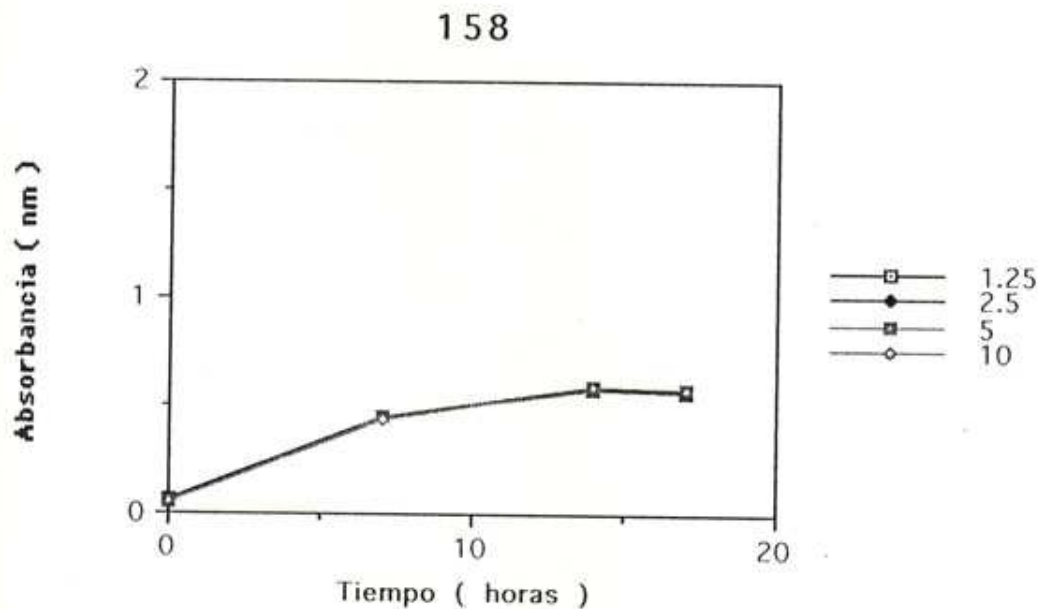


Figura 14. Curva de crecimiento en función de la presencia de EDTA a distintas concentraciones ( 1.25 ppm, 2.5 ppm, 5 ppm, 10 ppm ) de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, en medio LB modificado ( pH 7.5, 2% salinidad, temperatura 28 °C ). La siembra se realizó con 10<sup>5</sup> bacterias/pocillo, concentración estimada a partir de A<sub>550</sub>.

Tabla 9.- Valores medios  $\pm$  desviación estándar del crecimiento de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, en diferentes condiciones de EDTA.

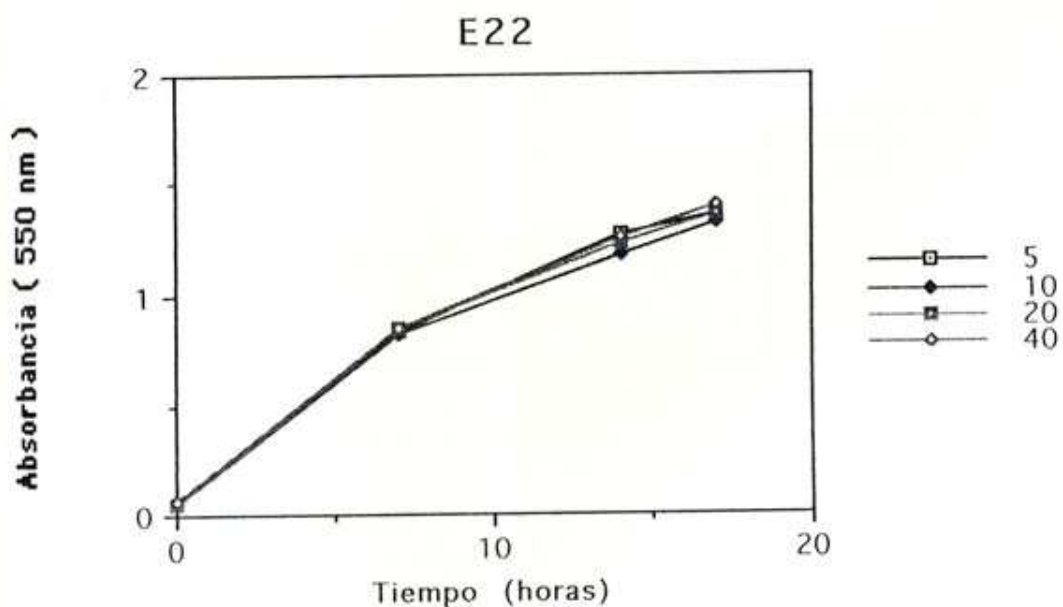
Tratamiento	E22	ILI	158
10 ppm	1.264 $\pm$ 0.0672 <sup>a</sup>	1.339 $\pm$ 0.0190 <sup>a</sup>	0.527 $\pm$ 0.0205 <sup>a</sup>
5 ppm	1.303 $\pm$ 0.0693 <sup>a</sup>	1.270 $\pm$ 0.0120 <sup>a</sup>	0.526 $\pm$ 0.0042 <sup>a</sup>
2.5 ppm	1.316 $\pm$ 0.0106 <sup>a</sup>	1.285 $\pm$ 0.0559 <sup>a</sup>	0.512 $\pm$ 0.0354 <sup>a</sup>
1.25 ppm	1.303 $\pm$ 0.0156 <sup>a</sup>	1.265 $\pm$ 0.0255 <sup>a</sup>	0.503 $\pm$ 0.0092 <sup>a</sup>

Valores con la misma letra no tuvieron diferencias significativas (  $p > 0.05$  )

### 3.2.6.- Comparación del crecimiento de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158 en relación a la concentración de tiosulfato

El tiosulfato es un producto que se emplea en la rutina de los laboratorios de larvas para neutralizar el cloro utilizado en la desinfección del agua de mar en el reservorio. La presencia de este producto o de sus residuos en el agua de los tanques puede influenciar la flora microbiana.

Este producto fue utilizado a concentraciones de 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm y 40 ppm en el medio de cultivo y su efecto en el crecimiento de las cepas bacterianas E<sub>22</sub>, ILI y 158 quedan reflejados en la figura 15.



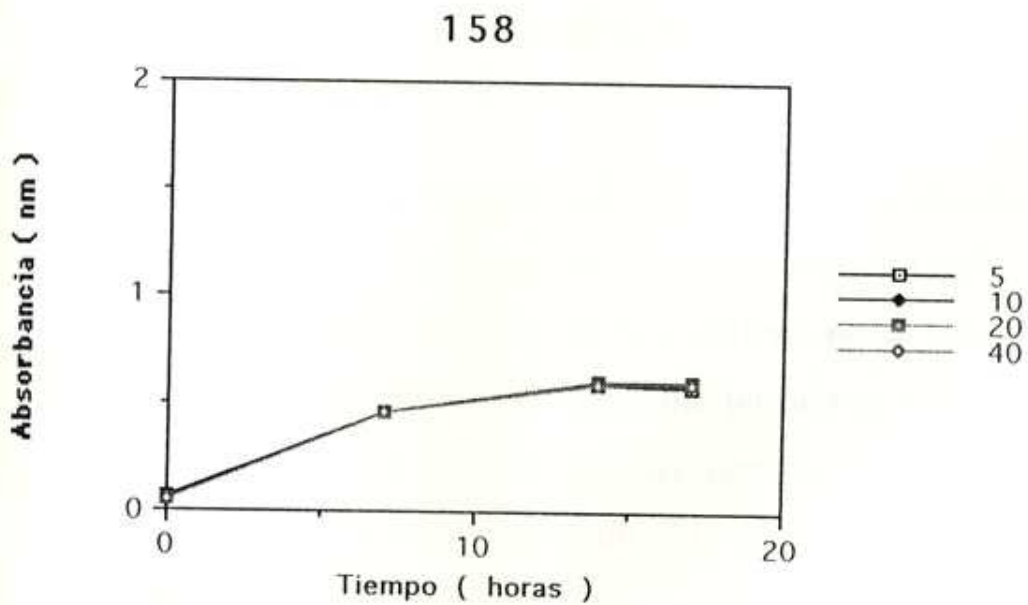
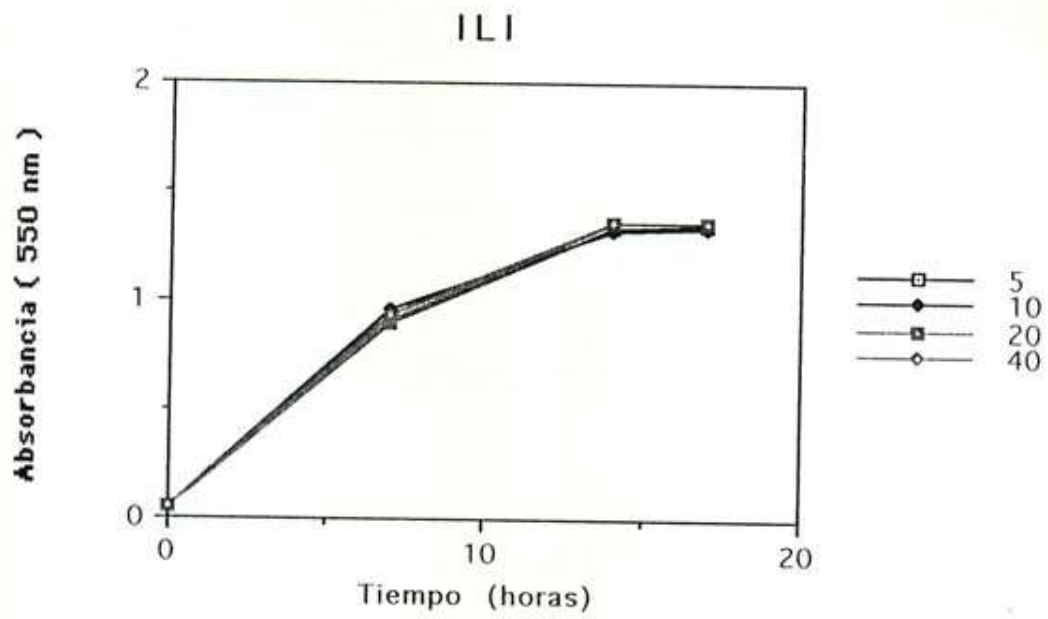


Figura 15. Curva de crecimiento en función de la presencia de tiosulfato a distintas concentraciones ( 5 ppm, 10ppm, 20 ppm, 40 ppm ) de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, en medio LB modificado ( pH 7.5, 2% salinidad, temperatura 28 °C ). La siembra se realizó con 10<sup>5</sup> bacterias/pocillo, concentración estimada a partir de A<sub>550</sub>.



Tabla 10.- Valores medios  $\pm$  desviación estándar del crecimiento de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, en diferentes condiciones de tiosulfato.

Tratamiento	E22	ILI	158
40 ppm	1.344 $\pm$ 0.0544 <sup>a</sup>	1.307 $\pm$ 0.0120 <sup>a</sup>	0.541 $\pm$ 0.0099 <sup>a</sup>
20 ppm	1.307 $\pm$ 0.0940 <sup>a</sup>	1.304 $\pm$ 0.0170 <sup>a</sup>	0.554 $\pm$ 0.0007 <sup>a</sup>
10 ppm	1.269 $\pm$ 0.0078 <sup>a</sup>	1.280 $\pm$ 0.0092 <sup>a</sup>	0.541 $\pm$ 0.0049 <sup>a</sup>
5 ppm	1.309 $\pm$ 0.0389 <sup>a</sup>	1.290 $\pm$ 0.0042 <sup>a</sup>	0.514 $\pm$ 0.0106 <sup>ab</sup>

Valores con la misma letra no tuvieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ )

Cualquiera que fuera la concentración utilizada, el crecimiento de las cepas bacterianas fue prácticamente igual al del control.

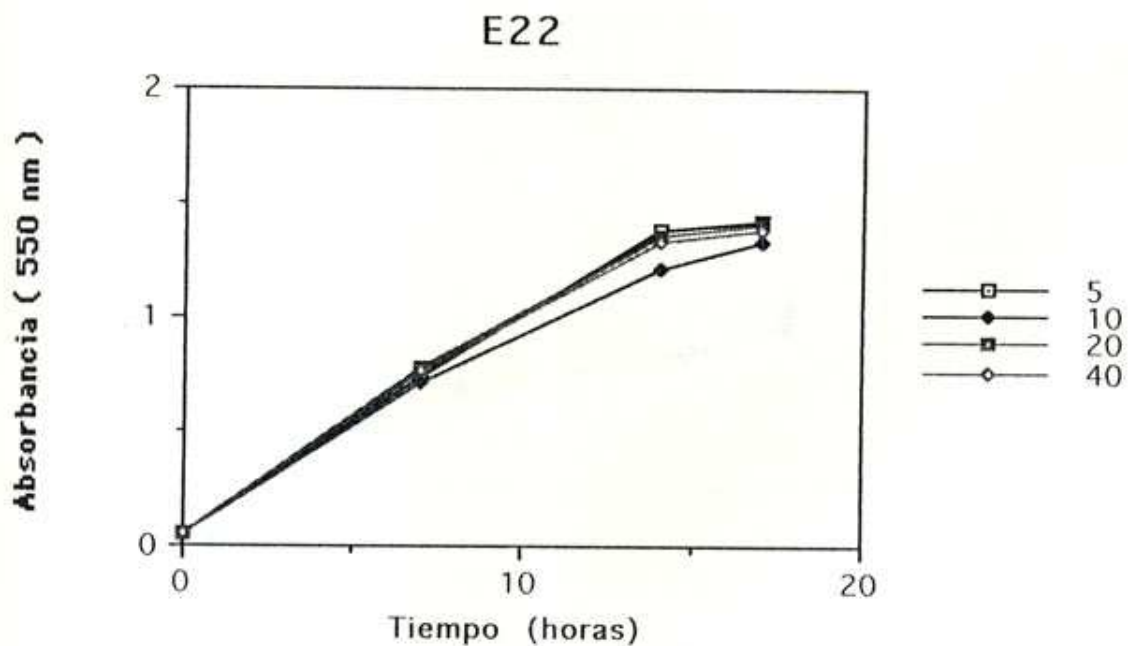
### 3.2.7.- Comparación del crecimiento de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158 en relación a la concentración de productos utilizados en el cultivo de probióticos

En los últimos años, algunos laboratorios comenzaron a utilizar probióticos. Este uso es totalmente empírico. En lo que a la bacteria se refiere, no se conoce si las bacterias utilizadas son realmente probióticas. Tampoco se conocen las condiciones óptimas para su cultivo y forma de utilización. Varios compuestos han sido empleados en los laboratorios en el crecimiento de cepas consideradas como probióticas, entre ellos el nitrato, fosfato y sacarosa.

Se realizaron una serie de experimentos dirigidos a determinar si existe efectivamente un efecto de estos

compuestos en el crecimiento de las cepas bacterianas consideradas probióticas ( ILI y 158 ) y sobre una cepa patógena ( E<sub>22</sub> ).

El nitrato fue utilizado en forma de sal sódica (NaNO<sub>3</sub>), a concentraciones de 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm y 40 ppm. Como indica la figura 16, no se observó ningún efecto del nitrato en el crecimiento de las bacterias estudiadas.



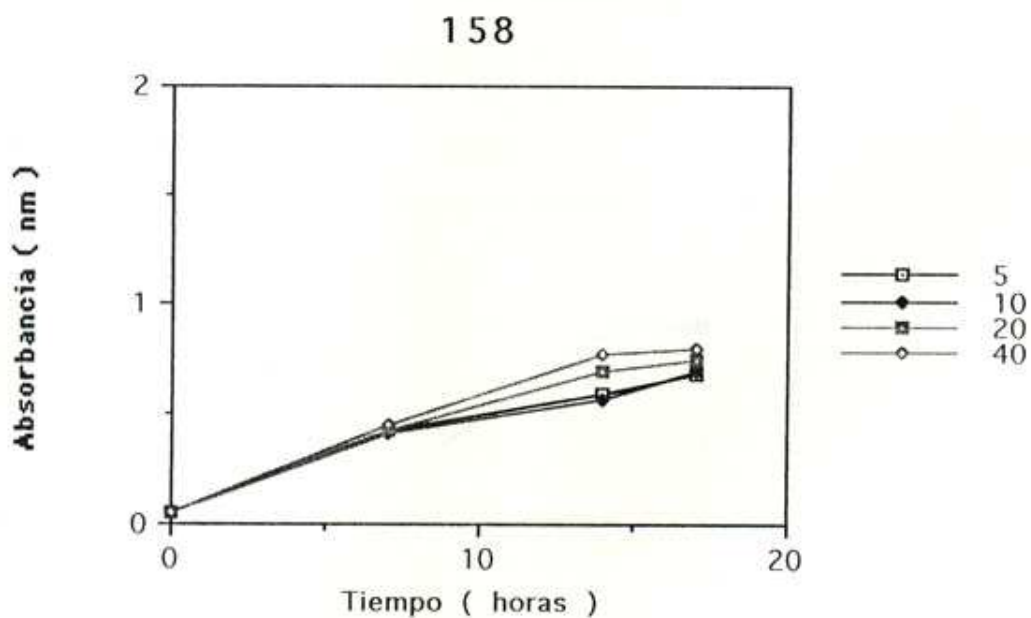
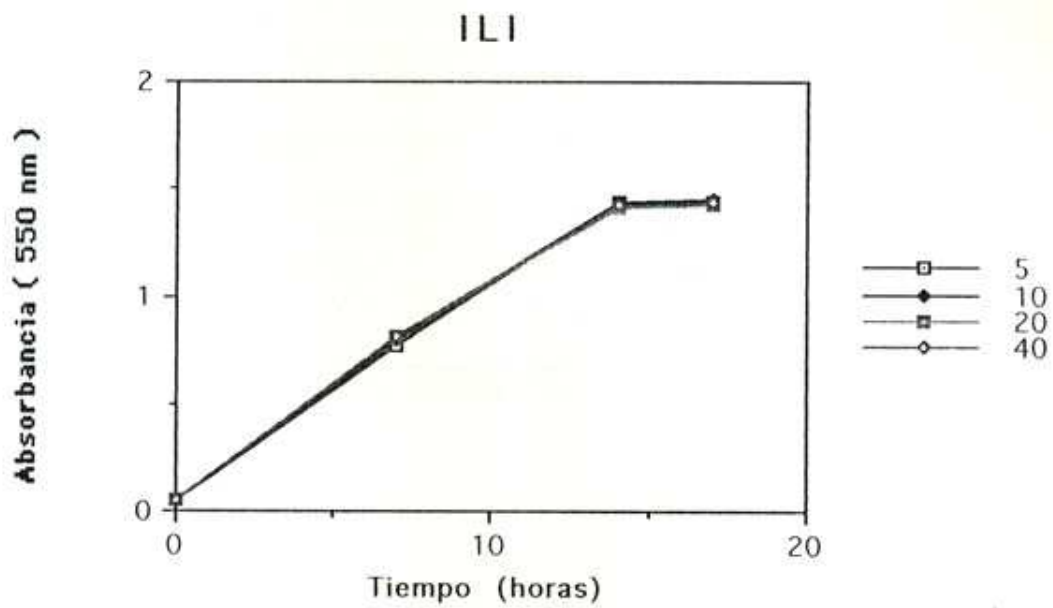


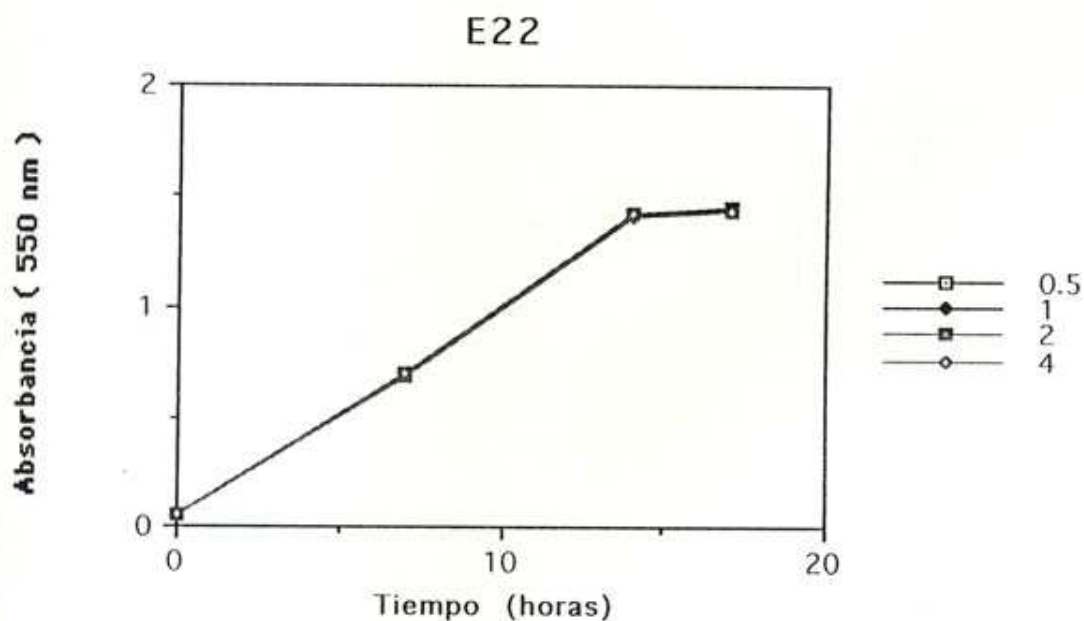
Figura 16. Curva de crecimiento en función de la presencia de nitrato sódico a distintas concentraciones ( 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm ) de las cepas E<sub>22</sub>, 111 y 158, en medio LB modificado ( pH 7.5, 2% salinidad, temperatura 28 °C ). La siembra se realizó con 10<sup>5</sup> bacterias/pocillo, concentración estimada a partir de A<sub>550</sub>.

Tabla 11.- Valores medios  $\pm$  desviación estándar del crecimiento de las cepas E22, ILI y 158, en diferentes condiciones de nitratos.

Tratamiento	E22	ILI	158
40 ppm	1.332 $\pm$ 0.0445 <sup>a</sup>	1.385 $\pm$ 0.0007 <sup>a</sup>	0.743 $\pm$ 0.0700 <sup>a</sup>
20 ppm	1.359 $\pm$ 0.0431 <sup>a</sup>	1.370 $\pm$ 0.0410 <sup>a</sup>	0.699 $\pm$ 0.0658 <sup>ab</sup>
10 ppm	1.283 $\pm$ 0.1781 <sup>a</sup>	1.404 $\pm$ 0.0021 <sup>a</sup>	0.646 $\pm$ 0.0410 <sup>bc</sup>
5 ppm	1.370 $\pm$ 0.0346 <sup>a</sup>	1.390 $\pm$ 0.0007 <sup>a</sup>	0.623 $\pm$ 0.0509 <sup>c</sup>

Valores con la misma letra no tuvieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ )

La siguiente figura muestra los resultados obtenidos en una serie de ensayos en los que se añadió fosfato sódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) al medio de cultivo bacteriano, a las concentraciones de 0.5 ppm, 1 ppm, 2 ppm y 4 ppm. Tampoco se observó un efecto de este producto en el crecimiento de las bacterias.



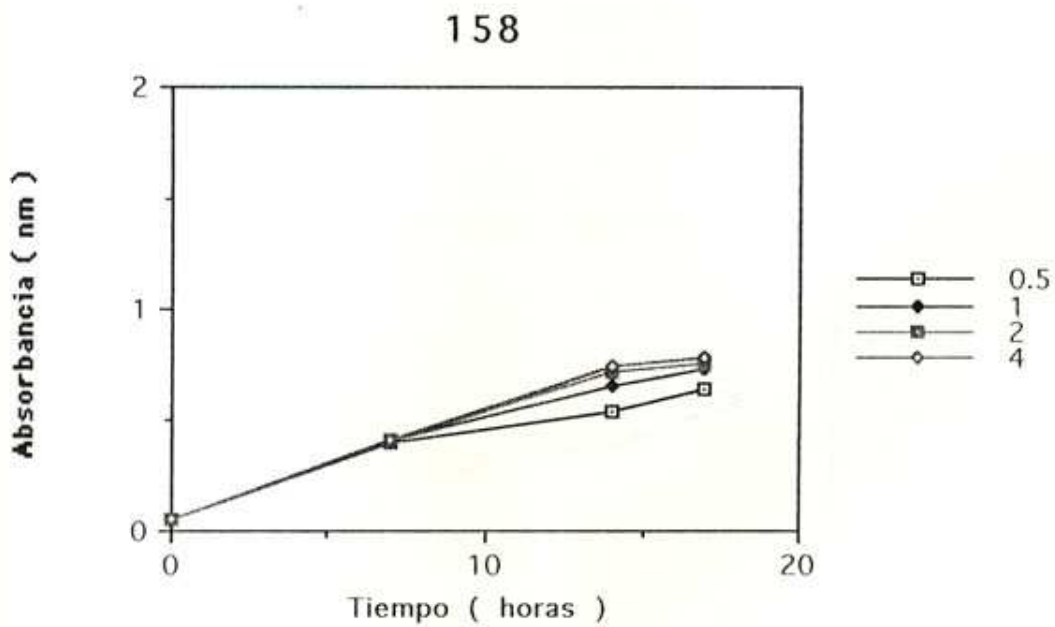
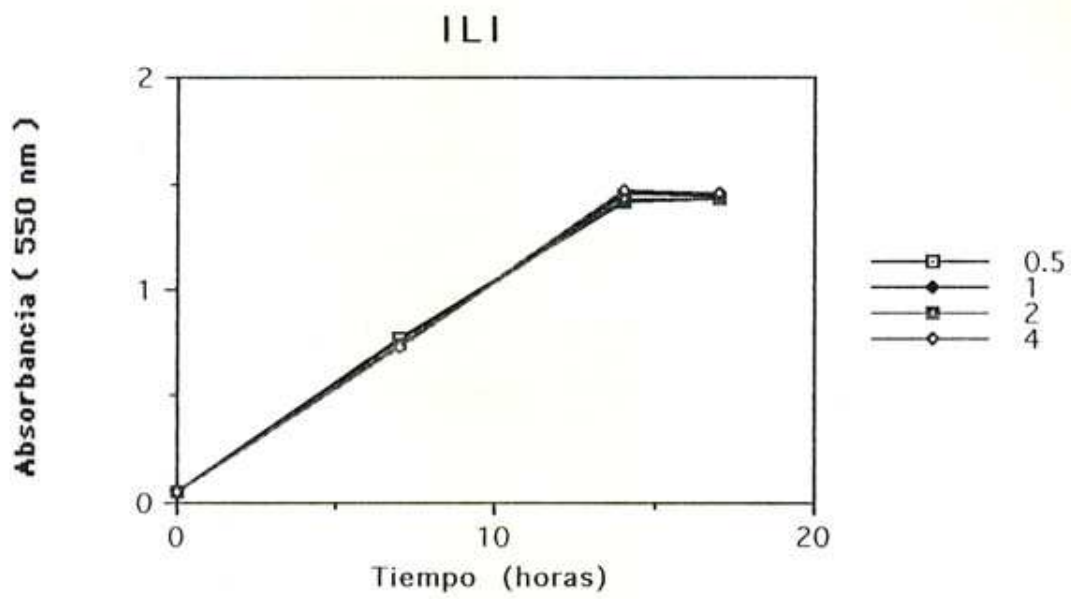


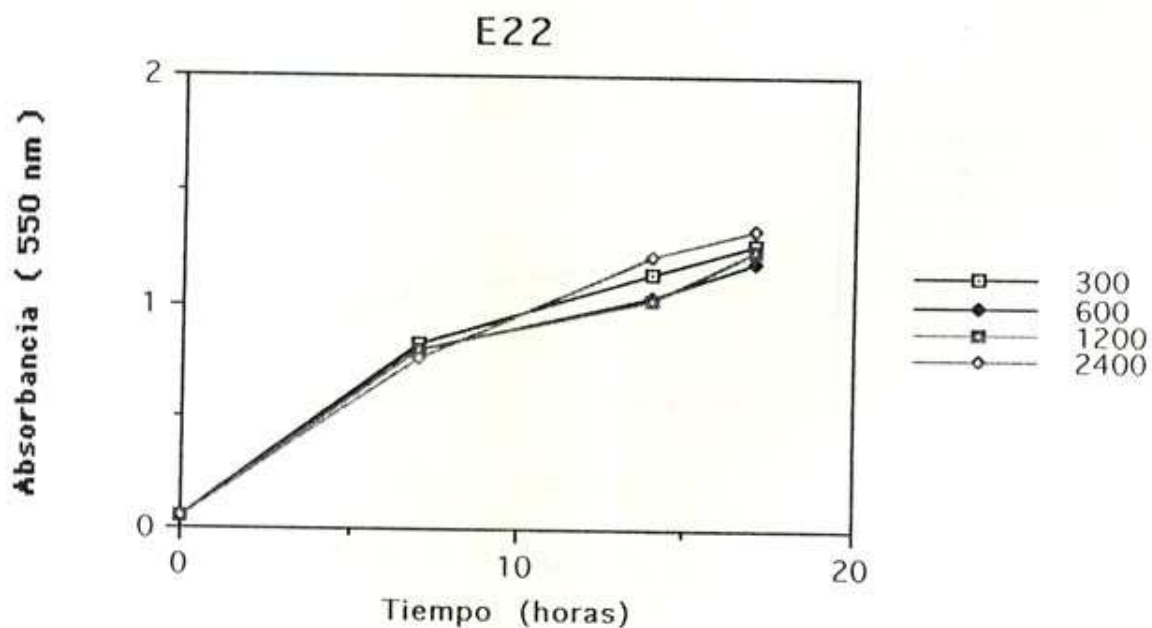
Figura 17. Curva de crecimiento en función de la presencia de fosfato sódico a distintas concentraciones ( 0.5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 4 ppm ) de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, en medio LB modificado ( pH 7.5, 2% salinidad, temperatura 28 °C ). La siembra se realizó con 10<sup>5</sup> bacterias/pocillo, concentración estimada a partir de A<sub>550</sub>.

Tabla 12.- Valores medios  $\pm$  desviación estándar del crecimiento de las cepas E22, ILI y 158, en diferentes condiciones de fosfatos.

Tratamiento	E22	ILI	158
4 ppm	1.417 $\pm$ 0.0396 <sup>a</sup>	1.400 $\pm$ 0.0289 <sup>a</sup>	0.724 $\pm$ 0.0354 <sup>a</sup>
2 ppm	1.389 $\pm$ 0.0226 <sup>a</sup>	1.402 $\pm$ 0.0255 <sup>a</sup>	0.704 $\pm$ 0.0403 <sup>a</sup>
1 ppm	1.383 $\pm$ 0.0099 <sup>a</sup>	1.390 $\pm$ 0.0368 <sup>a</sup>	0.678 $\pm$ 0.0148 <sup>a</sup>
0.5 ppm	1.409 $\pm$ 0.0035 <sup>a</sup>	1.375 $\pm$ 0.0127 <sup>a</sup>	0.589 $\pm$ 0.0297 <sup>b</sup>

Valores con la misma letra no tuvieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ )

Los resultados obtenidos cuando se utilizó sacarosa en el medio de cultivo a las concentraciones de 300 ppm, 600 ppm, 1200 ppm, 2400 ppm se muestran en la figura 18. No se observó efecto de la sacarosa en el crecimiento de las cepas estudiadas.



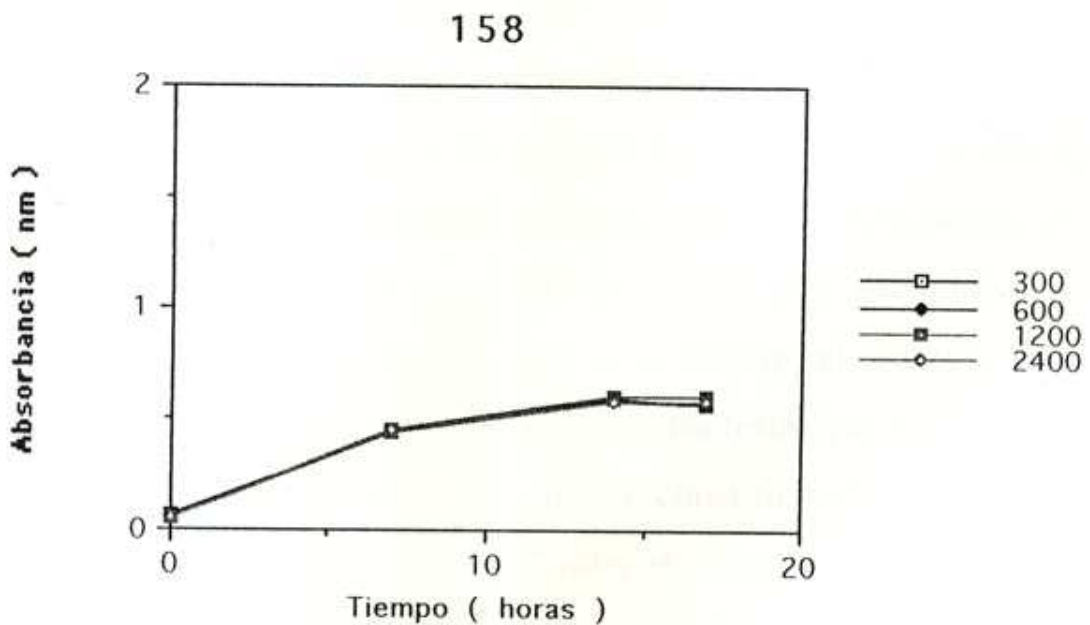
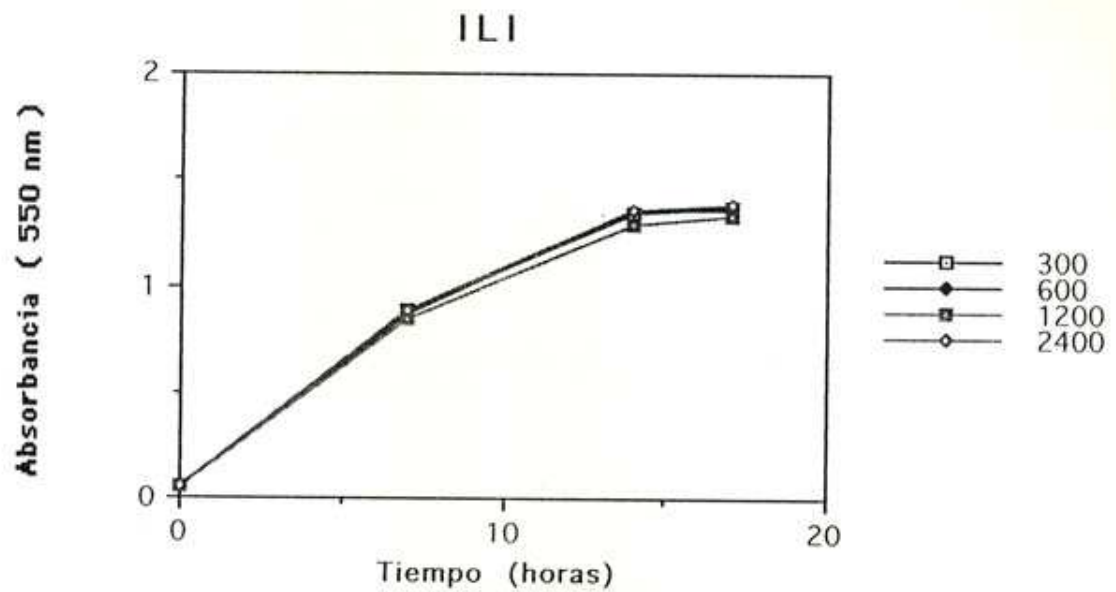


Figura 18. Curva de crecimiento en función de la presencia de sacarosa a distintas concentraciones (300 ppm, 600 ppm, 1200 ppm, 2400 ppm) de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, en medio LB modificado ( pH 7.5, 2% salinidad, temperatura 28 °C ). La siembra se realizó con 10<sup>5</sup> bacterias/pocillo, concentración estimada a partir de A<sub>550</sub>.

Tabla 13.- Valores medios  $\pm$  desviación estándar del crecimiento de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158, en diferentes condiciones de sacarosa.

Tratamiento	E22	ILI	158
2400 ppm	1.279 $\pm$ 0.0962 <sup>a</sup>	1.330 $\pm$ 0.0163 <sup>a</sup>	0.517 $\pm$ 0.0042 <sup>a</sup>
1200 ppm	1.188 $\pm$ 0.0410 <sup>a</sup>	1.268 $\pm$ 0.1117 <sup>a</sup>	0.543 $\pm$ 0.0219 <sup>a</sup>
600 ppm	1.143 $\pm$ 0.0643 <sup>a</sup>	1.298 $\pm$ 0.0205 <sup>a</sup>	0.515 $\pm$ 0.0233 <sup>a</sup>
300 ppm	1.214 $\pm$ 0.0926 <sup>a</sup>	1.314 $\pm$ 0.0559 <sup>a</sup>	0.510 $\pm$ 0.0190 <sup>a</sup>

Valores con la misma letra no tuvieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ )

### 3.2.8.- Determinación de concentraciones inhibitoras y letales de antibióticos de uso común (cloramfenicol, oxitetraciclina, cotrimoxazol, eritromicina, furazolidona) o inusuales (kanamicina, ampicilina) en larvicultura.

Muchos antibióticos son utilizados comúnmente en la rutina de los laboratorios de larvas como medida preventiva de control de enfermedades bacterianas. Esta medida puede crear problemas de aparición de resistencias bacterianas a dichos antibióticos, lo que dificultaría el tratamiento, particularmente cuando se trata de bacterias patógenas. El uso de bacterias probióticas puede constituir una alternativa a la utilización de antibióticos, aunque en algunas situaciones de enfermedad los probióticos pueden no ser suficiente. En este contexto, es muy importante conocer el espectro de sensibilidad en términos de concentración inhibitoria y letal, por una parte de las bacterias probióticas a fin de nunca utilizar antibióticos que las afecten; y por



otra parte de las bacterias patógenas a fin de conocer como tratarlas eficaz y específicamente.

Se estudiaron antibióticos de uso habitual en los laboratorios ( furazolidona, oxitetraciclina, cloranfenicol, eritromicina ) y otros menos comunes ( ampicilina, kanamicina y cotrimoxazol ).

Las concentraciones inhibitorias y letales de estos antibióticos se determinaron mediante experimentos de cultivo de las cepas E<sub>22</sub>, ILI y 158 en presencia de los antibióticos a las concentraciones de 0.1 ppm, 0.5 ppm, 2.4 ppm, 12 ppm y 60 ppm. Los ensayos se realizaron en microplacas, por triplicado, manteniendo las mismas condiciones de cultivo que en los experimentos anteriores (LB, pH 7.5, 2% salinidad, 28 °C). Las densidades de siembra fueron de 10<sup>5</sup> y 10<sup>6</sup> bacterias/pocillo.

Las concentraciones inhibitorias y letales se determinaron respectivamente por la observación de no crecimiento a las 24 horas de incubación en presencia de antibióticos y la observación de no crecimiento posteriormente, resembrando las mismas bacterias en medio fresco de cultivo sin antibióticos.

En efecto los antibióticos usuales ( furazolidona, oxitetraciclina, cloranfenicol y eritromicina ) están siendo empleados a concentraciones subeficaces en la mayoría de

los laboratorios. Por ejemplo la furazolidona se está utilizando a una concentración de 0.1 - 1 ppm y nuestros resultados indican que sólo es eficaz a la concentración de 12 ppm para las cepas bacterianas analizadas.

En lo que respecta a la metodología de antibiograma practicado con discos, conduce a determinar la sensibilidad bacteriana a un antibiótico en base a un efecto inhibitor y no letal. Por ejemplo, la sensibilidad de las bacterias ILI y 158 a las concentraciones de 0.5 - 2.4 ppm de oxitetraciclina corresponden solamente a un efecto inhibitor, y solo se observa efecto letal a la concentración de 12 ppm. Esto sugiere que será necesario realizar pruebas de MIC o determinación de concentraciones letales para la selección de antibióticos adecuados y evitar la utilización de antibióticos a concentraciones subletales que conduciría a la selección de bacterias patógenas resistentes.

Además, los resultados muestran que los antibióticos probados tienen diferentes efectos sobre las cepas bacterianas, que tienen que ser considerados cuando se trabaja con bacterias probióticas. Por ejemplo, el cloranfenicol, a la concentración de 2.4 ppm inhibe el crecimiento de la bacteria ILI y es letal para la cepa 158, ambas consideradas probióticas, sin embargo, no afecta el crecimiento de la cepa patógena E<sub>22</sub>. Por el contrario, la concentración 2.4 ppm de oxitetraciclina mostró un efecto

letal sobre la bacteria patógena E<sub>22</sub> y solamente inhibidor para las bacterias consideradas "beneficiosas", IL1 y 158.

Las siguientes tablas recapitulan la totalidad de los resultados y llaman a recapacitar por una parte sobre el uso actual de antibióticos y por otra sobre la metodología clásica de antibiogramas.

Tabla 14.- Efecto de distintos antibióticos a diferentes concentraciones sobre las cepas E22, III y 158, sembradas a una densidad de 100.000 bact/pozo.

ANTIBIOTICO	E22						100.000 bact/pozo III						158					
	0.1	0.5	2.4	12	60		0.1	0.5	2.4	12	60		0.1	0.5	2.4	12	60	
FURAZOLIDONA	-	-	-	L	L		-	-	-	i	i		-	-	-	L	L	
OXITETRACICLINA	-	-	L	L	L		-	i	i	L	L		-	i	i	L	L	
CLORANFENICOL	-	-	-	L	L		-	-	i	L	L		-	-	-	L	L	
ERITROMICINA	-	-	-	-	i		-	-	-	-	i		-	-	-	-	L	
AMPICILINA	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-		-	-	-	-	i	
KANAMICINA	-	-	-	-	i		-	-	-	-	i		-	-	-	-	L	
COTRIMOXAZOL	-	-	L	L	L		-	-	i	L	L		-	-	-	L	L	

Tabla 15.- Efecto de distintos antibióticos a diferentes concentraciones sobre las cepas E22, III y 158, sembradas a una densidad de 1'000.000 bact/pozo.

ANTIBIOTICO	E22						1'000.000 bact/pozo						158					
							III											
	0.1	0.5	2.4	12	60		0.1	0.5	2.4	12	60		0.1	0.5	2.4	12	60	
FURAZOLIDONA	-	-	-	i	L		-	-	-	-	L		-	-	L	L	L	
OXITETRACICLINA	-	-	i	L	L		L	L	L	L	L		-	L	L	L	L	
CLORANFENICOL	-	-	-	L	L		-	-	L	L	L		-	-	i	L	L	
ERITROMICINA	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-		-	-	-	-	i	
AMPICILINA	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	
KANAMICINA	-	-	-	-	i		-	-	i	L	L		-	-	-	L	L	
COTRIMOXAZOL	-	-	-	i	i		-	-	i	L	L		-	-	-	-	i	

### 3.3.- ESTUDIO *in vitro* DE LAS INTERACCIONES “PATOGENO/PROBIOTICO”

La probiosis en camaronicultura está ahora en un estadio de concepto, aunque cepas, generalmente no caracterizadas, son utilizadas como probiótico sin demostración fiable de esta característica y, aún más, del mecanismo posible de acción.

Por referencia al conocimiento de la probiosis en otros organismos, es posible considerar: una competición metabólica por los nutrientes en favor de la probiótica; una inhibición de la bacteria patógena por metabolitos de tipo bactericida producidos por la probiótica; una competición espacial a nivel del epitelio del tubo digestivo en favor de la probiótica; una degradación de toxinas producidas por una bacteria patógena por la acción de enzimas de la bacteria probiótica.

Para enfocar esta pregunta y considerando el modelo E<sub>22</sub> e ILL y 158 como cepas respectivamente patógena y probióticas, una serie de experimentos *in vitro* fueron realizados aprovechando la disponibilidad de la prueba inmunológica colony-blot previamente desarrollada para E<sub>22</sub>. En efecto, esta prueba debería permitir reconocer con fiabilidad cada bacteria protagonista en mezclas de bacterias resultado de cultivos mixtos de bacterias patógenas/probióticas, o bien de co-cultivos de bacterias patógena/probiótica con células intestinales de camarón que no pueden obtenerse fácilmente sin bacterias contaminantes. Para este punto es importante señalar la disponibilidad de pruebas con

sondas moleculares específicas de bacterias ILI ( Eduardo Donoso y Lorena San Miguel, comunicación personal ) y 158 ( César Bedoya, comunicación personal ).

Una primera serie de experimentaciones consistió en sembrar mezclas de  $E_{22}$  /ILI o  $E_{22}$  /158 en razones de  $10^6$  a  $10^1$  y en determinar la evolución de estos cocientes después de 4-6 horas de cultivo mixto ( ver materiales y métodos ). Tal experimentación debería permitir observar cambios en las razones correspondientes a una superioridad metabólica de la bacteria probiótica.

Teniendo en cuenta la laboriosidad del colony-blot, la primera experimentación fue realizada tratando de reconocer las dos bacterias utilizadas en función del color de las colonias en TCBS (verde para  $E_{22}$  y amarillo para ILI y 158). Los resultados son presentados en los siguientes gráficos.

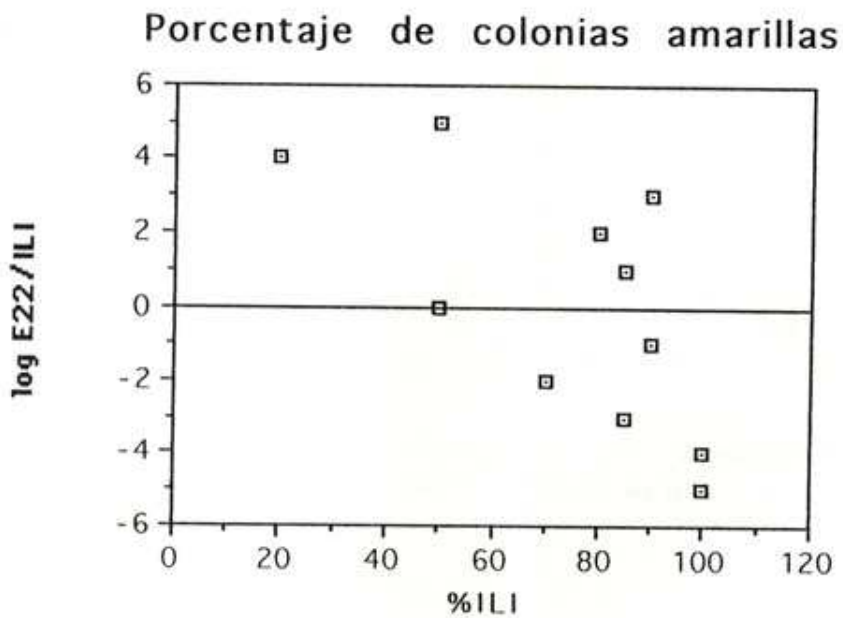
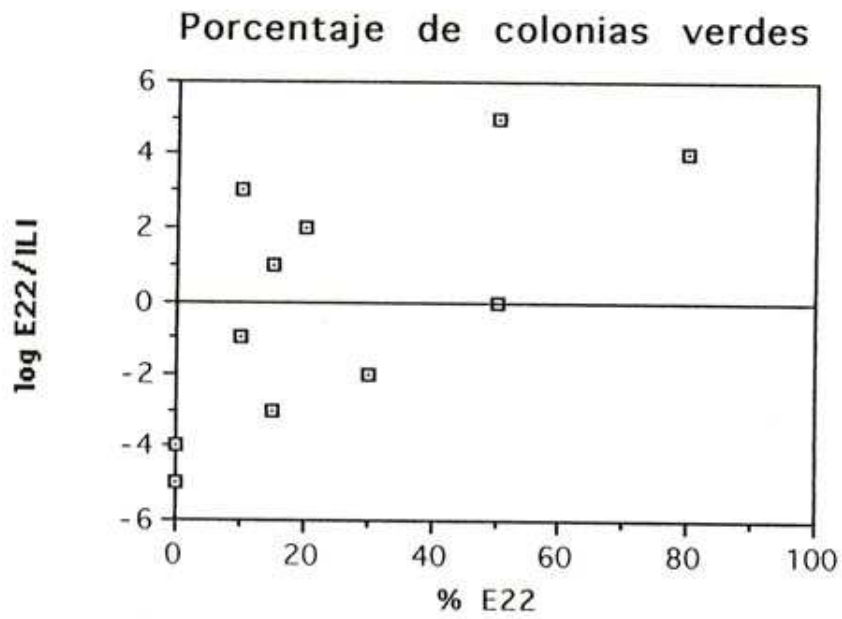


Figura 19.- Porcentajes de las cepas E<sub>22</sub> e ILI, obtenidos de la interacción E<sub>22</sub> / ILI, mediante la observación de colonias verdes y amarillas.



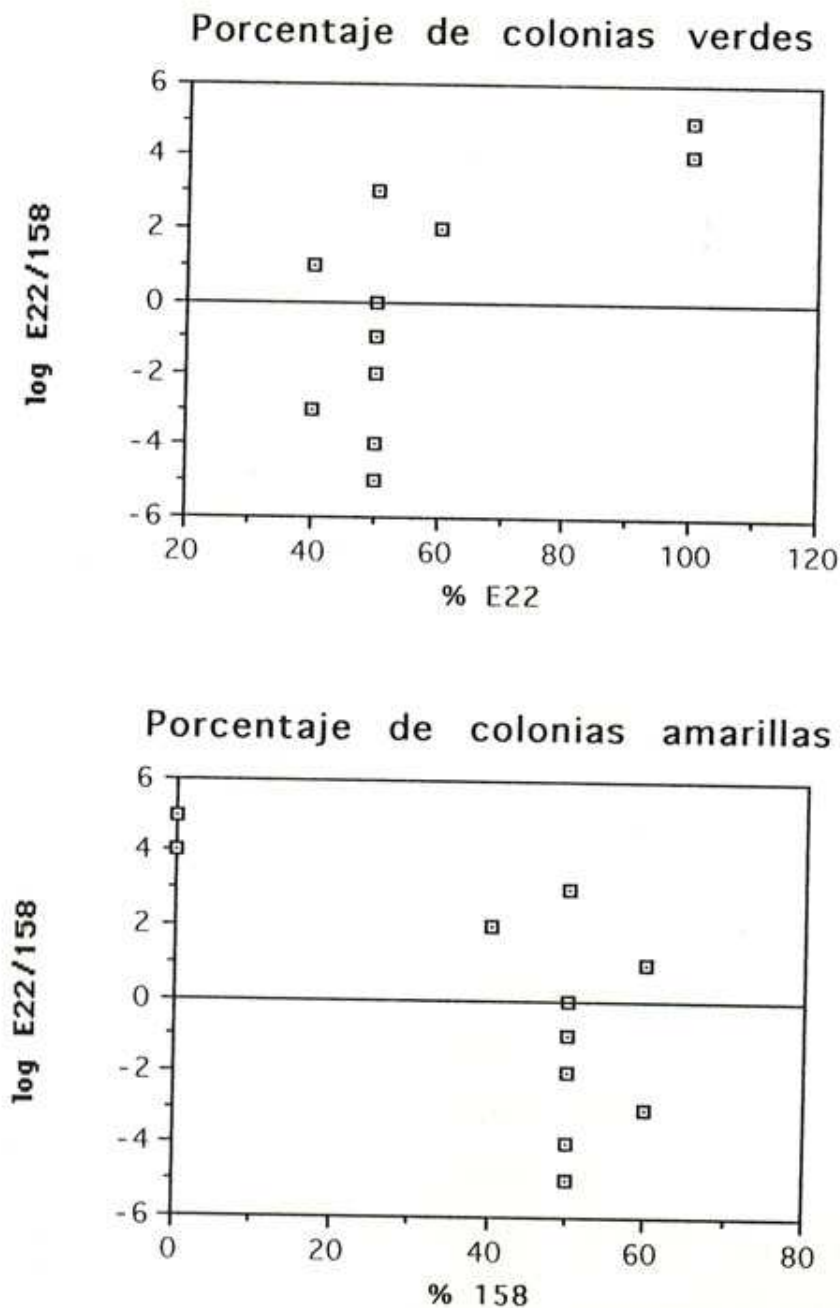


Figura 20.- Porcentajes de las cepas E<sub>22</sub> y 158, obtenidos de la interacción E<sub>22</sub> / 158, mediante la observación de colonias verdes y amarillas.

Con este criterio de identificación ( por el color ) parece que la bacteria probiótica ILI es predominante en las mezclas ( más del 50% de las colonias ) tan solo después de 4 horas siempre que la razón patógeno/probiótico sea inferior a  $10^3$ . También cuando la relación patógeno/probiótico ( E<sub>22</sub> e ILI ) es superior a  $10^3$ , las

colonias bacterianas verdes no representan más que un pequeño porcentaje.

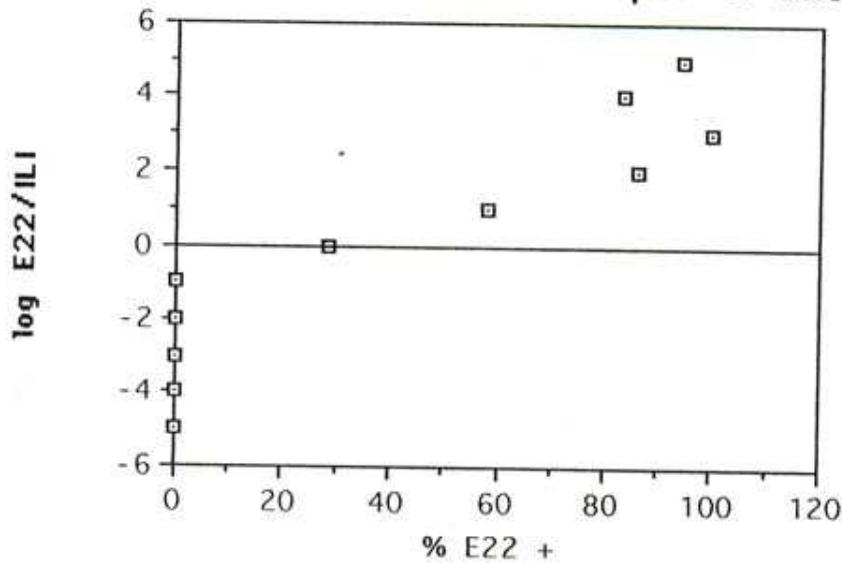
Este tipo de resultados puede corresponder a un artefacto, una parte de las colonias amarillas correspondiendo en realidad a la bacteria E<sub>22</sub>, o a que la bacteria probiótica es capaz de matar muy rápidamente a la bacteria patógena. La hipótesis que consistiría en que la bacteria probiótica superase en crecimiento a la bacteria patógena no tiene soporte porque está establecido previamente que la diferencia de índice de crecimiento es solamente cerca de un 25% en favor de la probiótica. Así, no es posible que una mezcla que contiene inicialmente mil veces más E<sub>22</sub> pueda resultar, después de 4 horas en una mezcla conteniendo mayoritariamente la otra bacteria.

En el caso de la interacción entre E<sub>22</sub> y 158, este efecto no fue tan claro. Solo a razones de 10<sup>5</sup> y 10<sup>4</sup> predominó E<sub>22</sub> y en el resto de los casos se estableció un equilibrio entre ambas bacterias, con recuentos similares, independientemente de las concentraciones iniciales. Esto se podría explicar por la diferencia en las curvas de crecimiento de ambas bacterias, siendo el crecimiento muy inferior en la cepa 158.

Una segunda experimentación similar fue realizada, en este caso analizada con la prueba inmunológica colony-blot, utilizando el anticuerpo monoclonal específico de E<sub>22</sub>. En estas condiciones las colonias positivas son E<sub>22</sub> y las otras corresponden a la bacteria probiótica. La confirmación de esta cuantificación fue realizada en

los cultivos E<sub>22</sub>/ILI con una segunda prueba inmunológica desarrollada por Donoso y San Miguel, utilizando un anticuerpo monoclonal específico de ILI. Los resultados son mostrados en los gráficos siguientes.

Porcentaje de E<sub>22</sub> reconocida por el anticuerpo 2C9



Porcentaje de ILI reconocida por el anticuerpo 2B6

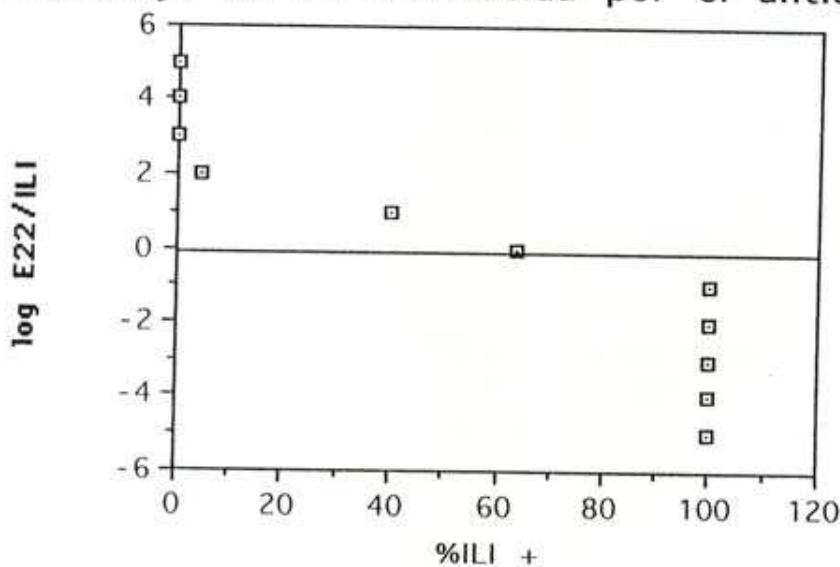
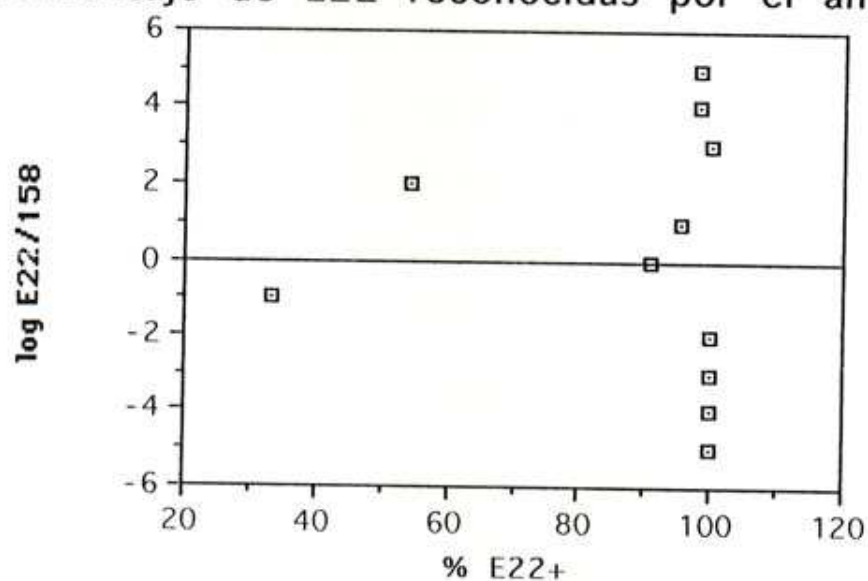


Figura 21.- Porcentajes de las cepas E<sub>22</sub> e ILI, de la interacción E<sub>22</sub> / ILI, reconocidas por los anticuerpos 2C9 y 2B6.

Porcentaje de E22 reconocidas por el anticuerpo 2C9



Porcentaje de la cepa 158 en la muestra

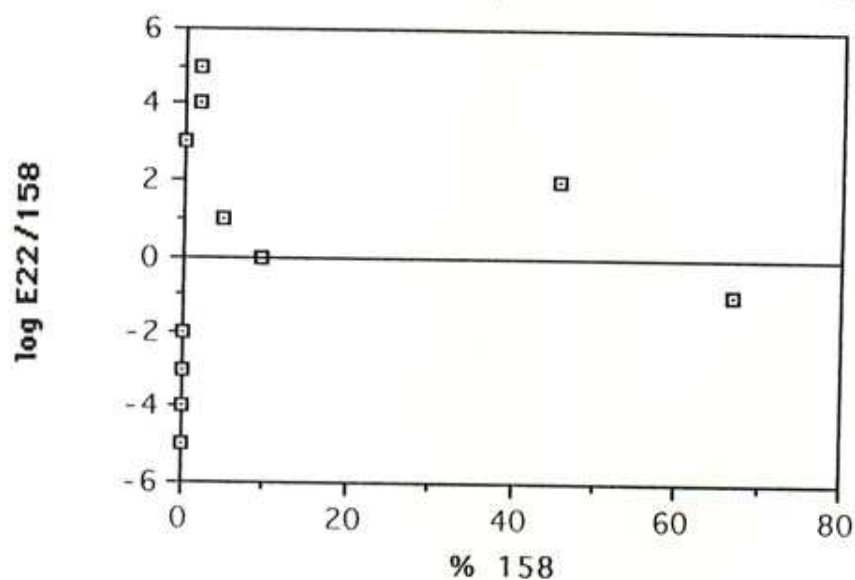


Figura 22.- Porcentajes de la cepa E<sub>22</sub>, de la interacción E<sub>22</sub> / 158, reconocidas por el anticuerpo 2C9 y porcentaje de la presencia de la cepa 158 en la muestra.

Así se estableció que después de 4 horas de cultivo, la evolución de los números iniciales de cada bacteria está solamente relacionada con la diferencia de sus respectivas tasas de crecimiento. En base a estos resultados, parece que las bacterias “probióticas” no pueden matar a la bacteria patógena, sino solamente competir.

## CONCLUSIONES

Este trabajo fue realizado con el objetivo de establecer un modelo simple que permita estudiar a nivel celular y molecular los mecanismos de patogenicidad y de probiosis en bacterias asociadas a camarones. Las cepas fueron seleccionadas sobre la base de datos empíricos y relativamente inciertos en cuanto a su carácter patogénico o probiótico. La cepa E22 fue aislada de larvas de camarón enfermas con síntomas de "bolitas" y fue experimentalmente capaz de reproducir el síndrome. Las cepas IL1 y 158 fueron utilizadas como "probiótico" en un laboratorio de larvas con "éxito relativo".

Un primer trabajo consistió en caracterizar la cepa E22 con técnicas innovadoras a la escala de la bacteriología de camarón. Así, el patrón de restricción del ADN genómico fue determinado y la ausencia de plásmido fue establecida. La reactividad de dos anticuerpos monoclonales, previamente preparados contra otra cepa de *Vibrio harveyi* ( S2 ), fue demostrada y permitió desarrollar una prueba inmunológica de tipo colony-blot. Esta prueba demostró ser una herramienta particularmente poderosa para reconocer específicamente la bacteria E22 en diferentes experimentaciones *in vitro*.

Las experimentaciones *in vitro* que tuvieron como objetivo identificar parámetros o factores de cultivos diferencialmente favorables a las bacterias "probióticas" fueron infructuosas, con excepción del uso de la oxitetraciclina a la concentración de 2.4 ppm

que puede tener un efecto letal sobre la cepa patógena E22 y sólomente inhibidor sobre las cepas "probióticas".

Cabe recalcar, que los antibióticos provienen de diferentes laboratorios y no se tiene conocimiento acerca de la calidad de los mismos y la forma en que eran mantenidos en los respectivos laboratorios.

En lo concerniente a la elaboración de un modelo *in vitro* para estudiar las interacciones entre cepas bacterianas, el presente trabajo constituye una innovación real en el campo de la bacteriología del camarón ya que, ha sido demostrado que es posible analizar con una gran precisión el destino de cada tipo bacteriano en pruebas de interacción. En base a los resultados obtenidos hasta el momento no se puede concluir sobre una capacidad probiótica de las cepas IL1 y 158 contra la cepa E22. Es posible que estas cepas no tengan carácter probiótico, o que el mecanismo de probiosis no corresponda a una interacción directa entre las bacterias.

A corto plazo, el modelo *in vitro* permitirá el análisis de sistemas interactivos más complejos asociando células de camarón/bacteria. Así, con el uso de técnicas complementarias como la microscopía electrónica y la inmunohistología va a ser posible estudiar los mecanismos de fijación de bacterias a las células intestinales, los procesos citopáticos y eventualmente las competiciones bacterianas para colonizar los epitelios celulares. Además, las interacciones de bacterias con el sistema inmunitario se pueden estudiar *in vitro* a nivel molecular ( péptidos antimicrobianos, etc. ) y celular ( hemocitos ).

## RECOMENDACIONES

Profundizar en la caracterización genética de bacterias asociadas a camarón, dirigiendo el trabajo a la identificación de genes implicados en procesos de patogenicidad y probiosis, mediante técnicas de hibridación nucleica.

Utilizar el modelo *in vitro* actualmente desarrollado para investigar el efecto de los parámetros relacionados con la tecnología de larvicultura sobre diferentes tipos de bacterias asociadas a camarón.

Valorizar el modelo *in vitro* para cribar cepas bacterianas posiblemente probióticas, particularmente cepas que produzcan moléculas bactericidas específicas contra cepas patógenas.

Implementar el modelo *in vitro* para estudiar la interacción bacteria/célula intestinal, lo que significa trabajar sobre las técnicas de cultivo de células de camarón y eventualmente la obtención de cultivos axénicos.

Establecer conexiones entre el modelo *in vitro* y el modelo *in vivo* ( ver tesis de Lorena San Miguel ) para determinar la naturaleza patógena o probiótica de bacterias asociadas al camarón.

Establecer estudios que conlleven a la utilización de cepas probióticas en piscinas camaroneras y determinar los efectos que se presentan al eliminar grandes volúmenes de agua con bacterias.



Por último, es importante sugerir que el CENAIM se encargue de comprar los reactivos necesarios para los diferentes tipos de pruebas (ejemplo: antibióticos), ya que así, podremos estar seguros de la calidad de los mismos y evitar problemas de adulteración.

## BIBLIOGRAFIA

1.- **Acuacultura ecuatoriana: un sector para invertir.** En Acuacultura del Ecuador, No. 7. Marzo - Abril 1995. Cámara Nacional de Acuacultura. pp. 8 - 9.

2.- **Austin B., Stuckey L.F., Robertson P.A.W., Effendi I., Griffith D.R.W., 1995.** A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida* , *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* . Short communication in Journal of Fish Diseases, 1995, 18, 93 - 96.

3.- **Barniol R., 1995.** Pasado, presente y futuro de los laboratorios de larvas de camarón en Ecuador. En: Acuacultura del Ecuador, No. 7. Marzo-Abril 1995. Cámara Nacional de Acuacultura. pp. 64 - 65.

\* 4.- **Bell T.A., Lightner D.V., 1991.** Chemotherapy in Aquaculture today current practices in shrimp culture: available treatments and their efficacy. Chemotherapy in Aquaculture: from theory to reality. Symposium, París, 12 - 15 March 1991. pp. 50.

- 5.- **Birboim, 1983, He et al, 1991, Holmes y Quigley, 1981.** Minipreps of plasmid DNA: Alkaline lysis miniprep. En: Short protocols in molecular biology, Second edition. ( Ed ) Frederick M. Ausubel *et al* , 1992. pp. 1-16.
- 6.- **Brock J. A., Lightner D. V., 1990.** Diseases caused by microorganisms. En: Diseases of marine animals. ( Ed. ) Otto Kinne. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburgo, Germany. Vol III, 1990. pp.248, 283, 298, 309, 311, 318.
- 7.- **Departamento de Comercio de los Estados Unidos, 1991.** Los laboratorios de larvas de camarón en el Ecuador. En: Larvicultura en el Ecuador: Guía ecuatoriana de laboratorios de larvas de camarón, 1993. pp. 65 - 66.
- 8.- **Garriques D., Arévalo G., 1994.** An evaluation of the production and use of live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. En: Swimming through troubled water proceedings of the special session on shrimp farming. Papers presented at Aquaculture'95. Febrero 1 - 4 de 1995. San Diego, California. pp. 53 - 59.

**9.- Holt J., Krieg N., Sneath P., Staley J., Williams S.,1994** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth Edition. Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, U.S.A. pp. 190, 192 - 4, 202, 253.

**10.- Kita - Tsukamoto K., Oyaizu H., Namba K., Simidu U.,1993.** Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family Vibrionaceae, determined on the basis of 16S rRNA sequences. Ocean Research Institute, University of Tokyo, Japan. Int J Syet Bacteriol ( abstract ), Jan 1993. pp. 8.

**11.- Lightner D.V., 1984.** A review of the diseases of cultured penaeid shrimps and prawns with emphasis on recent discoveries and developments. Proceedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimps. Iloilo City, Philippines. pp. 79 - 103.

\* **12.- Lightner D.V., 1992.** Shrimp Pathology mayor disease concern to the farming industry in Americas. Memorias del Primer Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, 18 - 23 de Octubre de 1992. Guayaquil, Ecuador. pp. 177 - 195.

**13.- Lightner D.V., 1995.** Vibriosis-culture and identification. En: A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. ( Ed. ) Lightner D.V. Aquaculture'96, febrero de 1996, Bangkok, Tailandia.

**14.- Meighen E.A., 1993.** Bacterial bioluminescence organization, regulation, and application of the lux genes. Department of Biochemistry, McGill University. Montreal, Quebec, Canada. Faseb Journal ( abstract ), August 1993. pp. 1016.

\* **15.- Morales I., 1992.** Observaciones sobre el Síndrome de descamación del epitelio digestivo "Bolitas" en larvas de *Penaeus vannamei* en Ecuador. Memorias del Primer Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. 18 - 23 de octubre de 1992. Guayaquil, Ecuador. pp. 203-207.

**16.- Murray y Thompson, 1980.** Preparation of genomic DNA from bacteria: Miniprep of bacterial genomic DNA. En: Short protocols in molecular biology, Second edition. ( Ed ) Frederick M. Ausubel *et al* , 1992. pp. 2-10.

**17.- Myhr E., Larsen J.L., Lillehaug A., Gudding R., 1991.** Characterization of *Vibrio anguillarum* and closely related species isolated from farmed fish in Norway. National Veterinary Institute. Oslo, Norway. Appl Environ Microbiol ( abstract ), Sep 1991. pp. 2750.

**18.- Prescott L., Harley J., Klein D., 1993.** Microbiology. Second Edition. WCB Publisher. pp. 259 - 284.

**19.- Salyers A., Whitt D., 1994.** Bacterial Pathogenesis: a molecular approach. ASM Press, 1994. pp. 141 - 154.

**20.- Schneider J., Rheinheimer G., 1991.** Isolation methods. En: Methods in Aquatic Bacteriology. ( Ed.) Austin B. John Wiley & Sons Ltd. New York. pp. 73.

**21.- Singleton P., Sainsbury D., 1993.** Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, Second Edition. John Wiley & Sons. pp. 82 - 83.