



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

Evaluación de una cepa bacteriana aislada de enmiendas orgánicas como agente de biocontrol contra *Vibrio vulnificus* en ostras *Crassostrea gigas*

Trabajo de Titulación Previo a la obtención del Título de Magíster En Biociencias Aplicadas con mención en Biodescubrimiento

Presentado por:

Andrea Martha Freire Peñaherrera

Guayaquil – Ecuador

2020

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al programa conjunto de posgrados VLIR NETWORK Ecuador y a la Corporación Ecuatoriana para el Desarrollo de la Investigación y la Academia (CEDIA), por el financiamiento otorgado para llevar a cabo esta investigación.

A la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar (FIMCM-ESPOL) por el uso de sus instalaciones y autorización para la realización de esta tesis de maestría.

Al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM-ESPOL) por su ayuda idónea en proporcionar los animales y agua de mar para las experimentaciones.

Al personal del Laboratorio de Investigaciones Biomédicas y al Laboratorio de Ecotoxicología y Salud ambiental de la ESPOL por su valiosa colaboración facilitando las instalaciones y equipos para preparación de muestras bacterianas.

De manera especial, al Doctor Juan Manuel Cevallos por su fundamental apoyo, académico, científico, profesional y personal. Por su invaluable orientación a las diferentes inquietudes surgidas durante el desarrollo de esta investigación.

A la doctora Johana Ortiz y al comité evaluador por su tiempo y sugerencias acotadas durante las etapas del desarrollo de la investigación.

Al M.Sc Jerry Landívar por su apoyo y gestión brindada para la realización de esta maestría.

A mi familia, mi novio y a todas las personas que me brindaron su apoyo durante este nuevo reto.

DEDICATORIA

A Dios, a mis ángeles por guiarme y darme fortaleza en aquellos momentos de dificultad, brindándome paciencia y sabiduría para culminar con éxito esta meta propuesta.

A mis amados padres Petita Peñaherrera y Augusto Freire, hermanas, por su apoyo incondicional, esfuerzo y sacrificio en todos estos años. Por ser mi ejemplo de perseverancia, optimismo, fortaleza y mi inspiración diaria.

A José Félix Moncayo, por ser mi soporte y brindarme paz. Por su grandeza de fe y refugio en Dios que nos permite caminar en las buenas y en las malas en todo momento.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

**Julia Nieto Wigby, Ph.D.
DECANA**

**Juan Manuel Cevallos, Ph.D.
DIRECTOR DE TESIS**

**Johana Silvana Ortiz Ulloa, Ph.D.
CO- DIRECTOR DE TESIS**

**Ana Tirapé Bajaña, Ph. D.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL 1**

**José Jerry Landívar Zambrano, M. Sc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL 2**

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral

Andrea Martha Freire Peñaherrera

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMEN	1
CAPÍTULO 1	2
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	2
1.1 Antecedentes y Justificación.....	2
1.2 Objetivo General.....	4
1.3 Objetivos Específicos	4
1.4 Marco Teórico.....	4
1.4.1 Características y factores de virulencia del <i>Vibrio vulnificus</i>	4
1.4.2 <i>Vibrio vulnificus</i> - Enfermedad y patogenicidad.....	5
1.4.3 Ostra del Pacífico: <i>Crassostrea gigas</i> e interacciones con <i>V. vulnificus</i>	6
1.4.4 Tratamientos para inhibir al <i>V. vulnificus</i> en ostras	7
CAPÍTULO 2	11
METODOLOGÍA	11
2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	11
2.2 Evaluación antagonista <i>in vitro</i>	12
2.2.1 Confrontación de cepas y metabolitos	12
2.2.2 Actividad antagonista inducida por el co-cultivo de A5 y <i>V. vulnificus</i>	13
2.2.3 Antagonismo debido a compuestos volátiles	14
2.3 Aclimatación de ostras	14
2.4 Condiciones de inoculación artificial de <i>V. vulnificus</i> y A5.....	15
2.5 Ensayo con ostras autoclavadas	16
2.6 Bioensayos con ostras vivas	16
2.7 Análisis microbiológico de ostras vivas	19
2.8 Análisis estadístico	19
CAPÍTULO 3	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
3.1 Confirmación de identificación de bacterias	20
3.2 Pruebas de biocontrol <i>in vitro</i>	20
3.2.1 Actividad antagonista mediante el co-cultivo de las bacterias A5 y <i>V. vulnificus</i>	21

3.2.2	Evaluación de la actividad antibacteriana de los metabolitos volátiles producidos por A5 contra <i>V. vulnificus</i>	21
3.3	Determinación de concentraciones de inoculación artificial de <i>V. vulnificus</i> y A5	21
3.4	Experimento de cocultivo con A5 y <i>V. vulnificus</i> en ostras autoclavadas	23
3.5	Bioensayos con ostras crudas	26
4.	DISCUSIÓN	32
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	35
	BIBLIOGRAFÍA	36
	ANEXOS	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama del proceso de antagonismo debido a compuestos volátiles.....	14
Figura 2. Sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>V. vulnificus</i> a la cepa A5 de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	21
Figura 3. Curva de relación entre densidad óptica y concentración de UFC/mL para <i>V. vulnificus</i>	22
Figura 4. Curva de relación entre densidad óptica y concentración de UFC/mL para A5.....	22
Figura 5. Experimento de co-cultivo de A5 y <i>V. vulnificus</i> en ostras autoclavadas (A) o agua de mar (B)..	25
Figura 6. Niveles bacterianos en ostras (A) y agua de mar (B) del bioensayo 1 (evaluación del potencial de colonización)..	27
Figura 7. Niveles bacterianos en ostras (A) y agua de mar (B) del bioensayo 2 (inoculación con <i>V. vulnificus</i> antes de la inoculación con A5)..	29
Figura 8. Niveles bacterianos en ostras (A) y agua de mar (B) del bioensayo 3 (inoculación con A5 antes de la inoculación con <i>V. vulnificus</i>)..	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización molecular y condiciones de PCR para la confirmación de identidad de aislados bacterianos.....	12
Tabla 2. Experimentos con ostras vivas en agua de mar autoclavada.....	17

ABREVIATURAS

TSA	Agar de Soja Triptico
TCBS	Agar-sales biliares de tiosulfatecitrato-sacarosa
LB	Luria Bertani
NaCl	Cloruro de Sodio
UFC	Unidades formadoras de colonias
C.V	Colonias verdes
C.A	Colonias amarillas
O. D	Densidad óptica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
BLAST	Herramienta básica de búsqueda de alineación local
pb	Pares de bases

RESUMEN

Vibrio vulnificus es una bacteria halófila Gram-negativa, oportunista y altamente adaptable, que se desarrolla naturalmente en aguas marinas o desembocaduras de ríos en todo el mundo. A esta bacteria se le atribuye una mayor tasa de mortalidad con relación al resto de agentes patógenos causantes de enfermedades transmitidas por los alimentos. Es un patógeno humano responsable de la mayoría de las muertes asociadas a la ingesta de mariscos en todo el mundo, particularmente ostras crudas. Las ostras son consideradas como uno de los manjares más apetecidos de la gastronomía a nivel mundial, consumidas por lo general crudas o ligeramente preparadas, lo que representa un gran impacto en la salud pública por el riesgo de infección para el consumidor. Existen numerosos estudios de métodos de depuración de patógenos en estos moluscos, sin embargo, los informes sobre agentes de biocontrol contra *V. vulnificus* son escasos. El control de este patógeno es cada vez más difícil, ya que *V. vulnificus* ha comenzado a desarrollar resistencia contra ciertos antibióticos debido a su uso indiscriminado, por lo que encontrar un biocontrol sería de gran utilidad para futuros tratamientos de depuración previo al consumo de ostras crudas.

En estudios previos realizados en la Escuela Superior Politécnica del Litoral, se han venido evaluando varios tipos de microorganismos benéficos para el control del *V. vulnificus*. De entre las bacterias benéficas evaluadas, la cepa A5 identificada como *Bacillus amyloliquefaciens* produjo una zona de inhibición significativa frente al *V. vulnificus* en pruebas *in vitro*. Sin embargo, ensayos en ostras *Crassostrea gigas* no fueron exitosos.

En la presente tesis, la sensibilidad de *V. vulnificus* a A5 se evaluó primero *in vitro* utilizando medios sólidos, así como ostras autoclavadas. Luego, se evaluó la capacidad de A5 para colonizar ostras vivas y se investigó la eficacia del biocontrol *in vivo* utilizando ostras inoculadas con *V. vulnificus* antes o después de la inoculación con A5, respectivamente. La supervivencia del patógeno en las ostras se evaluó después de 2, 3, 4 y 6 días de exposición a A5 y el patógeno en todos los experimentos. *In vitro*, A5 mostró halos de inhibición de 18 mm contra *V. vulnificus*. En las ostras esterilizadas, A5 causó una reducción significativa en los niveles de *V. vulnificus* en el día 2, pero los recuentos del patógeno se restablecieron desde el día 3 en adelante. *In vivo*, A5 pudo sobrevivir en ostras vivas y evitó la colonización de *V. vulnificus* solo cuando el agente de biocontrol se inoculó antes que el patógeno. Los resultados muestran el potencial de A5 para prevenir la contaminación de las ostras con *V. vulnificus*.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Antecedentes y Justificación

Vibrio vulnificus pertenece a la familia *Vibrionaceae*, identificado en 1979 como un vibrio marino halófilo fermentador de glucosa y lactosa (Baker-Austin et al., 2010; Blake et al., 1979). Es el patógeno alimentario más mortal en los Estados Unidos, responsable de más del 95 % de las muertes relacionadas al consumo de mariscos crudos (M. K. Jones & Oliver, 2009; Oliver, 2015; Pu et al., 2018). Si se ingiere, el patógeno puede causar sepsis primaria e infecciones gastrointestinales con tasas de mortalidad que pueden superar el 50 % de los casos (Cañigral et al., 2010; Cazorla et al., 2011; Daniels, 2011; Horseman & Surani, 2011). Los síntomas de la enfermedad incluyen vómitos, diarrea, dolor abdominal y fiebre que comienzan 24 a 48 horas después de haber consumido ostras contaminadas (Chen et al., 2002; Haq & Dayal, 2005). Otro tipo de infección por *V. vulnificus* ocurre en heridas expuestas al agua de mar contaminada con el patógeno. En este caso, la infección puede progresar a fascitis necrosante con enrojecimiento de la piel y ampollas de sangre pigmentadas con tasas de letalidad estimadas del 25 % (Bross et al., 2007; Dechet et al., 2008; Zetti et al., 2009). El riesgo de infección por *V. vulnificus* es mayor en personas con inmunosistema comprometido, como las personas con enfermedad hepática crónica, alcoholismo, diabetes y hemocromatosis (Barton & Acton, 2009; Bross et al., 2007; Yun & Kim, 2018).

El Centro de Prevención y Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC, por sus siglas en inglés), estima que alrededor de 80.000 personas contraen infecciones por vibrio cada año, incluidas 500 hospitalizaciones y 100 muertes con *Vibrio vulnificus* como el agente causal más frecuente (Araujo et al., 2007; *Burden of Foodborne Illness*, 2018; Oliver, 2015; Scallan et al., 2011).

Las ostras pueden filtrar grandes cantidades de agua de mar durante sus actividades de alimentación, concentrando bacterias marinas como *V. vulnificus* en el cuerpo del molusco. En general, las ostras se comercializan crudas o ligeramente procesadas, con poca o ninguna reducción en los niveles del patógeno antes del consumo humano (Goulas & Kontominas, 2007). De hecho, alrededor del 74 % de las ostras minoristas en los Estados Unidos pueden contener *V. vulnificus* (DePaola et al., 2010). Del mismo modo, se ha informado de la presencia del patógeno en las dos costas de América del

Sur. En la Costa Atlántica del continente, se pueden encontrar varios informes de ostras contaminadas con vibrio en la literatura (Raszl et al., 2016) con Uruguay como el país con el mayor número de infecciones por vibrio de heridas abiertas (Chicheff et al., 2001; Raszl et al., 2016). En la Costa del Pacífico, la ostra *Crassostrea gigas* generalmente se consume cruda y el lavado, el desbaste y otros métodos de depuración comúnmente empleados no son efectivos para eliminar el patógeno de las ostras (B. A. Froelich & Noble, 2014). Por lo tanto, existe la necesidad de tratamientos no térmicos capaces de reducir los niveles de *V. vulnificus* en las ostras crudas.

El control biológico utilizando microorganismos antagonistas se ha convertido en una alternativa prometedora para la inocuidad alimentaria. Los agentes de biocontrol microbiano pueden inhibir o eliminar los patógenos transmitidos por los alimentos mediante mecanismos como competencia por nutrientes, producción de metabolitos antimicrobianos, depredación, entre otros. Los agentes de biocontrol como las bacterias del ácido láctico y los bacteriófagos han sido efectivos contra *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos listos para el consumo (Castellano et al., 2017) y *Campylobacter jejuni* en pollos de engorde (Richards et al., 2019), respectivamente. También se han evaluado microorganismos antagonistas contra *V. vulnificus*. *Phaeobacter inhibens* DSM 17395, que produce el compuesto antibacteriano ácido tropoditéico, inhibió *V. vulnificus* en jugo de ostras autoclavado pero no se observó una reducción significativa en los niveles del patógeno en las ostras vivas (Porsby & Gram, 2016).

Bacillus spp. son uno de los organismos de biocontrol más efectivos y las formulaciones a base de bacillus representan aproximadamente la mitad de los productos de biocontrol bacteriano disponibles comercialmente (Fravel, 2005). Los metabolitos de *Bacillus amyloliquefaciens* han mostrado actividad antilisteria y han sido sugeridos como conservantes de alimentos (Halimi et al., 2010; Hu et al., 2010). Otros patógenos humanos como *Candida albicans* (Song et al., 2013) y *Vibrio spp.* (Xu et al., 2014) también han mostrado una alta sensibilidad a *Bacillus amyloliquefaciens*. Los lipopéptidos producidos por *B. amyloliquefaciens* M1 aislados de manglares mostraron una alta actividad antibacteriana *in vitro* contra patógenos del género *Vibrio*, incluidos *V. harveyi*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. salmonicida*, *Vibrio fischeri*, *V. splendidus*, *V. séptico* y *Vibrio ichthyenteri* (Xu et al., 2014). De manera similar, en un reciente estudio de bioprospección, la cepa A5 de *Bacillus amyloliquefaciens* se destacó entre otras bacterias antagonistas capaces de controlar *V. vulnificus* en varias pruebas *in vitro* (Serrano, 2014). Sin embargo, no se han reportado aplicaciones de *Bacillus amyloliquefaciens* en ostras crudas. De ahí la importancia de evaluar cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* como una alternativa a los antibióticos en la industria acuícola que está en continuo crecimiento debido a la demanda de mariscos para consumo humano. La obtención de un control biológico

contribuiría a la erradicación de vibrios patógenos en mariscos, especialmente ostras crudas, a fin de minimizar las enfermedades causadas por estas bacterias.

1.2 Objetivo General

Evaluar una cepa bacteriana aislada de enmiendas orgánicas *in vitro* e *in vivo* en ejemplares de ostras *Crassostrea gigas* como agente de biocontrol en la inactivación del *Vibrio vulnificus*.

1.3 Objetivos Específicos

- Definir las condiciones de inoculación artificial del patógeno (concentraciones de infección) y del aislado bacteriano A5 de enmiendas orgánicas en *Crassostrea gigas*.
- Demostrar las propiedades antagónicas *in vitro* y en ejemplares de *Crassostrea gigas* de la cepa A5 contra *V. vulnificus*.
- Caracterizar los posibles metabolitos producidos por la cepa A5 con potencial inhibidor de *V. vulnificus*.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Características y factores de virulencia del *Vibrio vulnificus*

Vibrio vulnificus es un bacilo gram negativo curvo y móvil, catalasa y oxidasa positivo. Forma parte de la flora natural de los ambientes marinos costeros de todo el mundo (Kelly, 1982; Lee et al., 2014) y ha sido aislado del agua (Baffone et al., 2006), sedimentos y de mariscos, sobretodo en especies de consumo humano como el camarón, pescado, ostras y almejas (DePaola et al., 1998; Huehn et al., 2014). Puede crecer a temperaturas tan bajas como a 13°C, siendo su hábitat ideal a una temperatura del agua superior a 18 °C con salinidades entre 15 y 25 partes por mil (ppt) (Huehn et al., 2014).

V. vulnificus es genéticamente diverso por un gran número de cepas que se han identificado (Buchrieser et al., 1995); sin embargo, es probable que no todas las cepas de *V. vulnificus* sean patógenas debido a que existe poca información sobre los factores de virulencia específicos e indicadores confiables de su patogenicidad (Johnson et al., 2010). A pesar de aquello, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) determinaron que la virulencia del patógeno parece ser multifacética, por lo que todas las cepas deben considerarse virulentas (World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2005). La mayoría de las cepas no fermentan la

sacarosa, por lo que generan colonias verdes azuladas en agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS Agar), medio selectivo para diferenciación.

V. vulnificus posee y requiere la expresión coordinada de una variedad de factores de virulencia que usa para sobrevivir a la respuesta inmune en sus diversos hospederos, en los que tiene la capacidad de evadir la destrucción en ambientes altamente ácidos, como el estómago humano (M. K. Jones & Oliver, 2009); es decir, para causar una infección humana *V. vulnificus* debe primero sobrevivir al ambiente inhóspito de nuestros cuerpos y superar nuestra respuesta inmunológica. El patógeno, es capaz de lograrlo debido a sus factores de virulencia que mejoran su patogenicidad, como son la expresión del polisacárido capsular que mejora la supervivencia en el huésped humano al proporcionar resistencia a la fagocitosis mediante macrófagos y la producción de una endotoxina lipopolisacárida que se cree que es la causa probable de muerte humana (Gavin et al., 2017; Merkel et al., 2001), la toxina RtxA (Chung et al., 2010); además de sus sistemas de disponibilidad y adquisición de hierro (Kim et al., 2007).

1.4.2 *Vibrio vulnificus* - Enfermedad y patogenicidad

No hay duda de que la infección bacteriana es una amenaza importante para la humanidad (Heng et al., 2017). Entre las principales especies de *Vibrios* patógenos para los humanos se encuentran *V. cholera*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* que causan hasta 80.000 casos de vibriosis, 500 hospitalizaciones y 100 muertes cada año en los Estados Unidos (Morris & Acheson, 2003; Scallan et al., 2011). *Vibrio vulnificus* conlleva la mayor tasa de mortalidad de todos los agentes de enfermedades transmitidos por los alimentos (Hoffmann et al., 2015; Pu et al., 2018) como resultado del consumo de alimentos contaminados, especialmente los mariscos.

Las infecciones en humanos asociadas por *V. vulnificus* se derivan por tres mecanismos de entrada. El primer mecanismo es el consumo de mariscos crudos contaminados que da lugar a septicemias primarias responsable de más del 95 % de muertes, especialmente por la ingestión de ostras crudas que contienen el organismo (10^5 UFC/g) debido a que este patógeno es un colonizador asintomático de bivalvos que se alimentan por filtración (Daniels, 2011). El segundo mecanismo es la exposición de heridas abiertas al agua de mar contaminada que puede progresar a fascitis necrosante como enrojecimiento de la piel en brazos o piernas, con ampollas pigmentadas de sangre (Baker-Austin & Oliver, 2018; M. K. Jones & Oliver, 2009). El tercer mecanismo se manifiesta como una enfermedad gastrointestinal cuyos síntomas incluyen vómitos, diarrea, dolor abdominal, fiebre y escalofríos de 24 a 48 horas después de comer mariscos contaminados (Bross et al., 2007; Horseman & Surani, 2011).

La presencia de *V. vulnificus* en moluscos bivalvos en cualquier concentración tiene el potencial de causar enfermedades. La dosis del patógeno necesario para causar gastroenteritis o septicemia no se conoce, pero se estima que se requieren entre 10^3 y 10^4 UFC/g del patógeno para producir las respectivas enfermedades. Sin embargo, el riesgo de contraer estas infecciones graves, es mayor para las personas con enfermedades inmunosupresoras como la enfermedad hepática crónica, alcoholismo, diabetes y hemocromatosis (Bross, Soch, Morales, & Mitchell, 2007; Jones & Oliver 2009). Por lo tanto, las personas en estos grupos de riesgo deben evitar comer ostras crudas especialmente cuando las temperaturas del agua de mar pueden exceder los 20 °C, y minimizar la exposición de las heridas a aguas estuarinas o marinas más cálidas (Morris & Acheson, 2003).

1.4.3 Ostra del Pacífico: *Crassostrea gigas* e interacciones con *V. vulnificus*

La ostra del Pacífico u ostra japonesa, *Crassostrea gigas*, habitan principalmente en las costas de Japón, China y Corea. Debido a su mayor tasa de crecimiento en relación a otros bivalvos y su adaptabilidad ambiental, el cultivo de la ostra del Pacífico se extendió a otras localidades a nivel mundial como Canadá, Estados Unidos, México, Chile, Argentina, el Reino Unido, Francia, Nueva Zelanda, Australia, Sudáfrica, y América del Sur, principalmente para fines acuícolas (Mckindsey et al., 2009). En Ecuador, *C. gigas* fue introducida por el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) desde Chile en el año 1990, con el objetivo de diversificar la producción acuícola del país (Álvarez et al., 2008). La tasa de crecimiento es muy rápida en buenas condiciones y el tamaño adecuado para la venta se alcanza en 18 a 30 meses (FAO, 2009).

Esta ostra prefiere sustratos de fondo firme donde lleva una existencia sedentaria unida a rocas y escombros de la zona intermareal inferior a profundidades de 40 m. Crecen mejor a temperaturas entre 15 a 18 °C y que pueden filtrar hasta 240 litros de agua por día (FAO, 2005).

Debido a que el sistema de alimentación de *C. gigas* es mediante filtración, su dieta natural consiste principalmente en partículas de materia orgánica e inorgánica, incluido el fitoplancton y bacterias (FAO, 2004). La composición de esta dieta, y específicamente la proporción de sus componentes, depende en gran medida de las condiciones ambientales y aguas estuarinas u oceánicas (Milyutin & Frolov, 1997). Entre las bacterias que pueden concentrar en su organismo, están los vibrios patógenos como *V. vulnificus* que puede acumularse en el tracto intestinal, hemolinfa, músculo aductor, branquias, manto y hemocitos de las ostra en concentraciones de 1 a 2 log por día en el agua, lo que demuestra su capacidad para multiplicarse dentro del bivalvo (B. Froelich & Oliver, 2013b; Staley et al., 2011; Tamplin & Capers, 1992); teniendo un

grave impacto en la salud pública debido a que puede representar un riesgo de infección para el consumidor (Goulas & Kontominas, 2007).

Las ostras *Crassostrea gigas* son bivalvos osmoconformadores, es decir que la concentración osmótica en sus fluidos corporales es igual a la del agua de mar circundante. Sin embargo, los mecanismos fisiológicos utilizados por esta especie para hacer frente al estrés por salinidad requieren un consumo de energía que puede perjudicar otros procesos como la defensa contra los patógenos (Fuhrmann et al., 2018). En los bivalvos marinos, los carbohidratos constituyen una importante reserva de energía (Berthelin et al., 2000) que puede utilizarse para activar la defensa contra patógenos, cuyo principal mecanismo está basado en la fagocitosis de los hemocitos. Sin embargo, la supervivencia de *V. vulnificus* dependerá de las condiciones ambientales y microflora natural de las ostras (Oliver, 2015).

Investigaciones han demostrado que las concentraciones más altas de *V. vulnificus* se han detectado en aguas y en moluscos bivalvos durante el clima más caliente o en los meses cuando la temperatura del agua era ≥ 20 °C, con niveles de 10^5 células de *V. vulnificus* liberadas por hora por ostra (Chae et al., 2009; Tamplin & Capers, 1992). En cambio, los meses con temperaturas frías permiten que las ostras aumenten su actividad de bombeo o depuración causando una disminución en la población de *V. vulnificus* en los tejidos de las ostras (B. Froelich & Oliver, 2013b; Han et al., 2009; Johnson et al., 2010; Pfeffer et al., 2003; Warner & Oliver, 2008).

Debido a la relación entre las temperaturas ambientales cálidas y la presencia de vibrios en el ambiente marino, existe preocupación por los efectos del cambio climático en el calentamiento del océano sobre la distribución y abundancia de *V. vulnificus* (Marques et al., 2010; Vezzulli et al., 2016). Aunque éste patógeno es comúnmente reportado en los EE. UU y en muchos países asiáticos, no deja de existir la probabilidad de que *V. vulnificus* pueda representar a futuro un problema clínico importante y creciente en Sudamérica, debido a que los brotes de infecciones están aumentando y tienden a seguir las tendencias climáticas regionales, generalmente de un clima cálido.

1.4.4 Tratamientos para inhibir al *V. vulnificus* en ostras

Existe una creciente preocupación debido a la tasa de mortalidad significativa de infecciones por *V. vulnificus* asociada sobre todo por la alta demanda a nivel mundial del consumo de ostras crudas contaminadas y porque el tratamiento para contrarrestar a este patógeno es cada vez más difícil, ya que ha comenzado a desarrollar resistencia contra ciertos antibióticos de uso indiscriminado. Se ha detectado que *V. vulnificus* aumenta en las ostras, aun cuando estén fuera del agua si la temperatura es adecuada

(Jones et al., 2016) o cuando las ostras están sometidas a almacenamiento en seco (Kinsey et al., 2015) ya que el patógeno puede sobrevivir 21 días a 5 °C y 12 semanas a -20 °C.

En los últimos 20 años, se han probado varios métodos para el control de *V. vulnificus*, como el uso de antibióticos (Wong et al., 2015), tratamientos con hipoclorito de sodio e irradiación con rayos gamma (Park et al., 2018), bacteriófagos (Lee et al., 2012; Pelon et al., 2005), extractos de algas marinas (Genovese et al., 2012), extractos de curcumina (Na et al., 2011), entre otros. Sin embargo, estas pruebas no han sido lo suficientemente efectivas y han causado resistencia bacteriana (Kim et al., 2011), así como modificaciones en la textura y el sabor de las ostras (Cruz-Romero et al., 2007) y el aumento en los costos de producción. Para que las ostras se traten con un compuesto que se agrega al agua del tanque, la ostra no debe poder detectarla, de lo contrario, cierran sus conchas y dejan de bombear agua. Este es el caso del diacetilo (saborizante químico artificial), que se encuentra en la mantequilla y es capaz de reducir los niveles de *V. vulnificus*, pero no fue eficiente en ostras (Birkenhauer & Oliver, 2003).

Para reducir los números de *Vibrio sp.* en ostras a niveles no detectables (< 30 MPN/g) (Fang et al., 2015), la FDA anunció que durante los meses de aguas cálidas no se podrían servir ostras crudas sin someterse primero procesamientos postcosecha (PHP) a alta presión (Ye et al., 2013) o congelación instantánea. Sin embargo, la respuesta a esta prohibición fue negativa por parte de funcionarios estatales, legisladores locales, la industria de crustáceos e incluso el público debido al aumento en los costos de producción y el reclamo de los consumidores por su derecho de comer lo que elijan, por lo que la FDA suspendió la prohibición un mes después (U.S. Food and Drug Administration, 2009). Cabe recalcar, que las restricciones de cosecha de ostras, aunque son eficaces para reducir las infecciones, no eliminan el problema (B. Froelich & Noble, 2016) y pueden afectar la economía de las empresas relacionadas.

Debido a esto, la industria alimentaria está buscando nuevos métodos de preservación natural no solo para mejorar la vida útil del producto, sino también para garantizar la seguridad microbiológica del consumidor (Goulas & Kontominas, 2007). La búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana producidos por bacterias se está desarrollando como un campo de gran importancia. Un ejemplo son las enmiendas orgánicas resultantes de la fermentación anaerobia de estiércol ricos en micronutrientes, fitohormonas y microorganismos benéficos (Jiménez, 2008) lo que ha ayudado en el mejoramiento de las condiciones físicas, químicas y biológicas del suelo (Solis et al., 2015). La presencia de numerosos microorganismos como especies de Actinomicetes y Bacillus que pueden sintetizar sustancias antibióticas (Orellana et al., 2013) ha permitido que las enmiendas orgánicas tengan una gran acción fungistática y

bacteriostática que les permite ser clasificados como biocontroladores con aplicaciones en la industria de los alimentos. En este contexto, las bacterias del ácido láctico y sus metabolitos ofrecen una alternativa para el desarrollo de alimentos libres de *Listeria monocytogenes*, permitiendo la bioconservación de carne y productos cárnicos listos para comer (Castellano et al., 2017). Además, la aplicación de bacteriófagos como biocontrol para reducir los niveles de *Campylobacter jejuni* en pollos de engorde y minimizar las enfermedades adquiridas por el consumo de productos avícolas contaminados ha sido reportada en la literatura (Richards et al., 2019). De manera similar, los agentes de control biológico como el *Phaeobacter inhibens* DSM 17395, que produce el compuesto antibacteriano, ácido tropoditético, inhibieron a *V. vulnificus* en un sistema modelo de ostras de cocultivo (jugo de ostras). Sin embargo, este biocontrol no redujo significativamente el nivel de *Vibrio vulnificus* en ostras vivas (Porsby & Gram, 2016).

Los productos a base de *Bacillus* representan aproximadamente la mitad de los agentes de control biológico bacteriano disponibles comercialmente (Fravel, 2005). La investigación informa que una proteína (amilolisina) de *Bacillus amyloliquefaciens* tiene actividad antibacteriana y antifúngica y puede usarse como conservante de alimentos (Halimi et al., 2010; Hu et al., 2010). Se ha reportado que esta bacteria inhibe los patógenos humanos, incluyendo *Candida albicans* (Song et al., 2013) y *Vibrio spp.* (Xu et al., 2014). Este último estudio es muy importante, ya que se encontró que los lipopéptidos producidos por *B. amyloliquefaciens* M1 aislados de los sistemas de manglares, tenían una alta actividad de destrucción y un amplio espectro de actividad antibacteriana contra el crecimiento de *Vibrio spp.* (*V. harveyi*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. salmonicida*, *Vibrio fischeri*, *V. splendidus*, *V. septicus* y *Vibrio ichthyenteri*) resistentes a múltiples fármacos.

La importancia de este patógeno no solo se limita a enfermedades humanas. Se sabe que la mayoría de las infecciones bacterianas que causan las mayores pérdidas económicas en el cultivo marino son causadas por la familia Vibrionaceae (Li & Woo, 2003), en la que está presente el *V. vulnificus* (Toranzo et al., 2005). La aplicación de antibióticos sigue siendo el método principal para el control de enfermedades en animales marinos (Burrige et al., 2010; Zhu et al., 2006). Sin embargo, estos productos químicos pueden llegar a los peces y mariscos salvajes. Por lo tanto, existen preocupaciones ambientales con el uso generalizado de antibióticos, ya que puede aumentar el riesgo de aparición y propagación de bacterias resistentes (Burrige et al., 2010) que pueden afectar a animales y humanos, lo que hace que el medicamento sea cada vez más inútil.

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

La cepa A5 de *Bacillus amyloliquefaciens* fue el mismo aislado obtenido y probado en estudios anteriores (Serrano, 2014). La bacteria *V. vulnificus* fue donada por el Centro de Servicios de Acuicultura (CSA) de la ESPOL. Las cepas *V. vulnificus* y A5 se mantuvieron congeladas a -80 °C en Luria Bertani (LB- Invitrogen, EE. UU.) y en caldo de papa dextrosa (PDB - Difco, Sparks, EE. UU.), respectivamente con 15 % de glicerol y 2 % de NaCl (Merck, Darmstadt, Alemania). Para los experimentos, ambas cepas bacterianas se reactivaron en Agar Tripticosa Soja (TSA - Difco, Sparks, EE. UU.) con NaCl al 2 % (Merck, Darmstadt, Alemania). La cepa A5 se incubó a 30 °C y *V. vulnificus* a 35 °C, durante 24 horas (Ramos et al., 2012; Wang et al., 2010).

La identificación de ambas bacterias se confirmó mediante extracción y secuenciación de ADN (D. Wang et al., 2010; Dapeng Wang et al., 2010). En resumen, se seleccionó una colonia de cada bacteria al azar y se suspendió en microtubos cónicos (Axygen, EE. UU.) que contenían 200 µL de tampón de lisis (NaOH 0.05 N, SDS 0.025 % y agua ultrapura), y se calentó durante 10 minutos a 95 °C en un baño de agua (Grant W28, Cambridge, Inglaterra). Los tubos se enfriaron en hielo durante dos minutos y luego se centrifugaron a 10.000 × g durante 10 minutos (Hettich, Alemania). Se transfirió un volumen de 150 µL de los sobrenadantes a microtubos de 1.5 mL que contenían 300 µL de etanol de -30 °C al 95 % y se centrifugó a 10.000 × g durante 5 minutos. Los sobrenadantes se descartaron y el sedimento se resuspendió en 100 µL de etanol congelado al 70 %. Los tubos se centrifugaron a 10.000 × g durante 5 minutos y se descartaron los sobrenadantes. Finalmente, el sedimento con el ADN extraído se suspendió en 50 µL de agua ultrapura (Invitrogen, EE. UU.). La caracterización molecular y las condiciones de PCR de ambas cepas se describen en la tabla 1. Los amplicones obtenidos se secuenciaron en un laboratorio de servicio y los datos se analizaron utilizando el algoritmo NCBI de la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST).

Tabla 1. Caracterización molecular y condiciones de PCR para la confirmación de identidad de aislados bacterianos.

Aislado	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> A5	<i>Vibrio vulnificus</i>
Región amplificada	Gen 16S rRNA	Gen correlacionado con virulencia (<i>vcg</i>)
Secuencia de cebador de PCR (5'→3')	341Fw CCTACGGGAGGCAGC AG 806Rv GGACTACHVGGGTWT CTAAT	P2 CTCAATTGACAATGATCT P3 CGCTTAGGATGATCGGT G
Tamaño del fragmento	466 bp	277 bp
Perfil de ciclo de PCR	Paso inicial: 95 °C por 2 min. 30 ciclos: 95 °C por 30 seg. 45 °C por 30 seg. 72 °C por 2 min. Paso final: 72 °C por 5 min. Almacenamiento: 4 °C	Paso inicial: 94 °C por 3 min. 30 ciclos: 94 °C por 20 seg. 50 °C por 20 seg. 72 °C por 20 seg. Paso final: 72 °C por 7 min. Almacenamiento: 4 °C
Referencias	(Yu et al., 2005)	(Rosche et al., 2005)

2.2 Evaluación antagonista *in vitro*

2.2.1 Confrontación de cepas y metabolitos

El efecto antagonista de A5 y sus metabolitos contra *V. vulnificus* se evaluó utilizando tres medios líquidos de recuperación que incluyen caldo de dextrosa de papa (PDB - Difco, Sparks, EE. UU.), caldo de soja tréptico (TSB - Acumedia Lab, Neogen, EE. UU.) y el caldo Muller Hinton (MHB - Sigma -Aldrich, EE. UU.) con NaCl al 2 % cada uno; y cuatro medios sólidos que incluyen el agar Muller Hinton (MHA - Difco, Sparks, EE. UU.) (Hewitt & Vincent, 1989), el agar tréptico de soja (TSA - Difco, Sparks, EE. UU.), agar papa dextrosa (PDA - Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, EE.

UU.) y agar sangre (BA - Medibac Lab, Ecuador) suplementado con NaCl al 2 % cada uno.

Una colonia de un cultivo A5 recién aislado se suspendió en 10 mL de cada uno de los tres medios líquidos de recuperación. Luego se incubaron las suspensiones a 30 °C durante 5 días (Serrano, 2014) a 110 rpm en un agitador orbital (Thermo Scientific™ MaxQ™ 4000, EE. UU.).

Las pruebas de sensibilidad *in vitro* se llevaron a cabo mediante pruebas de difusión en pozos (López et al., 2005; Serrano, 2014). Brevemente, las placas de Petri con cada uno de los medios sólidos se inocularon con *V. vulnificus* mediante hisopos estériles. Se hicieron tres pocillos de 6 mm de diámetro en los medios inoculados usando un punzón estéril. Se colocaron un total de 50 µL de un cultivo A5 de 5 días de incubación cultivado en los diferentes medios líquidos de recuperación, 50 µL del mismo cultivo A5 previamente esterilizado por filtro usando filtros de jeringa de 0.22 µm, o 50 µL del cultivo A5 esterilizado por filtro en autoclave (Sterilizer SM510, Yamato Scientific, Japan) a 121 °C durante 15 minutos en los pocillos de agar. Las placas se incubaron a 30 °C durante 24 a 48 horas y se midieron los halos de inhibición alrededor de cada pocillo (Serrano, 2014). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

2.2.2 Actividad antagonista inducida por el co-cultivo de A5 y *V. vulnificus*

Se evaluó la producción de metabolitos antimicrobianos por A5 inducido por la presencia del *V. vulnificus*. El método utilizado en este estudio fue modificado de (Puri et al., 2006). Para producir un biocontrol inducido, una colonia fresca de A5 y de *V. vulnificus* fueron coinoculadas en 10 mL de LB y TSB con NaCl al 2 % (Hewitt & Vincent, 1989). Luego se incubaron las suspensiones a 30 °C durante 5 días (Serrano, 2014) en un agitador orbital (Thermo Scientific™ MaxQ™ 4000, EE. UU.) a 110 rpm.

Las pruebas de sensibilidad *in vitro* se llevaron a cabo mediante pruebas de difusión en pozos como se sugirió en informes anteriores (López et al., 2005; Serrano, 2014). Brevemente, las placas de Petri con agar Muller Hinton + 2 % NaCl se inocularon con *V. vulnificus* mediante hisopos estériles. Luego de esto, se hicieron dos pocillos de 6 mm de diámetro en el medio inoculado usando un punzón estéril. Posteriormente, se colocaron en los pocillos, un total de 50 µL del co-cultivo A5 + *V. vulnificus* en LB o TSB previamente filtrados mediante filtros de Nylon estériles de 0.22 µm. Las placas se incubaron a 30 °C durante 24 a 48 horas. Posteriormente, se midieron los halos de inhibición alrededor de cada pozo (Serrano, 2014). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

2.2.3 Antagonismo debido a compuestos volátiles

El método fue modificado de (Chaurasia et al., 2005). El antagonismo debido a compuestos volátiles se evaluó reactivando A5 y *V. vulnificus* en placas de TSA + NaCl al 2 %, las mismas que fueron incubadas a 30 °C y 35 °C respectivamente, durante 24 horas. Posteriormente, nuevas placas Petri con TSA + 2 % NaCl se inocularon con *V. vulnificus* mientras que placas Petri con agar Muller Hinton se inocularon con A5 utilizando hisopos estériles. La boca de cada caja Petri con A5 (sin tapa) se unió a la boca de una caja Petri con el vibrio (sin tapa) y se sellaron juntas con parafilm. Las placas de control se prepararon de manera similar confrontando las placas de *V. vulnificus* contra placas de agar Muller Hinton sin A5 (Figura 1). Todas las placas Petri se incubaron a 33 ± 2 °C, y se observó el crecimiento de cada bacteria a intervalos de 6 horas durante 48 horas. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

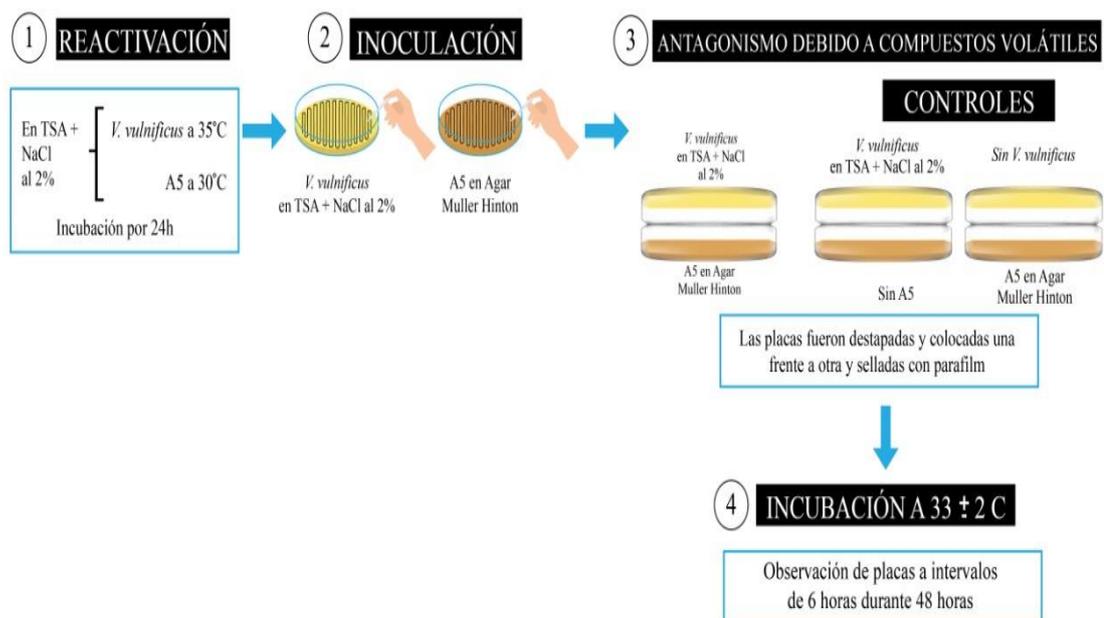


Figura 1. Diagrama del proceso de antagonismo debido a compuestos volátiles.

2.3 Aclimatación de ostras

Se obtuvieron ostras (*Crassostrea gigas*) de 8 cm de longitud anterior-posterior de la playa El Palmar-Santa Elena, Ecuador. Después de la cosecha, los bivalvos se sumergieron en agua de mar microfiltrada y esterilizada con luz ultravioleta a temperatura ambiente durante 72 horas y luego se transportaron al laboratorio.

La aclimatación de las ostras a las condiciones de laboratorio se llevó a cabo como se sugirió en estudios anteriores (Porsby & Gram, 2016; D. Wang et al., 2010; Dapeng Wang et al., 2010). En resumen, las ostras se lavaron con solución salina autoclavada y se colocaron en recipientes con agua de mar ionizada autoclavada con una salinidad de 33.0 ± 1.0 ppt, a razón de 500 mL por ostra. La temperatura promedio fue de 23 ± 2 °C y una aireación constante de 3 L/min (Ramos et al., 2012; D. Wang et al., 2010; Dapeng Wang et al., 2010) se mantuvo durante los 4 días de aclimatación. No hubo mortalidad durante la aclimatación de las ostras.

2.4 Condiciones de inoculación artificial de *V. vulnificus* y A5

El método de inoculación fue modificado de (Dapeng Wang et al., 2010). Se inoculó una colonia de *V. vulnificus* en 100 mL de Luria Bertani (Invitrogen, EE. UU.) con NaCl al 2 % y se incubó a 35 °C durante 24 horas a 110 rpm en un agitador orbital (Thermo Scientific™ MaxQ™ 4000, EE. UU.). La suspensión bacteriana se centrifugó a $4500 \times g$ (Sorvall ST16, Thermo Fisher Scientific, Osterode, Alemania) durante 5 minutos y el pellet se re-suspendió en una solución estéril de NaCl al 2 %.

Para la cepa A5, se inocularon 4 colonias bacterianas en 4 botellas cada una con 100 mL de PDB con NaCl al 2 % y se incubaron a 30 °C durante 24 horas a 110 rpm en un agitador orbital. Para obtener una mayor concentración de A5, los cultivos bacterianos se centrifugaron a $5000 \times g$ durante 7 minutos y los sobrenadantes se descartaron. Los pellets resultantes se re-suspendieron en 300 mL de PDB al 2 % NaCl y se incubaron nuevamente a 30 °C en un agitador orbital a 110 rpm durante 24 horas. Los cultivos se centrifugaron a $5000 \times g$ durante 7 minutos y se descartaron los sobrenadantes. Los 4 pellets se juntaron en un solo tubo cónico y se re-suspendieron con 50 mL de una solución estéril de NaCl al 2 %.

Para los experimentos de inoculación de ostras, la concentración bacteriana se determinó midiendo el OD_{600nm} con un espectrofotómetro BioPhotometer 6131 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Para esto, se prepararon concentraciones bacterianas de A5 y *V. vulnificus* en el rango de 10^2 a 10^9 UFC/mL. Cada suspensión bacteriana se diluyó en serie 10 veces con solución estéril de NaCl al 2 %. Cada dilución (100 µL) se extendió en placa sobre TSA con NaCl al 2% y se incubó a 35 °C para *V. vulnificus* y a 30 °C para A5 durante 24 h. El número de unidades formadoras de colonias (UFC) se contó y se correlacionó con los valores de OD_{600nm} en una curva estándar. El volumen de inoculación del cultivo puro (V_i) requerido para lograr la concentración bacteriana final calculada deseada (FCBC) en un contenedor de ostras se estimó utilizando la ecuación:

$$V_i = V_t \times FCBC / BC_i$$

Donde V_t es el volumen total del agua de mar estéril en el tanque de inoculación con ostras y BC_i es la concentración bacteriana del cultivo puro estimado por el OD_{600nm}

Los niveles de FCBC entre 10^6 y 10^7 para ambas bacterias se probaron inicialmente en ostras y se seleccionaron los mejores niveles de FCBC para todos los experimentos.

2.5 Ensayo con ostras autoclavadas

El objetivo de este experimento fue determinar la capacidad de A5 para crecer en carne de ostras y validar el efecto antagonista de A5 contra *V. vulnificus* en una matriz de ostras. Cuarenta y cinco ostras se envolvieron cada una en papel de aluminio, se colocaron en un recipiente cilíndrico de 2 litros y se esterilizaron en autoclave (Esterilizador SM510, Yamato Scientific, Japón) a 121 °C durante 15 minutos. Se esterilizaron tres recipientes de plástico de 41 x 30 x 28 cm (PICA, Ecuador) con agua hirviendo seguido de un lavado con etanol al 70 %. Luego, se colocaron quince ostras autoclavadas junto con agua de mar estéril a razón de 500 mL por ostra en cada recipiente. En el primer recipiente (tratamiento denominado A5 + Vv), las ostras se inocularon con A5 a un FCBC de 1.0×10^6 UFC/mL y con *V. vulnificus* a un FCBC de 1.0×10^7 UFC/mL. Las ostras del segundo contenedor (tratamiento denominado A5) se inocularon con A5 a un FCBC de 1.0×10^6 UFC/mL, mientras que las ostras del tercer contenedor (tratamiento denominado Vv) se inocularon con *V. vulnificus* a un FCBC de 1.0×10^7 UFC/mL. Los recuentos bacterianos en las ostras y en el agua de cada recipiente se realizaron inmediatamente después de la esterilización en autoclave (antes de la inoculación) y los días 0, 2, 3, 4 y 6 después de la inoculación. Para esto, se retiraron 3 ostras de cada recipiente y se separó aproximadamente un gramo de tejido de ostras de la concha y se trituró en un procesador de alimentos durante 2 minutos con 9 mL de solución de NaCl autoclavada al 2 %. La mezcla se diluyó en serie 10 veces y cada dilución (100 μ L) se extendió sobre tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa (TCBS - Difco, Sparks, EE. UU.) y en TSA + NaCl al 2 %, respectivamente, utilizando espátulas Drigalsky de acero inoxidable. Las placas se incubaron durante 24 h a 30 °C. Se seleccionaron placas que contenían 30 - 300 unidades formadoras de colonias por gramo de ostra (UFC/g) para el recuento de colonias. Los valores informados fueron una desviación promedio y estándar de tres réplicas.

2.6 Bioensayos con ostras vivas

Se realizaron tres bioensayos para determinar la capacidad de colonización de todas las cepas en ostras y para evaluar el efecto de biocontrol de A5 en ostras vivas

inoculadas con *V. vulnificus* antes o después de la inoculación con el agente de biocontrol, respectivamente. La Tabla 2 muestra un resumen de los bioensayos ejecutados. Las ostras se mantuvieron a 23 ± 2 °C con aireación constante de 3 L/ min durante todo el experimento en los tres bioensayos (Ramos et al., 2012; D. Wang et al., 2010; Dapeng Wang et al., 2010).

Tabla 2. Experimentos con ostras vivas en agua de mar autoclavada

Bioensayos	Bioensayo 1*	Bioensayo 2**	Bioensayo 3***
Tratamiento con <i>V. vulnificus</i>	Inoculación a 1.0×10^7 UFC/mL <i>V. vulnificus</i> en los días 0 y 1.	<ol style="list-style-type: none"> Inoculación a 2.0×10^7 UFC/mL <i>V. vulnificus</i> en el día 0 Reemplazo de agua de mar autoclavada en el día 1 	<ol style="list-style-type: none"> No inoculación en el día 0. Reemplazo de agua de mar autoclavada en el día 1. Inoculación a 1.0×10^7 UFC/mL <i>V. vulnificus</i> en los días 1 y 2.
Tratamiento biocontrol	Inoculación a 1.0×10^6 UFC/mL A5 en los días 0 y 1.	<ol style="list-style-type: none"> Inoculación a 2.0×10^7 UFC/mL <i>V. vulnificus</i> en el día 0. Reemplazo de agua de mar autoclavada en el día 1. Inoculación a 1.0×10^6 UFC/mL A5 en los días 1 y 2. 	<ol style="list-style-type: none"> Inoculación a 3.0×10^6 UFC/ml A5 en el día 0 Reemplazo de agua de mar autoclavada en el día 1. Inoculación a 1.0×10^7 UFC/mL <i>V. vulnificus</i> en los días 1 y 2.
Control	Sin inoculación.	<ol style="list-style-type: none"> Sin inoculación Reemplazo de agua de mar autoclavada en el día 1. 	<ol style="list-style-type: none"> Sin inoculación Reemplazo de agua de mar autoclavada en el día 1.

* 15 ostras por contenedor y 500 mL de agua de mar autoclavada por ostra.

** 18 ostras por contenedor y 500 mL de agua de mar autoclavada por ostra.

*** 18 ostras por contenedor y 500 mL de agua de mar autoclavada por ostra.

Para determinar si A5 y *V. vulnificus* fueron capaces de colonizar los tejidos de las ostras vivas (bioensayo 1), se utilizaron tres recipientes de plástico de 41 x 30 x 28

cm (PICA, Ecuador) con 15 ostras más 7.5 L (500 mL / ostra) de agua de mar esterilizada a 33 ± 1.0 ppt de salinidad (Porsby & Gram, 2016).

Las ostras del primer recipiente fueron inoculadas con *V. vulnificus* a FCBC de 1.0×10^7 UFC/mL y re-inoculadas con la misma dosis del vibrio 24 h después de la primera inoculación. Del mismo modo, las ostras del segundo recipiente se inocularon con A5 a un FCBC de 1.0×10^6 UFC/mL y se volvieron a inocular con la misma dosis 24 h después de la primera inoculación. Las ostras del tercer contenedor se mantuvieron en el agua de mar autoclavada como control (Tirapé, 2007; D. Wang et al., 2010; Dapeng Wang et al., 2010). Los recuentos de bacterias en las ostras y el agua de cada contenedor se midieron en TSA y TCBS en los días 0, 2, 3, 4 y 6 del bioensayo exactamente como se describe en la sección de análisis microbiológico a continuación. Las mediciones se realizaron por triplicado.

El efecto antagonista de A5 se evaluó en ostras previamente colonizadas por *V. vulnificus* (bioensayo 2), así como en ostras colonizadas con A5 antes de la inoculación con el vibrio (bioensayo 3). Para el bioensayo 2, se utilizaron tres recipientes con 18 ostras y agua de mar en autoclave a razón de 500 mL/ostra en cada recipiente. Las condiciones del agua de mar fueron idénticas a las del bioensayo 1. Las ostras del contenedor Vv (contenedor inoculado con *V. vulnificus* solamente) y el contenedor Vv + A5 (primero inoculado con *V. vulnificus* y luego con A5) se inocularon en el día cero con *V. vulnificus* a un FCBC de 2.0×10^7 UFC/mL. En el primer día, el agua de los tres recipientes se reemplazó con un volumen idéntico de agua de mar recién esterilizada en autoclave como se sugirió en estudios anteriores (Porsby & Gram, 2016). El recipiente Vv + A5 se inoculó con A5 en un FCBC de 1.0×10^6 UFC/mL inmediatamente después del reemplazo de agua y se volvió a inocular con la misma dosis de A5 el día 2. Las ostras del tercer recipiente se mantuvieron en el agua de mar autoclavada como un control (Tirapé, 2007; D. Wang et al., 2010; Dapeng Wang et al., 2010). Los recuentos de bacterias en las ostras y en el agua de los recipientes se midieron los días 0, 1, 2, 3, 4 y 6 del bioensayo utilizando TSA y TCBS como se describe en la sección de análisis microbiológico a continuación.

Para el bioensayo 3, se utilizaron tres recipientes con 18 ostras cada uno más agua de mar esterilizada en autoclave a razón de 500 mL / ostra. El recipiente A5 + Vv (primero inoculado con A5 y luego con *V. vulnificus*) se inoculó con A5 a un FCBC de 3.0×10^6 UFC/mL en el día cero. El primer día, el agua de todos los recipientes se reemplazó con agua de mar recién esterilizada en autoclave, manteniendo la proporción de 500 mL/ ostra. Luego, las ostras del Vv (contenedor inoculado con *V. vulnificus* solamente) y los contenedores A5 + Vv se inocularon con *V. vulnificus* a un FCBC de 1.0×10^7 UFC /mL en los días 1 y 2. Las ostras del tercer contenedor se

mantuvieron en el agua de mar autoclavada como control (Tirapé, 2007; D. Wang et al., 2010; Dapeng Wang et al., 2010). Los recuentos de bacterias en las ostras y en el agua se realizó en los días 0, 1, 2, 3, 4 y 6 de los bioensayos utilizando TSA y TCBS como se describe en la sección a continuación. Este bioensayo se repitió en su totalidad en las mismas condiciones, pero en distintos tiempos para comprobar su reproducibilidad.

Los valores informados de los tres bioensayos fueron una desviación promedio y estándar de tres réplicas.

2.7 Análisis microbiológico de ostras vivas

Los análisis microbiológicos siguieron las pautas del Manual de Bacteriología Analítica de la FDA (Kaysner & Angelo DePaola, 2004). Brevemente, las ostras se recogieron al azar para su análisis en cada momento seleccionado. Cada ostra se desvainó con un cuchillo estéril y se separó del caparazón (Phuvasate et al., 2012). Se homogeneizó un gramo de ostras desvainadas con 9 mL de solución de NaCl autoclavada al 2 % a alta velocidad durante 1 minuto usando una licuadora de tres velocidades (Oster Blender 4655, EE. UU.). Las ostras homogeneizadas se diluyeron en serie usando una solución de NaCl al 2 % y se colocaron en placas sobre TCBS y TSA + NaCl al 2 %. Las placas fueron incubadas a 35 °C y 30 °C durante 24 horas para el crecimiento de *V. vulnificus* y A5, respectivamente. Las colonias amarillas y verdes en los medios TCBS se consideraron como recuentos de vibrios totales y *Vibrio vulnificus*, respectivamente (Cerdà-Cuéllar et al., 2000; West et al., 1982) mientras que las colonias en TSA se consideraron como recuentos de aerobios totales.

2.8 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los ensayos *in vitro* se sometieron a prueba t para determinar diferencias significativas entre los tratamientos con un nivel de significancia de 0.05. Los recuentos bacterianos de los experimentos con ostras vivas y autoclavadas se transformaron a valores logarítmicos de UFC/g o UFC/mL, seguido de las pruebas t de Student. Todas las pruebas estadísticas se llevaron a cabo utilizando la función t-test de Microsoft Excel.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Confirmación de identificación de bacterias

La secuencia de la región 16s del ADN de la cepa A5 compartió un 99 % de similitud con el número de acceso KJ603234.1 de *Bacillus amyloliquefaciens*, mientras que la secuencia de la cepa de vibrio compartió un 98 % de similitud con el número de acceso AY626584.1 de *V. vulnificus* de la base de datos GenBank.

3.2 Pruebas de biocontrol *in vitro*

La cepa A5 fue capaz de inhibir el crecimiento de *V. vulnificus in vitro*. La inhibición más alta ($p < 0.05$) se observó cuando se utilizó PDB + NaCl al 2 % o caldo Muller Hinton + NaCl al 2 % como medio líquido de recuperación en agar Muller Hinton + NaCl al 2 % como medio sólido, produciendo halos de inhibición promedio de 18 mm y 17 mm, respectivamente (Figura 2), mientras que TSA y agar sangre + NaCl al 2 % produjeron halos de inhibición promedio más bajos de 11 y 9 mm, respectivamente. Cuando se recuperó A5 en TSB + NaCl al 2 %, se obtuvieron halos de inhibición de 13 mm de diámetro en placas de Petri con agar Muller Hinton + NaCl al 2 %, mientras que fueron observados halos de inhibición de 4.5 mm en TSA + NaCl al 2 % y 8.6 mm en agar sangre + 2 % NaCl. Las placas con PDA + NaCl al 2 % no soportaron el crecimiento de *Vibrio vulnificus*. Del mismo modo, cuando se recuperó A5 en caldo Muller Hinton + NaCl al 2 %, se observó un halo de inhibición de 17 mm en agar Muller Hinton + NaCl al 2 % sin inhibición observada en el resto de los medios sólidos probados. Los resultados de las pruebas de antagonismo se midieron después de 24 y 48 horas, pero no se observaron diferencias significativas entre los dos períodos de incubación.

No se visualizaron halos de inhibición cuando se probaron los sobrenadantes esterilizados por filtración o en autoclave.

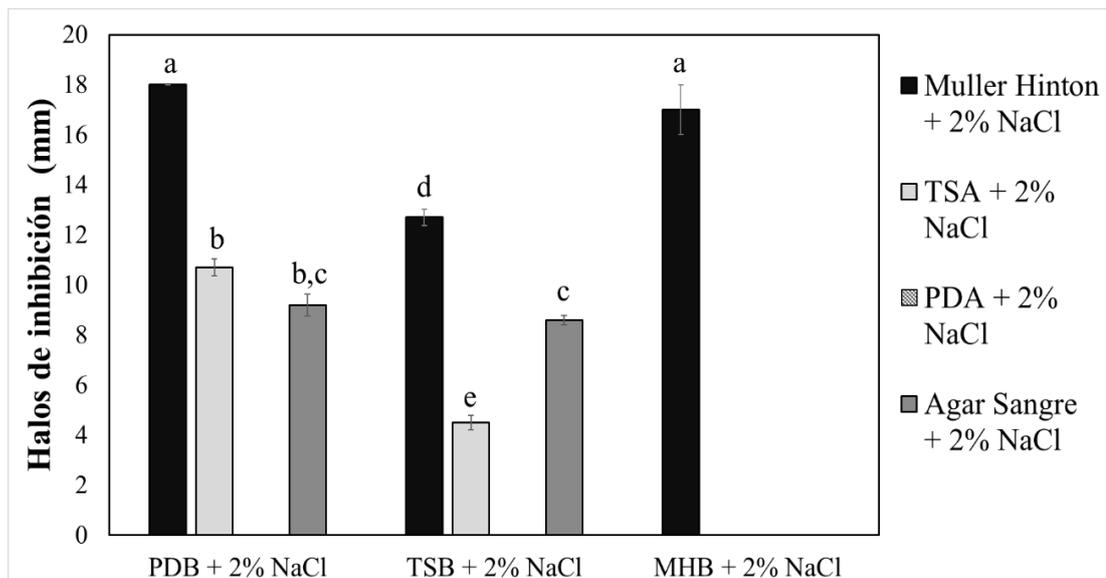


Figura 2. Sensibilidad *in vitro* de *V. vulnificus* a la cepa A5 de *Bacillus amyloliquefaciens*. Las columnas corresponden a los promedio y error estándar de 3 réplicas. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($P > 0.05$).

3.2.1 Actividad antagonista mediante el co-cultivo de las bacterias A5 y *V. vulnificus*

En este caso, al realizar un biocontrol inducido en el que A5 y *V. vulnificus* se cultivaron conjuntamente en los medios líquidos de recuperación, no se visualizaron los halos de inhibición alrededor de cada pocillo de agar.

3.2.2 Evaluación de la actividad antibacteriana de los metabolitos volátiles producidos por A5 contra *V. vulnificus*

Los resultados mostraron que después de 48 de incubación, los compuestos volátiles de A5 no inhibieron el crecimiento de *V. vulnificus*.

3.3 Determinación de concentraciones de inoculación artificial de *V. vulnificus* y A5

Para determinar las concentraciones de inoculación artificial, se basó en la correlación entre la concentración bacteriana en UFC/mL y absorbancia (densidad óptica) mediante las curvas de relación para *V. vulnificus* (Figura 3) y A5 (Figura 4), luego de haber realizado las lecturas en el espectrofotómetro de los cultivos bacterianos y la siembra subsecuente en placas con TSA + NaCl al 2 %.

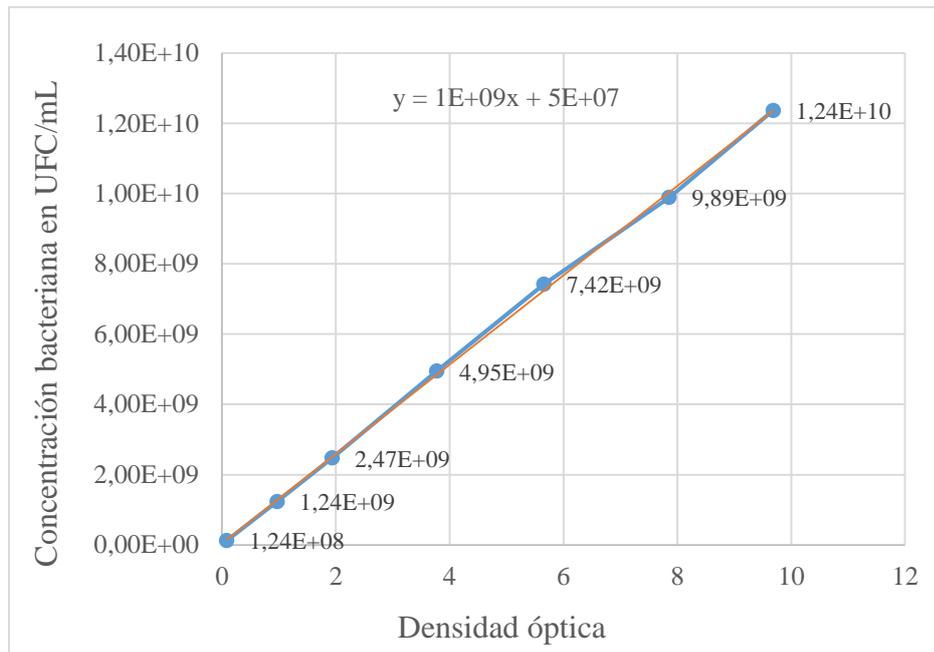


Figura 3. Curva de relación entre densidad óptica y concentración de UFC/mL para *V. vulnificus*. Relación entre la densidad óptica y el conteo de UFC de *V. vulnificus* sembradas en placas con Agar de soja tríptica + NaCl al 2 %.

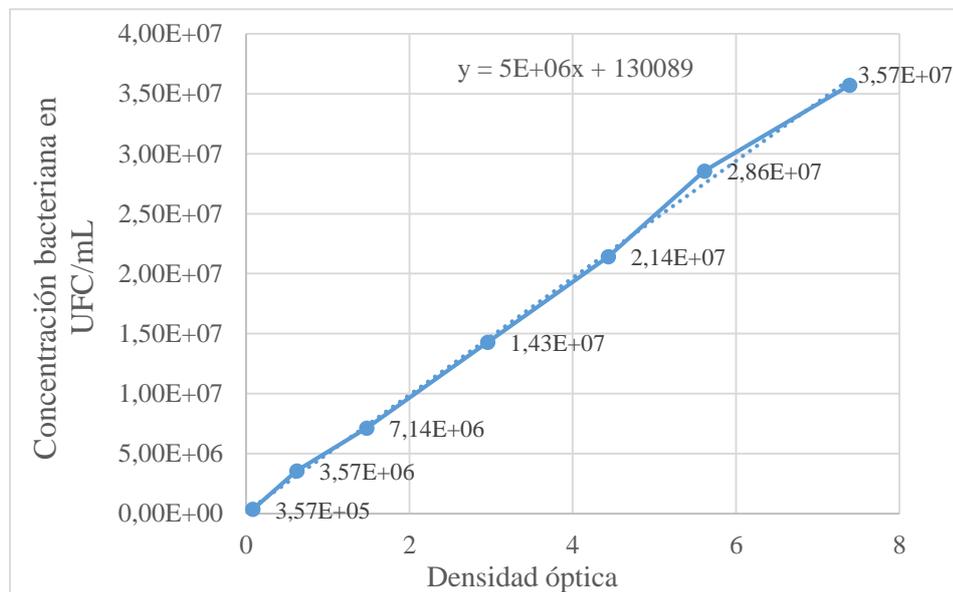


Figura 4. Curva de relación entre densidad óptica y concentración de UFC/mL para A5. Relación entre la densidad óptica y el conteo de colonias (UFC) del cultivo bacteriano A5 sembradas en placas con Agar de soja tríptica + NaCl al 2 %.

3.4 Experimento de cocultivo con A5 y *V. vulnificus* en ostras autoclavadas

Los experimentos preliminares usando diferentes concentraciones de inóculo de *V. vulnificus* mostraron que la recuperación del vibrio fue insignificante cuando las ostras se inocularon en un FCBC por debajo de 10^7 UFC /mL. Sin embargo, cuando se usaba A5, los FCBC máximos obtenidos eran 10^6 UFC /mL. Por lo tanto, se utilizaron FCBC de 10^6 UFC/mL y superiores a 10^7 UFC/mL para la inoculación de A5 y *V. vulnificus*, respectivamente, en todos los experimentos.

Tanto A5 como *V. vulnificus* pudieron crecer en ostras autoclavadas. El día 0, antes de la inoculación con las cepas bacterianas, no se detectaron UFC en las ostras ni en las muestras de agua de mar autoclavada. Los recuentos totales de TSA en el día 2 fueron 1.20×10^7 (log 7.07) UFC/g para el contenedor A5, 8.23×10^7 (log 7.82) UFC/ g para el contenedor Vv y 1.94×10^7 (log 6.73) UFC/g para el contenedor A5 + Vv. De manera similar, en el día 6 los niveles bacterianos aumentaron a 1.67×10^8 (log 8.18) UFC/g y 1.79×10^8 (log 8.09) UFC/g en los contenedores A5 y A5 + Vv respectivamente, mientras que los niveles en el contenedor Vv permanecieron en el orden de 5.70×10^7 (log 7.62) UFC /g. Sin embargo, las diferencias en los niveles bacterianos de TSA no fueron significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos en ningún punto de muestreo (Figura 5A). En TCBS, 1.56×10^5 (log 5.14) UFC /g de *V. vulnificus* detectado en el contenedor A5 + Vv en el día 2 fue significativamente menor ($p < 0.05$) que 7.09×10^5 (log 5.81) UFC/g observado en contenedor Vv. Sin embargo, durante los días 3, 4 y 6, la presencia de *V. vulnificus* aumentó en el contenedor A5 + Vv alrededor de 8.28×10^5 (log 5.72) UFC/g, mientras que permaneció a 10^6 UFC/g en el contenedor Vv, pero las diferencias entre ambos contenedores no fueron significativas. La presencia de *V. vulnificus* no se detectó en el contenedor A5 durante todo el experimento (Figura 5A) pero el crecimiento de colonias amarillas en medio TCBS a 1.42×10^5 (log 5.14) UFC/g en el día 2 y 1.21×10^7 (log 7.02) UFC/g en el día 6 se observó en el contenedor A5 (Figura 5A).

En las muestras de agua, los recuentos totales de TSA en el contenedor A5 fueron 6.60×10^7 (log 7.82) UFC/mL en el día 2, mientras que los contenedores Vv y A5 + Vv mostraron conteos de 1.80×10^5 (log 5.25) UFC / mL y 3.70×10^6 (log 6,57) UFC / mL, respectivamente. De manera similar, en el día 6 los recuentos fueron 1.20×10^8 (log 8.08) UFC /mL y 5.40×10^8 (log 8.73) UFC / mL en los contenedores A5 y A5 + Vv, respectivamente (Figura 5B). Los recuentos totales de TCBS para los tres tratamientos fueron similares, ya que todos los recuentos comenzaron a 10^4 UFC / mL en el día 2, alcanzando 10^6 UFC / mL en el día 6 (Figura 5B). En los días 2 y 3, la concentración de *V. vulnificus* en el contenedor A5 + Vv fue de alrededor de 1.52×10^4 (log 4.18) UFC / mL y 2.40×10^4 (log 4.38) UFC / mL respectivamente, aumentando a 1.26×10^6 (log 6.10) UFC /mL en el día 4, y permaneció alrededor de 1.10×10^6 (log 6.04) UFC

/ mL en el día 6; mientras que en el contenedor Vv la concentración fue de 2.22×10^4 (log 4.35) UFC /mL en el día 2 aumentando a 1.60×10^5 (log 5.20) UFC /mL en el día 3 mientras permaneció en alrededor de 1.50×10^6 (log 6.18) UFC/mL y 1.20×10^6 (log 6.08) UFC/mL en los días 4 y 6, respectivamente. *V. vulnificus* no se detectó en el contenedor A5 durante todo el experimento (Figura 5B).

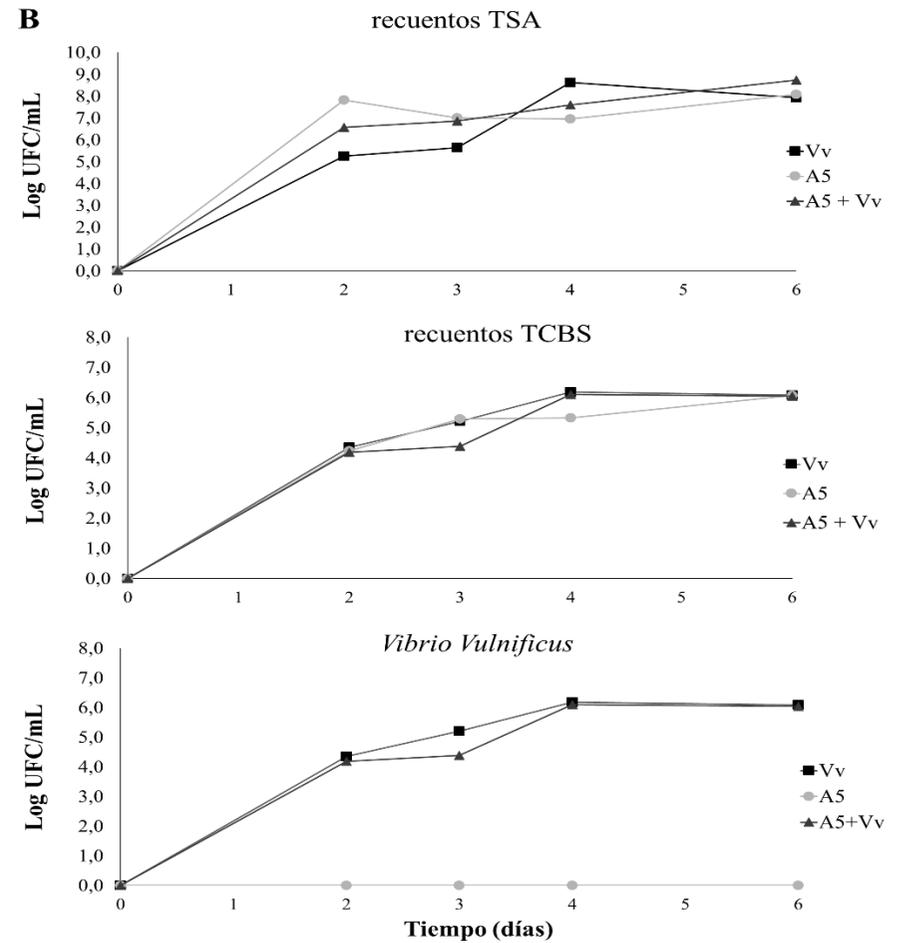
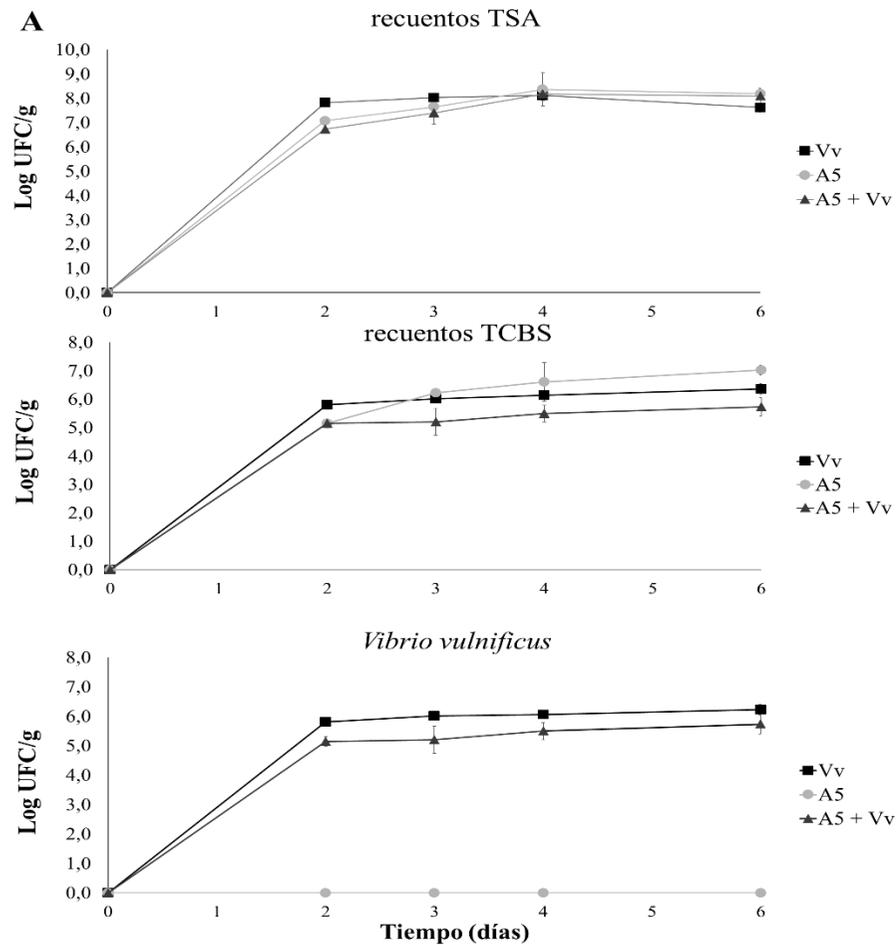


Figura 5. Experimento de co-cultivo de A5 y *V. vulnificus* en ostras autoclavadas (A) o agua de mar (B). Se analizaron 3 tratamientos: el contenedor Vv inoculado solo con *Vibrio vulnificus* (■), el contenedor A5 inoculado solo con A5 (●), el contenedor A5 + Vv co-inoculado con A5 y *V. vulnificus* (▲).

3.5 Bioensayos con ostras crudas

Los resultados del bioensayo 1 mostraron que la inoculación con A5 no causó cambios significativos en los recuentos totales de TSA de las ostras ya que los niveles bacterianos fueron similares a los de las ostras control durante todo el experimento. Sin embargo, la adición de *V. vulnificus* produjo recuentos de TSA significativamente más bajos desde el día 4 en adelante en comparación con las ostras de control (Figura 6A). En el contenedor A5, los recuentos totales de TCBS fueron 1.09×10^4 (log 3.99) UFC/g en el día 2, aumentando significativamente a 1.81×10^4 (log 4.23) UFC/g en el día 3 en comparación con las ostras de control ($p < 0.05$), disminuyendo a 6.73×10^3 (log 3.71) UFC/g en el día 6. En el contenedor Vv, los recuentos totales de TCBS fueron de 1.26×10^5 (log 5.10) UFC/g en el día 2 (después de la inoculación con *V. vulnificus*), disminuyendo a 6.00×10^2 (log 2.59) UFC/g en el día 6. No se observaron colonias amarillas en las ostras desde el día 2 hasta el día 6 del bioensayo (Figura 6A). En el contenedor Vv, la carga de *V. vulnificus* alcanzó 1.26×10^5 (log 5.10) UFC/g en el día 2 pero disminuyó significativamente a 6.00×10^2 (log 2.59) UFC/g en el día 6 del experimento (Figura 6A). No se observaron colonias verdes en ostras en los contenedores A5 y control durante todo el experimento.

Los datos del análisis de agua mostraron que los recuentos de TSA en los contenedores Vv y A5 fueron 1.00×10^2 (log 2.00) UFC/mL en el día 0, aumentando en los días siguientes después de la inoculación hasta alcanzar 1.00×10^3 (log 3.00) UFC/mL en el día 6 para ambos tratamientos (Figura 6B). Los recuentos totales de TCBS en los contenedores Vv y A5 fueron de 1.00×10^1 (log 1.00) UFC/mL en el día 0. En el día 6, el contenedor A5 fue de 2.60×10^2 (log 2.41) UFC/mL; mientras que en el contenedor Vv fue de 4.00×10^1 (log 1.60) UFC/mL (Figura 6B). En el contenedor Vv, la concentración de colonias verdes en el día 2 fue 1.23×10^4 (log 4.09) UFC/mL, pero los recuentos disminuyeron a 4.00×10^1 (log 1.60) UFC/mL en el día 6. No se observaron colonias verdes en el contenedor A5 (Figura 6B).

En los contenedores de control de los bioensayos 2 y 3, los recuentos totales de TSA de ostras se mantuvieron en el rango entre 8.33×10^3 (log 3.45) UFC/g y 2.52×10^6 (log 6.36) UFC/g para todos los experimentos, mientras que las colonias amarillas de TCBS estuvieron entre 1.00×10^2 (log 2.00) UFC/g y 3.93×10^3 (log 3.43) UFC/g. En el agua de los contenedores de control, los recuentos totales de TSA estuvieron entre 1.0×10^2 (log 2.00) UFC/mL y 4.50×10^3 (log 3.65) UFC/mL mientras que las colonias amarillas de TCBS permanecieron entre 1.0×10^1 (log 1.00) UFC/mL y 1.70×10^2 (log 2.23) UFC/mL en todos los experimentos. No se detectaron colonias verdes tanto en las ostras como en el agua de los contenedores de control durante todo el experimento en los tres bioensayos. Por lo tanto, estos datos no se representaron en las figuras.

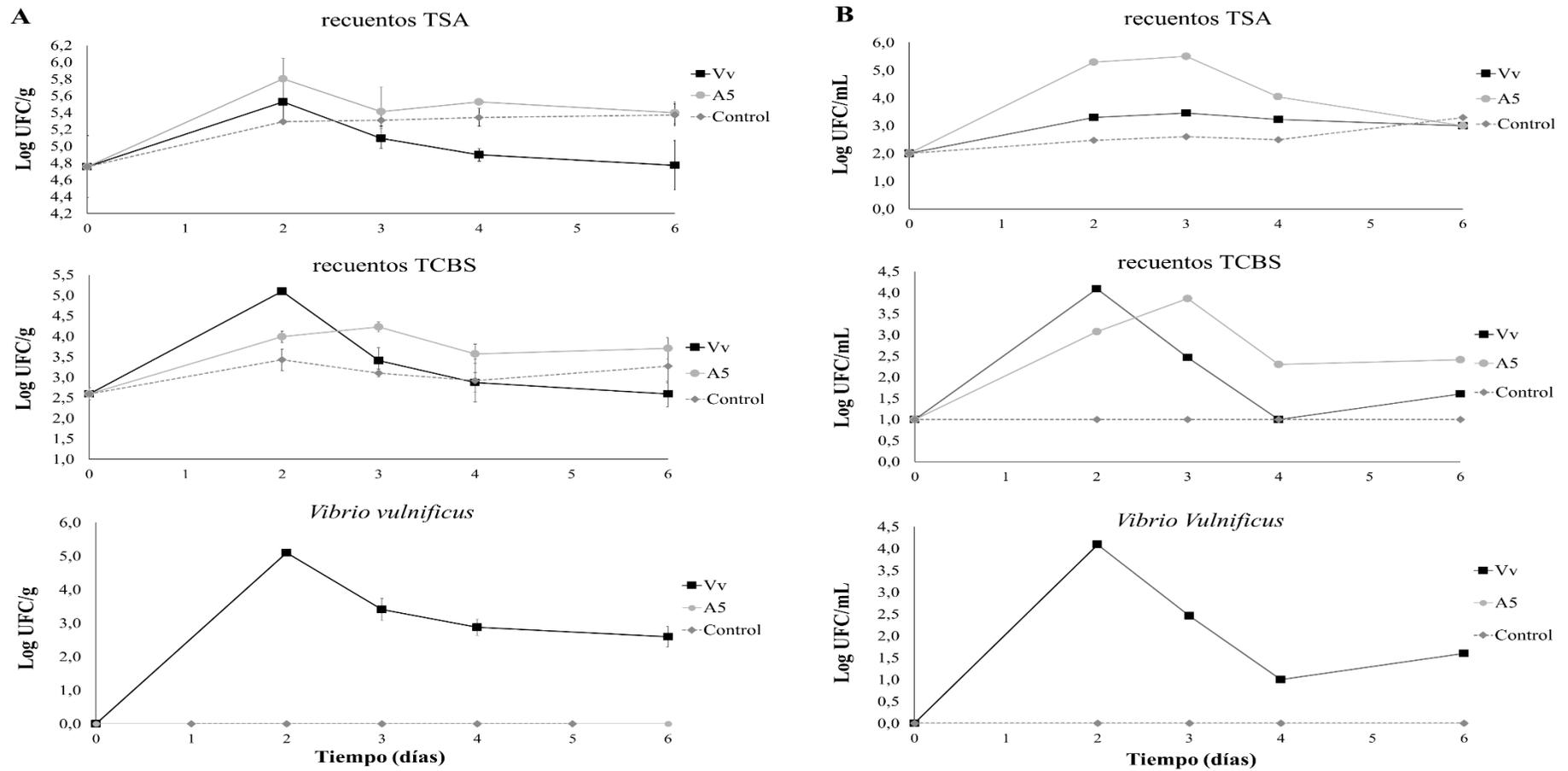


Figura 6. Niveles bacterianos en ostras (A) y agua de mar (B) del bioensayo 1 (evaluación del potencial de colonización). Se muestran tres tratamientos: el contenedor Vv inoculado con *V. vulnificus* solamente (■), el contenedor A5 inoculado con A5 solamente (●) y el contenedor de control (◆ línea punteada).

Los resultados del bioensayo 2 mostraron que los recuentos totales de TSA en ostras del contenedor Vv + A5 aumentaron significativamente de 1.17×10^4 (log 3.98) UFC /g a 3.77×10^5 (log 5.57) UFC /g durante los primeros dos días del experimento, pero luego disminuyó a niveles finales de 7.17×10^4 (log 4.80) UFC/g. Los recuentos de TSA fueron significativamente más altos en el contenedor Vv + A5 en comparación con el contenedor Vv en los días 2, 3 y 4, pero no se observaron diferencias significativas en los días 0, 1 y 6. En el contenedor Vv, los recuentos totales de TSA fueron de 4.00×10^4 (log 4.57) UFC/g el día 1 (24 horas después de la inoculación con *V. vulnificus*), manteniendo recuentos similares durante los 6 días del experimento (Figura 7A). Los recuentos totales de TCBS en las ostras de los contenedores Vv y Vv + A5 fueron de 2.33×10^2 (log 2.30) UFC /g en el día 0 (antes de las inoculaciones) mientras que en el día 1 (después de la inoculación con *V. vulnificus*) aumentó a 3.15×10^4 (log 4.43) UFC /g y 1.18×10^4 (log 3.91) UFC /g respectivamente, con solo colonias verdes detectadas. Desde el día 3 en adelante, las ostras en el contenedor Vv + A5 mostraron niveles significativamente más altos ($p < 0.05$) de los recuentos totales de TCBS que el contenedor Vv y en el día 6, en el contenedor Vv permanecieron alrededor de 8.67×10^2 (log 2.80) UFC/g mientras que el contenedor Vv + A5 contenía 5.13×10^3 (log 3.69) UFC/g (Figura 7A). De manera similar, los niveles de *V. vulnificus* en los contenedores Vv y Vv + A5 fueron 3.15×10^4 (log 4.43) y 1.18×10^4 (log 3.91) UFC/g en el día 1, respectivamente, pero disminuyeron a 3.28×10^2 UFC /g (log 2.49) y 6.67×10^1 (log 1.33) UFC/g en cada contenedor, respectivamente en el día 6 (Figura 7A). No se observaron diferencias significativas en el número de colonias verdes al comparar los contenedores Vv y Vv + A5.

En el agua, el comportamiento del recuento total de TSA fue similar al observado en las ostras. El contenedor Vv + A5 mantuvo recuentos de TSA de 5.19×10^4 (log 4.72) UFC /mL en el día 2 y 1.10×10^4 (log 4.04) UFC/mL en el día 6. En contraste, el contenedor Vv mostró conteos de TSA más bajos de 1.00×10^2 (log 2.00) UFC/mL en el día 2 y 8.10×10^2 (log 2.91) UFC /mL en el día 6 (Figura 7B). Los recuentos iniciales totales de TCBS en el agua fueron 1.00×10^1 (log 1.00) UFC/mL, aumentando en el contenedor Vv + A5 a 2.10×10^3 (log 3.32) UFC /mL en el día 2 y 8.70×10^2 (log 2.94) UFC/mL en el día 6. En el día 1, los recuentos totales de TCBS en el contenedor Vv aumentaron a 1.80×10^3 (log 3.26) UFC /mL siendo mayores que los recuentos del contenedor Vv + A5. Sin embargo, los recuentos en Vv disminuyeron a 3.00×10^1 (log 1.48) UFC/mL en el día 2 a 8.00×10^1 (log 1.90) UFC/ mL en el día 6 (Figura 7B). Los niveles de *V. vulnificus* en el contenedor Vv + A5 durante el día 2 fueron de 9.03×10^2 (log 2.96) UFC /mL y 2.61×10^1 (log 1.42) UFC /mL en el día 6; mientras que en el contenedor Vv de 3.00×10^1 (log 1.48) UFC/ mL y 4.00×10^1 (log 1.60) UFC/mL, respectivamente (Figura 7B).

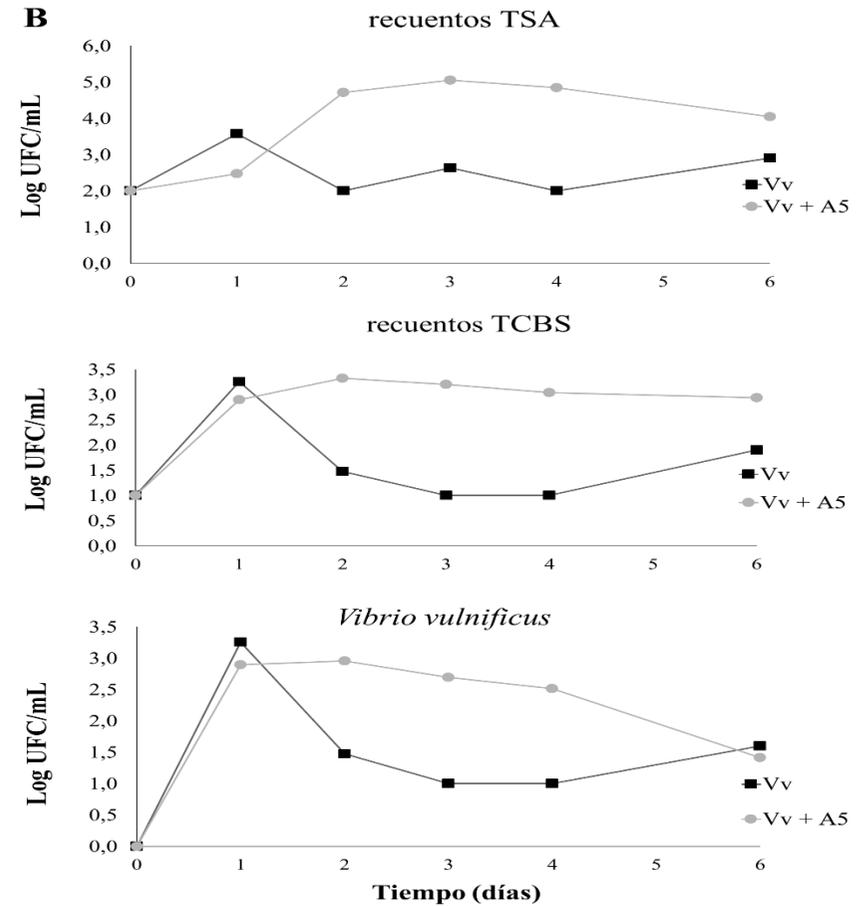
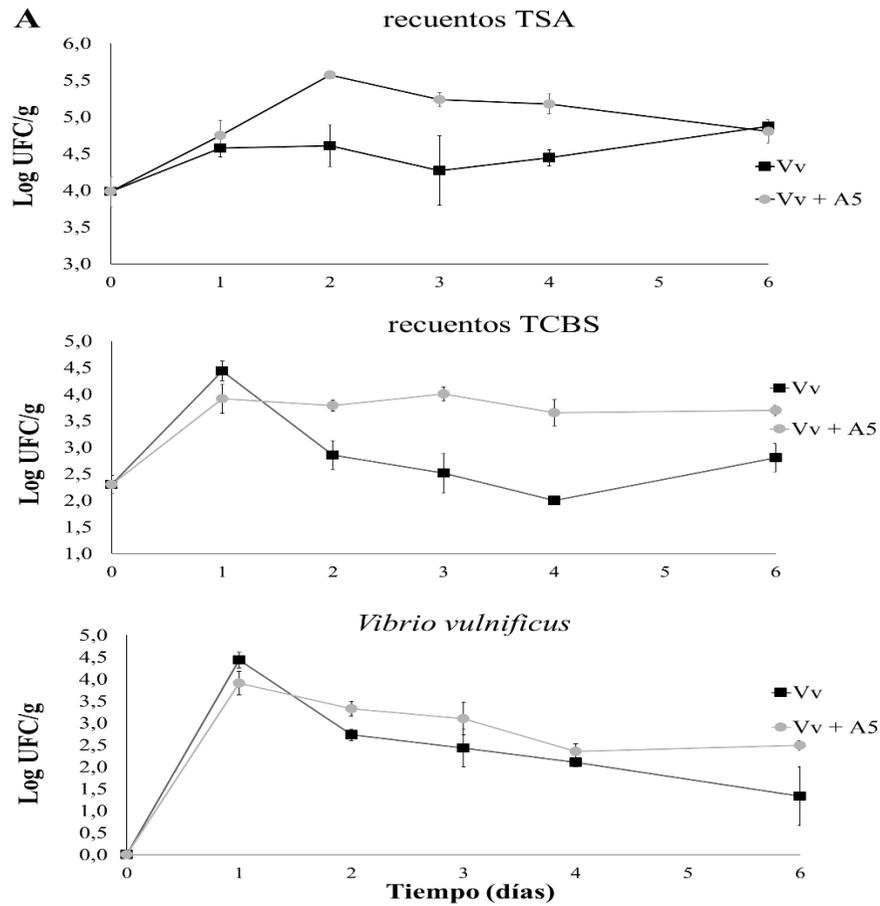


Figura 7. Niveles bacterianos en ostras (A) y agua de mar (B) del bioensayo 2 (inoculación con *V. vulnificus* antes de la inoculación con A5). Se muestran 2 tratamientos: el contenedor Vv inoculado con *V. vulnificus* (■), el contenedor Vv + A5 primero inoculado con *V. vulnificus* y luego con A5 (●).

Los resultados del bioensayo 3 mostraron que los recuentos totales de TSA en el contenedor A5 + Vv fueron significativamente más altos que los del contenedor Vv durante todo el experimento. Los recuentos de TSA en el contenedor A5 + Vv y Vv en el día 2 fueron 3.92×10^5 (log 5.50) UFC /g y 1.23×10^5 (log 4.92) UFC /g, respectivamente, mientras que en el día 6, los recuentos de TSA fueron de 2.60×10^5 (log 5.13) UFC /g y 1.02×10^4 (log 3.97) UFC /g en contenedores A5 + Vv y Vv, respectivamente (Figura 8A). Los recuentos totales iniciales de TCBS en las ostras fueron de 8.00×10^2 (log 2.67) UFC /g en todos los contenedores. En el día 1, los recuentos de TCBS fueron de 1.61×10^4 (log 3.96) UFC /g del contenedor A5 + Vv fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) que 6.00×10^2 (log 2.68) UFC /g observados en el contenedor Vv. En el día 6, los conteos de TCBS en el contenedor A5 + Vv fueron de 3.58×10^3 (log 3.45) UFC/g mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) con el contenedor Vv que mostró conteos de 5.17×10^2 (log 2.54) UFC /g (Figura 8A). Por otro lado, los niveles de *V. vulnificus* en las ostras del contenedor A5 + Vv fueron significativamente más bajos ($p < 0.05$) que los del contenedor Vv durante todo el experimento. En el día 2 (después de la primera inoculación con *V. vulnificus*) los niveles del vibrio en el contenedor A5 + Vv fueron 5.00×10^1 (log 0.72) UFC /g en comparación con 3.52×10^3 (log 3.47) UFC /g observados en el contenedor Vv. Las diferencias significativas continuaron el día 6, ya que no se detectó la presencia de *V. vulnificus* en las ostras del contenedor A5 + Vv pero el contenedor Vv mostró recuentos de vibrios de 4.17×10^2 (log 2.12) UFC /g (Figura 8A). Estos resultados fueron reproducibles en los dos periodos en que se repitió el experimento.

En el agua, los recuentos totales de TSA fueron más altos en el contenedor A5 + Vv que en el contenedor Vv. En el tratamiento con A5 + Vv, los recuentos de TSA fueron de 3.66×10^5 (log 5.49) UFC /mL en el día 1, disminuyendo hasta el día 6 a 8.75×10^3 (log 3.94) UFC /mL, mientras que en el contenedor Vv, los recuentos de TSA fueron de 1.20×10^3 (log 2.89) UFC /mL en el día 1, llegando a valores de 10^4 UFC/mL en los días 2 y 3. En el día 6, los recuentos de TSA fueron de 9.90×10^2 (log 2.84) UFC /mL. No existieron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 8B). Para los recuentos totales de TCBS, el tratamiento A5 + Vv registró valores de 2.97×10^4 (log 4.30) UFC /mL durante el día 1, disminuyendo en el día 6 a 4.50×10^2 (log 1.97) UFC/mL. Para el contenedor Vv, se detectaron valores de 2.50×10^2 (log 2.30) UFC/mL y 1.22×10^3 (log 3.06) UFC/mL en el día 2 y 3, disminuyendo hasta el día 6 en 1.00×10^1 (log 1.00) UFC/mL. No existieron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 8B). En el contenedor A5 + Vv, no se detectó la presencia de *V. vulnificus* durante todo el experimento; mientras que el contenedor Vv mostró recuentos de 2.50×10^2 (log 2.30) UFC/mL en el día 2, existiendo únicamente diferencias significativas ($p < 0.05$) en el día 3 con valores de 1.22×10^3 (log 3.06) UFC/mL, disminuyendo a 1.00×10^1 (log 1.00) UFC/mL en el día 6 (Figura 8B). Estos resultados fueron reproducibles en los dos periodos en que se repitió el experimento.

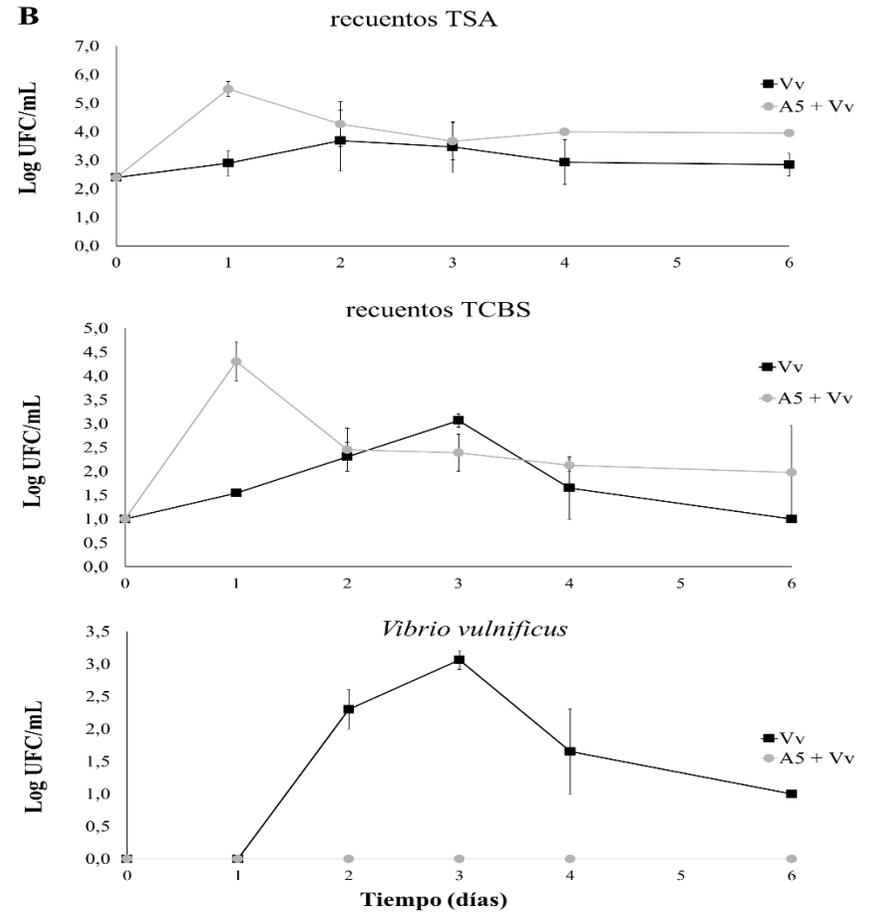
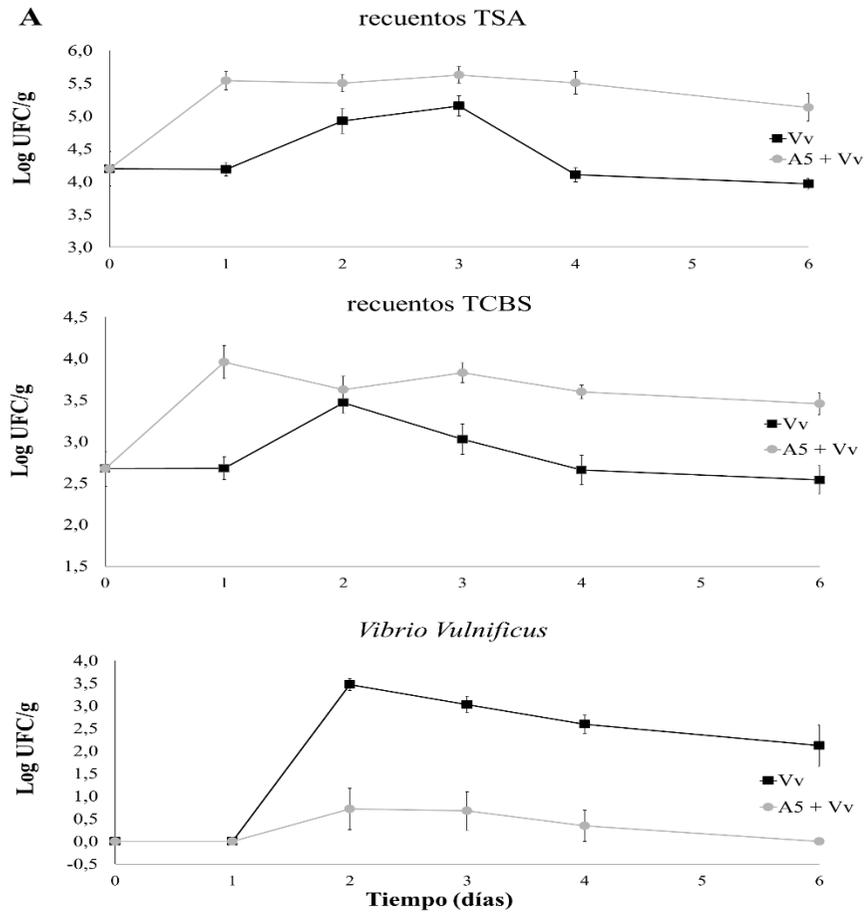


Figura 8. Niveles bacterianos en ostras (A) y agua de mar (B) del bioensayo 3 (inoculación con A5 antes de la inoculación con *V. vulnificus*). Se muestran 2 tratamientos: el contenedor Vv inoculado con *V. vulnificus* (■), el contenedor Vv + A5 inoculado primero con A5 y luego con *V. vulnificus* (●).

4. DISCUSIÓN

La mayoría de los estudios orientados al control de patógenos bacterianos en mariscos vivos se han centrado en inmunoestimulantes y antibióticos (Elston & Ford, 2011). El uso indiscriminado de productos químicos puede causar resistencia bacteriana y contaminación ambiental. Por lo tanto, el uso de probióticos o agentes de biocontrol se han convertido en potenciales alternativas ecológicas contra los patógenos (Verschuere et al., 2000). Este estudio se centró en el uso de *Bacillus amyloliquefaciens* A5 contra *V. vulnificus* en las ostras.

En medios de cultivo, A5 produjo halos de inhibición contra *V. vulnificus*, pero los sobrenadantes del cultivo A5 (metabolitos extracelulares) obtenidos por filtración o esterilización por calor no causaron inhibición. Los resultados sugieren la ausencia de metabolitos antimicrobianos y proponen un mecanismo de inhibición por competencia del antagonismo microbiano. Los resultados son similares a los reportados en estudios anteriores que muestran que las bacterias vivas del ácido láctico, pero no sus metabolitos, pudieron controlar el crecimiento de *Salmonella sp* y *E. coli* (Ayala et al., 2019) *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *V. parahaemolyticus* (Hwanhlem et al., 2010).

Los niveles de FCBC inferiores a 10^7 UFC /mL de *Vibrio vulnificus* produjeron recuentos de recuperación insignificantes del vibrio de las ostras. Los resultados están de acuerdo con informes anteriores que sugieren la necesidad de altos niveles de inóculo bacteriano en experimentos con bivalvos (Herrfurth et al., 2013) ya que los bajos niveles de inóculo pueden verse afectados por la propia salud de las ostras (Kaysner et al., 1989) y cambios en el estado fisiológico de *V. vulnificus* (Quevedo et al., 2005).

En las pruebas de co-inoculación en ostras y agua de mar autoclavadas, se observaron altos niveles de colonias amarillas en TCBS en el contenedor A5 solamente. Este fue un resultado inesperado ya que las ostras autoclavadas no inoculadas no mostraron crecimiento bacteriano y A5 no crece en TCBS. Los resultados sugieren que la flora natural del vibrio no se eliminó por completo mediante autoclave, y que las células sobrevivientes heridas, pero no muertas estaban presentes por debajo de los límites de detección en ostras autoclavadas. Las células sobrevivientes probablemente pudieron recuperarse y crecer en el tejido de ostras en descomposición ayudado por A5 (Stevick et al., 2019). Los patógenos pueden sobrevivir a los tratamientos térmicos gracias a la protección de la matriz alimentaria y las poblaciones de *Vibrio spp* probablemente estaban protegidas por las cadenas de proteínas y lípidos de la ostra (Pelon et al., 2005; Seo et al., 2005, 2010, 2011).

La cepa A5 produjo una reducción significativa de *V. vulnificus* ($p < 0.05$) en ostras autoclavadas en el día 2, pero las diferencias con las ostras del contenedor Vv no fueron significativas ($p > 0.05$) en los días siguientes. Los resultados están de acuerdo con estudios previos que muestran la pérdida de la inhibición de los agentes de biocontrol a lo largo del tiempo, lo que sugiere la necesidad de re-inoculaciones continuas (Hong et al., 2005; Lalloo et al., 2007; Nemutanzhela et al., 2014).

Al realizar los 3 bioensayos con ostras vivas, la inocuidad de A5 en las ostras se evidenció por la supervivencia del 100 % de los animales a la concentración probada (10^6 UFC/mL) del agente de biocontrol. Esto es consistente con informes anteriores, lo que sugiere que *Bacillus spp.* como probióticos en acuicultura y con respecto a *B. amyloliquefaciens* como una bacteria no patógena (Lončar et al., 2014). El primer bioensayo mostró que los niveles de A5 aumentaron durante los días 1 y 2 pero disminuyeron posteriormente, lo que sugiere la necesidad de una nueva inoculación para usos comerciales. La re-inoculación continua de agentes de biocontrol, incluida la aplicación de productos a base de *Bacillus*, se ha sugerido como una práctica común en la acuicultura (Hong et al., 2005; Lalloo et al., 2007; Nemutanzhela et al., 2014). De manera similar, los niveles de *V. vulnificus* en las ostras disminuyeron lentamente después de su inoculación (Figura 6A).

Estudios anteriores mostraron que las ostras ejercen mecanismos de defensa celular basados en la fagocitosis de los hemocitos contra patógenos como *V. vulnificus* (Canesi et al., 2002; Fuhrmann et al., 2018; Genthner et al., 1999). Este proceso termina con la destrucción de los patógenos al aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que son tóxicas para los invasores (Torreilles et al., 1996). Sin embargo, también se ha observado la incapacidad de algunos hemocitos para matar *V. vulnificus* y es posible que la población de patógenos no se elimine por completo (B. Froelich & Oliver, 2013c). A pesar de la lenta disminución en los niveles de las bacterias inoculadas, los datos sugieren que tanto A5 como *V. vulnificus* pueden colonizar los tejidos de la ostra. Esto fue sugerido previamente por otros estudios que muestran que las ostras pueden concentrar bacterias del agua circundante en cuestión de horas (B. Froelich & Oliver, 2013a) y que los microorganismos probióticos tienen la capacidad de adherirse al epitelio mucoso del tracto gastrointestinal del huésped (Chi et al., 2014).

Los resultados del bioensayo 2 sugieren que la presencia de A5 no ejerció un efecto de biocontrol en las ostras previamente inoculadas con *V. vulnificus* (Figura 7A). Los resultados están de acuerdo con informes anteriores que sugieren que las poblaciones de vibrio previamente adaptadas en los tejidos de ostras tienen la capacidad de prevenir

la colonización de bacterias beneficiosas (Froelich & Oliver, 2013b; Verschuere et al., 2000). En lugar de un efecto de biocontrol, A5 estimuló significativamente el crecimiento de las colonias amarillas de TCBS y los recuentos de TSA tanto en ostras como en agua, en los días 3 y 4, respectivamente. Los resultados son similares a los de un estudio anterior que muestra que los probióticos pueden aumentar la diversidad de *Vibrio* en la acuicultura (Stevick et al., 2019). Se necesita más investigación para determinar el efecto de A5 en la diversidad de las poblaciones de vibrio. Comprender cómo el tratamiento con probióticos afecta la microbiota en los sistemas de acuicultura puede ayudar a optimizar sus beneficios y prevenir efectos secundarios indeseables (Kesarcodi-Watson et al., 2012).

En el tercer bioensayo, las ostras se inocularon con A5 seguido de inoculación con *V. vulnificus*. Para evitar la interferencia de las células no colonizadoras de A5, se cambió el agua antes de inocular el vibrio (Porsby & Gram, 2016). Los resultados mostraron que el 100 % de la población de *V. vulnificus* fue eliminada del tejido de la ostra después de 6 días (Figura 8A). Los resultados sugieren una inhibición competitiva de *V. vulnificus* o un aumento de la respuesta inmune en las ostras (Vanbelle et al., 1990). La cepa A5 probablemente compitió por los sitios de adhesión en los tejidos intestinales u otras superficies de ostras, evitando la colonización de *V. vulnificus* (Gismondo et al., 1999; Nemitanzhela et al., 2014; Verschuere et al., 2000). En contraste, cuando *V. vulnificus* ya está en el tejido, A5 no pudo competir por el espacio que el vibrio ya había colonizado (Olsson et al., 1992; Verschuere et al., 2000). Además, la inoculación de *Bacillus spp.* en mariscos vivos han demostrado mejorar la salud del huésped al estimular su respuesta inmune (Rengpipat et al., 2000). Una ventaja de usar *Bacillus spp.* es que generalmente no están involucrados en procesos horizontales de transferencia de genes con organismos Gram-negativos como *Vibrios spp.* y, por lo tanto, es poco probable que adquieran genes de resistencia a los antibióticos o virulencia de estas especies (Moriarty, 1999).

La seguridad de *B. amyloliquefaciens* para su uso en productos alimenticios puede inferirse ya que no se ha informado de la patogenicidad de esta bacteria (Rasimus-Sahari et al., 2015). Las cepas de *B. amyloliquefaciens* son de uso comercial debido a la gran cantidad de compuestos bioactivos que producen. Además, la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. enumera a *B. amyloliquefaciens* como un productor de aditivos alimentarios con el estado "generalmente reconocido como seguro" (GRAS) (Health, 2018). De manera similar, *B. amyloliquefaciens* se considera no patógena / no toxigénica para los humanos y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (EFSA Panel on Biological Hazards, 2013) le propuso el estatus

de “presunción de seguridad calificada” (QPS). Se han aprobado varias patentes sobre el uso de cepas de *B. amyloliquefaciens* para la producción de sustancias antimicóticas y antibacterianas para su uso en las industrias de alimentos y piensos (Hsieh & Kao, s. f.; Kang et al., s. f.; Rasimus-Sahari et al., 2015). Sin embargo, se deben realizar investigaciones adicionales para confirmar la seguridad de las células enteras de *Bacillus amyloliquefaciens* en los alimentos para consumo humano.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las células vivas de *Bacillus amyloliquefaciens* A5 inhibieron el crecimiento de *V. vulnificus* *in vitro*, pero no se observó inhibición cuando se utilizaron los metabolitos de A5. La cepa A5 pudo colonizar ostras vivas y evitó la colonización de *V. vulnificus*. Sin embargo, A5 no pudo reducir los niveles de las células ya colonizadoras de *V. vulnificus* en las ostras. Los niveles de vibrios totales (colonias amarillas) aumentaron significativamente en las ostras y en el agua de mar después de la inoculación con A5. Se necesita más investigación para determinar la patogenicidad de *Vibrio spp.* favorecido por A5 y para establecer la seguridad de las células vivas de *Bacillus amyloliquefaciens* A5 como aditivo alimentario. Este es el primer informe de un agente de biocontrol eficaz contra *V. vulnificus* en ostras vivas.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, R., Cobo, L., Sonnenholzner, S., & Stern, S. (2008). Estado actual de la acuicultura de moluscos bivalvos en Ecuador. *FAO Actas de Pesca y Acuicultura*, *12*, 129-133.
- Araujo, M. R. E. de, Aquino, C., Scaramal, E., Ciola, C. S., Schettino, G., & Machado, M. C. C. (2007). *Vibrio vulnificus* infection in São Paulo, Brazil: Case report and literature review. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *11*(2), 302-305. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702007000200029>
- Ayala, D. I., Cook, P. W., Franco, J. G., Bugarel, M., Kottapalli, K. R., Loneragan, G. H., Brashears, M. M., & Nightingale, K. K. (2019). A Systematic Approach to Identify and Characterize the Effectiveness and Safety of Novel Probiotic Strains to Control Foodborne Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01108>
- Baffone, W., Tarsi, R., Pane, L., Campana, R., Repetto, B., Mariottini, G. L., & Pruzzo, C. (2006). Detection of free-living and plankton-bound vibrios in coastal waters of the Adriatic Sea (Italy) and study of their pathogenicity-associated properties. *Environmental Microbiology*, *8*(7), 1299-1305. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01011.x>
- Baker-Austin, C., & Oliver, J. D. (2018). *Vibrio vulnificus*: New insights into a deadly opportunistic pathogen. *Environmental Microbiology*, *20*(2), 423-430. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13955>
- Baker-Austin, C., Stockley, L., Rangdale, R., & Martinez-Urtaza, J. (2010). Environmental occurrence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*: A European perspective. *Environmental Microbiology Reports*, *2*(1), 7-18. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00096.x>
- Barton, J. C., & Acton, R. T. (2009). Hemochromatosis and *Vibrio vulnificus* wound infections. *Journal of Clinical Gastroenterology*, *43*(9), 890-893. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31819069c1>
- Berthelin, C., Kellner, K., & Mathieu, M. (2000). Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *125*(3), 359-369. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(99\)00187-X](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(99)00187-X)

Birkenhauer, J. M., & Oliver, J. D. (2003). Use of diacetyl to reduce the load of *Vibrio vulnificus* in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Food Protection*, 66(1), 38-43. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-66.1.38>

Blake, P. A., Merson, M. H., Weaver, R. E., Hollis, D. G., & Heublein, P. C. (1979). Disease caused by a marine *Vibrio*. Clinical characteristics and epidemiology. *The New England Journal of Medicine*, 300(1), 1-5. <https://doi.org/10.1056/NEJM197901043000101>

Bross, M. H., Soch, K., Morales, R., & Mitchell, R. B. (2007). *Vibrio vulnificus* infection: Diagnosis and treatment. *American Family Physician*, 76(4), 539-544+546. Scopus.

Buchrieser, C., Gangar, V. V., Murphree, R. L., Tamplin, M. L., & Kaspar, C. W. (1995). Multiple *Vibrio vulnificus* strains in oysters as demonstrated by clamped homogeneous electric field gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3), 1163-1168.

Burden of Foodborne Illness: Findings / Estimates of Foodborne Illness / CDC. (2018, noviembre 19). <https://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>

Burrige, L., Weis, J. S., Cabello, F., Pizarro, J., & Bostick, K. (2010). Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture*, 306(1), 7-23. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.05.020>

Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., & Pruzzo, C. (2002). Bacteria–hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy Research and Technique*, 57(6), 469-476. <https://doi.org/10.1002/jemt.10100>

Cañigral, I., Moreno, Y., Alonso, J. L., González, A., & Ferrús, M. A. (2010). Detection of *Vibrio vulnificus* in seafood, seawater and wastewater samples from a Mediterranean coastal area. *Microbiological Research*, 165(8), 657-664. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.11.012>

Castellano, P., Pérez Ibarreche, M., Blanco Massani, M., Fontana, C., & Vignolo, G. M. (2017). Strategies for Pathogen Biocontrol Using Lactic Acid Bacteria and Their Metabolites: A Focus on Meat Ecosystems and Industrial Environments. *Microorganisms*, 5(3), 38. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030038>

Cazorla, C., Guigon, A., Noel, M., Quilici, M.-L., & Lacassin, F. (2011). Fatal *Vibrio vulnificus* Infection Associated with Eating Raw Oysters, New Caledonia. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 136-137. <https://doi.org/10.3201/eid1701.100603>

Cerdà-Cuéllar, M., Jofre, J., & Blanch, A. R. (2000). A Selective Medium and a Specific Probe for Detection of *Vibrio vulnificus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(2), 855-859.

Chae, M. J., Cheney, D., & Su, Y.-C. (2009). Temperature effects on the depuration of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Journal of Food Science*, *74*(2), M62-66. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.01031.x>

Chaurasia, B., Pandey, A., Palni, L. M. S., Trivedi, P., Kumar, B., & Colvin, N. (2005). Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. *Microbiological Research*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301049849>

Chen, Y., Satoh, T., & Tokunaga, O. (2002). *Vibrio vulnificus* infection in patients with liver disease: Report of five autopsy cases. *Virchows Archiv*, *441*(1), 88-92. <https://doi.org/10.1007/s00428-002-0613-1>

Chi, C., Jiang, B., Yu, X.-B., Liu, T.-Q., Xia, L., & Wang, G.-X. (2014). Effects of three strains of intestinal autochthonous bacteria and their extracellular products on the immune response and disease resistance of common carp, *Cyprinus carpio*. *Fish & Shellfish Immunology*, *36*(1), 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.003>

Chicheff, C. O. C., Bagattini, J.C, Gnazzo, J, Amigo, E, Piñeyrúa, M, & Vanerio, G. (2001). *Vibrio vulnificus: Un veraneante letal en las aguas oceánicas de Uruguay. Comunicación del primer caso nacional. 14*, 168–174.

Chung, K.-J., Cho, E.-J., Kim, M. K., Kim, Y. R., Kim, S.-H., Yang, H.-Y., Chung, K.-C., Lee, S. E., Rhee, J. H., Choy, H. E., & Lee, T.-H. (2010). RtxA1-Induced Expression of the Small GTPase Rac2 Plays a Key Role in the Pathogenicity of *Vibrio vulnificus*. *The Journal of Infectious Diseases*, *201*(1), 97-105. <https://doi.org/10.1086/648612>

Cruz-Romero, M., Kelly, A. L., & Kerry, J. P. (2007). Effects of high-pressure and heat treatments on physical and biochemical characteristics of oysters (*Crassostrea gigas*). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *8*(1), 30-38. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.05.002>

Daniels, N. A. (2011). *Vibrio vulnificus* Oysters: Pearls and Perils. *Clinical Infectious Diseases*, *52*(6), 788-792. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq251>

Dechet, A. M., Yu, P. A., Koram, N., & Painter, J. (2008). Nonfoodborne *Vibrio* infections: An important cause of morbidity and mortality in the United States, 1997-2006. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *46*(7), 970-976. <https://doi.org/10.1086/529148>

- DePaola, A., Jones, J. L., Woods, J., Burkhardt, W., Calci, K. R., Krantz, J. A., Bowers, J. C., Kasturi, K., Byars, R. H., Jacobs, E., Williams-Hill, D., & Nabe, K. (2010). Bacterial and Viral Pathogens in Live Oysters: 2007 United States Market Survey. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(9), 2754-2768. <https://doi.org/10.1128/AEM.02590-09>
- DePaola, A., Motes, M. L., Chan, A. M., & Suttle, C. A. (1998). Phages infecting *Vibrio vulnificus* are abundant and diverse in oysters (*Crassostrea virginica*) collected from the Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1), 346-351.
- EFSA Panel on Biological Hazards. (2013). Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). *EFSA Journal*, 11(11), 3449. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3449>
- Elston, A. R., & Ford, S. E. (2011). *Shellfish diseases and health management*.
- Fang, L., Wolmarans, B., Kang, M., Jeong, K. C., & Wright, A. C. (2015). Application of chitosan microparticles for reduction of vibrio species in seawater and live oysters (*Crassostrea virginica*). *Applied and Environmental Microbiology*, 81(2), 640-647. <https://doi.org/10.1128/AEM.02856-14>
- FAO. (2005, abril 13). *FAO Fisheries & Aquaculture—Cultured Aquatic Species Information Programme—Crassostrea gigas (Thunberg, 1793)*. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/en
- FAO. (2009). *In Cultured aquatic species fact sheets. Crassostrea gigas (Thunberg, 1793) [Ostreidae]*. http://www.fao.org/tempref/FI/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/es/es_pacificcuppedoyster.htm
- FAO, F. A. A. O. O. T. U. N. (2004). *The hatchery culture of bivalves: A practical manual*. <http://www.fao.org/3/y5720e/y5720e00.htm>
- Fravel, D. R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 337-359. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924>
- Froelich, B. A., & Noble, R. T. (2014). Factors affecting the uptake and retention of *Vibrio vulnificus* in oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(24), 7454-7459. <https://doi.org/10.1128/AEM.02042-14>
- Froelich, B., & Noble, R. (2016). *Vibrio* bacteria in raw oysters: Managing risks to human health. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371, 20150209. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0209>

- Froelich, B., & Oliver, J. (2013a). Increases in the Amounts of *Vibrio* spp. In Oysters upon Addition of Exogenous Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17), 5208-5213. <https://doi.org/10.1128/AEM.01110-13>
- Froelich, B., & Oliver, J. D. (2013b). The interactions of *Vibrio vulnificus* and the oyster *Crassostrea virginica*. *Microbial Ecology*, 65(4), 807-816. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0162-3>
- Froelich, B., & Oliver, J. D. (2013c). The interactions of *Vibrio vulnificus* and the oyster *Crassostrea virginica*. *Microbial Ecology*, 65(4), 807-816. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0162-3>
- Fuhrmann, M., Delisle, L., Petton, B., Corporeau, C., & Pernet, F. (2018). Metabolism of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is influenced by salinity and modulates survival to the Ostreid herpesvirus OsHV-1. *Biology Open*, 7(2), bio028134. <https://doi.org/10.1242/bio.028134>
- Gavin, H. E., Beubier, N. T., & Satchell, K. J. F. (2017). The Effector Domain Region of the *Vibrio vulnificus* MARTX Toxin Confers Biphasic Epithelial Barrier Disruption and Is Essential for Systemic Spread from the Intestine. *PLOS Pathogens*, 13(1), e1006119. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006119>
- Genovese, G., Faggio, C., Gugliandolo, C., Torre, A., Spanò, A., Morabito, M., & Maugeri, T. L. (2012). In vitro evaluation of antibacterial activity of *Asparagopsis taxiformis* from the Straits of Messina against pathogens relevant in aquaculture. *Marine Environmental Research*, 73, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.10.002>
- Genthner, F. J., Volety, A. K., Oliver, L. M., & Fisher, W. S. (1999). Factors Influencing In Vitro Killing of Bacteria by Hemocytes of the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*). *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 3015-3020.
- Gismondo, M. R., Drago, L., & Lombardi, A. (1999). Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12(4), 287-292. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(99\)00050-3](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(99)00050-3)
- Goulas, A. E., & Kontominas, M. G. (2007). Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*, 100(1), 287-296. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.045>
- Halimi, B., Dortu, C., Arguelles-Arias, A., Thonart, P., Joris, B., & Fickers, P. (2010). Antilisterial Activity on Poultry Meat of Amylolysin, a Bacteriocin from *Bacillus amyloliquefaciens* GA1. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2(2), 120-125. <https://doi.org/10.1007/s12602-010-9040-9>

- Han, F., Pu, S., Hou, A., & Ge, B. (2009). Characterization of Clinical and Environmental Types of *Vibrio vulnificus* Isolates from Louisiana Oysters. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(10), 1251-1258. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0343>
- Haq, S. M., & Dayal, H. H. (2005). Chronic liver disease and consumption of raw oysters: A potentially lethal combination--a review of *Vibrio vulnificus* septicemia. *The American Journal of Gastroenterology*, 100(5), 1195-1199. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2005.40814.x>
- Health, C. for D. and R. (2018). Code of Federal Regulations—Title 21—Food and Drugs. *FDA*. <http://www.fda.gov/medical-devices/medical-device-databases/code-federal-regulations-title-21-food-and-drugs>
- Heng, S.-P., Letchumanan, V., Deng, C.-Y., Ab Mutalib, N.-S., Khan, T. M., Chuah, L.-H., Chan, K.-G., Goh, B.-H., Pusparajah, P., & Lee, L.-H. (2017). *Vibrio vulnificus*: An Environmental and Clinical Burden. *Frontiers in Microbiology*, 8, 997. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00997>
- Herrfurth, D., Oeleker, K., Pund, R.-P., Strauch, E., Schwartz, K., Kleer, J., Götz, G., Alter, T., & Huehn, S. (2013). Uptake and Localization of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus* in Blue Mussels (*Mytilus edulis*) of the Baltic Sea. *Journal of Shellfish Research*, 32(3), 855-859. <https://doi.org/10.2983/035.032.0329>
- Hewitt, W., & Vincent, S. (1989). *Theory and Application of Microbiological Assay*.
- Hoffmann, S. A. (Sandra A., Macculloch, B., & Batz, M. B. (2015). Economic burden of major foodborne illnesses acquired in the United States. *Economic Information Bulletin*; No. 140. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201600093076>
- Hong, H. A., Duc, L. H., & Cutting, S. M. (2005). The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4), 813-835. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.12.001>
- Horseman, M. A., & Surani, S. (2011). A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: An important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 15(3), e157-166. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.11.003>
- Hsieh, F.-C., & Kao, S.-S. (s. f.). *Novel strain of bacillus amyloliquefaciens and its use* (Patent N.º US20100143316A1).
- Hu, H. Q., Li, X. S., & He, H. (2010). Characterization of an antimicrobial material from a newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens* from mangrove for biocontrol of

Capsicum bacterial wilt. *Biological Control*, 54(3), 359-365. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.06.015>

Huehn, S., Eichhorn, C., Urmersbach, S., Breidenbach, J., Bechlars, S., Bier, N., Alter, T., Bartelt, E., Frank, C., Oberheitmann, B., Gunzer, F., Brennholt, N., Böer, S., Appel, B., Dieckmann, R., & Strauch, E. (2014). Pathogenic vibrios in environmental, seafood and clinical sources in Germany. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 304(7), 843-850. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.07.010>

Hwanhlem, N., Watthanasakphuban, N., Riebroy, S., Benjakul, S., H-Kittikun, A., & Maneerat, S. (2010). Probiotic lactic acid bacteria from Kung-Som: Isolation, screening, inhibition of pathogenic bacteria. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(3), 594-601. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02172.x>

Jiménez, M. (2008). *Effect of the nutritional status of banana (Musa spp.) on leaf disease infestation by Mycosphaerella fijiensis Morelet in Ecuador*. [Ph.D thesis]. Catholic University of Leuven.

Johnson, C. N., Flowers, A. R., Noriea, N. F., Zimmerman, A. M., Bowers, J. C., DePaola, A., & Grimes, D. J. (2010). Relationships between environmental factors and pathogenic Vibrios in the Northern Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21), 7076-7084. <https://doi.org/10.1128/AEM.00697-10>

Jones, J. L., Kinsey, T. P., Johnson, L. W., Porso, R., Friedman, B., Curtis, M., Wesighan, P., Schuster, R., & Bowers, J. C. (2016). Effects of Intertidal Harvest Practices on Levels of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* Bacteria in Oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(15), 4517-4522. <https://doi.org/10.1128/AEM.00721-16>

Jones, M. K., & Oliver, J. D. (2009). *Vibrio vulnificus*: Disease and Pathogenesis. *Infection and Immunity*, 77(5), 1723-1733. <https://doi.org/10.1128/IAI.01046-08>

Kang, Y., Semones, S., Smith, J., & Frodyma, M. (s. f.). *Bacillus amyloliquefaciens Strain* (Patent N.º US 2011/0274.673 A1). (Novozymes Biologicals Inc)

Kaysner, C. A., & Angelo DePaola. (2004). *Bacteriological Analytical Manual Chapter 9 Vibrio* (Administration, u.S. Food and Drug).

Kaysner, C. A., Tamplin, M. L., Wekell, M. M., Stott, R. F., & Colburn, K. G. (1989). Survival of *Vibrio vulnificus* in shellstock and shucked oysters (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*) and effects of isolation medium on recovery. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(12), 3072-3079.

Kelly, M. T. (1982). Effect of temperature and salinity on *Vibrio (Beneckea) vulnificus* occurrence in a Gulf Coast environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(4), 820-824.

- Kesarcodi-Watson, A., Miner, P., Nicolas, J.-L., & Robert, R. (2012). Protective effect of four potential probiotics against pathogen-challenge of the larvae of three bivalves: Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), flat oyster (*Ostrea edulis*) and scallop (*Pecten maximus*). *Aquaculture*, 344-349, 29-34. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.02.029>
- Kim, J. H., Jr, C. H. C., Shin, S. P., Han, J. E., Jun, J. W., & Park, S. C. (2011). Occurrence and Antibiotic Resistance of *Vibrio Vulnificus* in Seafood and Environmental Waters in Korea. *Journal of Food Safety*, 31(4), 518-524. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2011.00329.x>
- Kim, Park, Y.-J., & Shin, S.-H. (2007). A widespread deferroxamine-mediated iron-uptake system in *Vibrio vulnificus*. *The Journal of Infectious Diseases*, 196(10), 1537-1545. <https://doi.org/10.1086/523108>
- Kinsey, T. P., Lydon, K. A., Bowers, J. C., & Jones, J. L. (2015). Effects of Dry Storage and Resubmersion of Oysters on Total *Vibrio vulnificus* and Total and Pathogenic (tdh+/trh+) *Vibrio parahaemolyticus* Levels. *Journal of Food Protection*, 78(8), 1574-1580. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-017>
- Laloo, R., Ramchuran, S., Ramduth, D., Görgens, J., & Gardiner, N. (2007). Isolation and selection of *Bacillus* spp. As potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1471-1479. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03360.x>
- Lee, H. S., Choi, S., & Choi, S. H. (2012). Complete genome sequence of *Vibrio vulnificus* bacteriophage SSP002. *Journal of Virology*, 86(14), 7711. <https://doi.org/10.1128/JVI.00972-12>
- Lee, H. S., Choi, S., Shin, H., Lee, J.-H., & Choi, S. H. (2014). *Vibrio vulnificus* Bacteriophage SSP002 as a Possible Biocontrol Agent. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(2), 515-524. <https://doi.org/10.1128/AEM.02675-13>
- Li, J., & Woo, N. Y. S. (2003). Pathogenicity of vibrios in fish: An overview. *Journal of Ocean University of China*, 2, 117-128. <https://doi.org/10.1007/s11802-003-0039-7>
- Lončar, N., Gligorijević, N., Božić, N., & Vujčić, Z. (2014). Congo red degrading laccases from *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated from salt spring in Serbia. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 91, 18-23. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.03.008>
- López, A. J., García, A. M., & Rojas, J. J. (2005). Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012041157>

- Marques, A., Nunes, M. L., Moore, S. K., & Strom, M. S. (2010). Climate change and seafood safety: Human health implications. *Food Research International*, 43(7), 1766-1779. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.02.010>
- Mckindsey, C., LANDRY, T., O'Beirn, F. X., & DAVIES, I. (2009). Bivalve aquaculture and exotic species: A review of ecological considerations and management issues. *Journal of Shellfish Research*, 26, 281-294. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2007\)26\[281:BAAESA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2007)26[281:BAAESA]2.0.CO;2)
- Merkel, S., Alexander, S., Zufall, E., Oliver, J. D., & Huet-Hudson, Y. M. (2001). Essential Role for Estrogen in Protection against *Vibrio vulnificus*-Induced Endotoxic Shock. *Infection and Immunity*, 69(10), 6119-6122. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.10.6119-6122.2001>
- Milyutin, D. M., & Frolov, A. V. (1997). Effect of environment on the growth and lipid composition of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat in the coastal waters of Cape Bolshoi Utrish (the Black Sea). *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, 52(3), 45-49.
- Moriarty, D. J. W. (1999). *Disease Control in Shrimp Aquaculture with Probiotic Bacteria*.
- Morris, J. G., & Acheson, D. (2003). Cholera and Other Types of Vibriosis: A Story of Human Pandemics and Oysters on the Half Shell. *Clinical Infectious Diseases*, 37(2), 272-280. <https://doi.org/10.1086/375600>
- Na, H. S., Cha, M. H., Oh, D.-R., Cho, C.-W., Rhee, J. H., & Kim, Y. R. (2011). Protective mechanism of curcumin against *Vibrio vulnificus* infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 63(3), 355-362. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00855.x>
- Nemutanzhela, M. E., Roets, Y., Gardiner, N., & Lalloo, R. (2014). The Use and Benefits of Bacillus Based Biological Agents in Aquaculture. *Sustainable Aquaculture Techniques*. <https://doi.org/10.5772/57375>
- Oliver, J. D. (2015). The Biology of *Vibrio vulnificus*. *Microbiology Spectrum*, 3(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VE-0001-2014>
- Olsson, J. C., Westerdahl, A., Conway, P. L., & Kjelleberg, S. (1992). Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*)- and dab (*Limanda limanda*)-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(2), 551-556.
- Orellana, T., Manzano, P., Chávez, E., Ruiz, O., León, R., Manzano, A. O., & Peralta, E. (2013). Estándares de fermentación y maduración artesanal de Bioles. *Yachana Revista Científica*, 2(1). <https://doi.org/10.1234/yach.v2i1.186>

- Park, S. Y., Chung, M.-S., & Ha, S.-D. (2018). Combined effect of sodium hypochlorite and gamma-irradiation for the control of *Vibrio vulnificus* in fresh oyster and clam. *LWT*, *91*, 568-572. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.087>
- Pelon, W., Luftig, R. B., & Johnston, K. H. (2005). *Vibrio vulnificus* load reduction in oysters after combined exposure to *Vibrio vulnificus*—Specific bacteriophage and to an oyster extract component. *Journal of Food Protection*, *68*(6), 1188-1191.
- Pfeffer, C. S., Hite, M. F., & Oliver, J. D. (2003). Ecology of *Vibrio vulnificus* in Estuarine Waters of Eastern North Carolina. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(6), 3526-3531. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3526-3531.2003>
- Phuvasate, S., Chen, M.-H., & Su, Y.-C. (2012). Reductions of *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) by depuration at various temperatures. *Food Microbiology*, *31*(1), 51-56. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.02.004>
- Porsby, C. H., & Gram, L. (2016). *Phaeobacter inhibens* as biocontrol agent against *Vibrio vulnificus* in oyster models. *Food Microbiology*, *57*, 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.01.005>
- Pu, M., Duriez, P., Arazi, M., & Rowe-Magnus, D. A. (2018). A conserved tad pilus promotes *Vibrio vulnificus* oyster colonization. *Environmental Microbiology*, *20*(2), 828-841. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14025>
- Puri, W., Areechon, N., Srisapome, P., & Maketon, M. (2006). Competition on Using Nutrient for Growth between *Bacillus* spp. And *Vibrio harveyi*. *Kasetsart Journal - Natural Science*, *40*.
- Quevedo, A. C., Smith, J. G., Rodrick, G. E., & Wright, A. C. (2005). Ice immersion as a postharvest treatment of oysters for the reduction of *Vibrio vulnificus*. *Journal of Food Protection*, *68*(6), 1192-1197. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-68.6.1192>
- Ramos, R. J., Miotto, M., Squella, F. J. L., Cirolini, A., Ferreira, J. F., & Vieira, C. R. W. (2012). Depuration of Oysters (*Crassostrea gigas*) contaminated with *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* with UV light and chlorinated seawater. *Journal of Food Protection*, *75*(8), 1501-1506. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-467>
- Rasmus-Sahari, S., Teplova, V. V., Andersson, M. A., Mikkola, R., Kankkunen, P., Matikainen, S., Gahmberg, C. G., Andersson, L. C., & Salkinoja-Salonen, M. (2015). The Peptide Toxin Amylosin of *Bacillus amyloliquefaciens* from Moisture-Damaged Buildings Is Immunotoxic, Induces Potassium Efflux from Mammalian Cells, and Has Antimicrobial Activity. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(8), 2939-2949. <https://doi.org/10.1128/AEM.03430-14>

- Raszl, S. M., Froelich, B. A., Vieira, C. R. W., Blackwood, A. D., & Noble, R. T. (2016). *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in South America: Water, seafood and human infections. *Journal of Applied Microbiology*, *121*(5), 1201-1222. <https://doi.org/10.1111/jam.13246>
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., & Menasaveta, P. (2000). Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, *191*(4), 271-288. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00440-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00440-3)
- Richards, P. J., Connerton, P. L., & Connerton, I. F. (2019). Phage Biocontrol of *Campylobacter jejuni* in Chickens Does Not Produce Collateral Effects on the Gut Microbiota. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00476>
- Rosche, T. M., Yano, Y., & Oliver, J. D. (2005). A rapid and simple PCR analysis indicates there are two subgroups of *Vibrio vulnificus* which correlate with clinical or environmental isolation. *Microbiology and Immunology*, *49*(4), 381-389.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M.-A., Roy, S. L., Jones, J. L., & Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(1), 7-15. <https://doi.org/10.3201/eid1701.091101p1>
- Seo, J.-K., Crawford, J. M., Stone, K. L., & Noga, E. J. (2005). Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *338*(4), 1998-2004. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.11.013>
- Seo, J.-K., Stephenson, J., Crawford, J. M., Stone, K. L., & Noga, E. J. (2010). American Oyster, *Crassostrea virginica*, Expresses a Potent Antibacterial Histone H2B Protein. *Marine Biotechnology*, *12*(5), 543-551. <https://doi.org/10.1007/s10126-009-9240-z>
- Seo, J.-K., Stephenson, J., & Noga, E. J. (2011). Multiple antibacterial histone H2B proteins are expressed in tissues of American oyster. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *158*(3), 223-229. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.11.011>
- Serrano, L. (2014). *Control biológico de patógenos de camarón mediante el uso de microorganismos aislados de muestras de biol y suelo de la antártida*. <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/25086>
- Solis, M., Reyes, D., Solis, A., I., P., & Gil, J. (2015). Evaluación Económica Del Cultivo De Acelga (*Beta Vulgaris* var. *Cicla*) Usando Biol Como Fertilizante Orgánico.

International Multilingual Journal of Contemporary Research, 3.
<https://doi.org/10.15640/imjcr.v3n2a5>

Song, B., Rong, Y.-J., Zhao, M.-X., & Chi, Z.-M. (2013). Antifungal activity of the lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* anti-CA against *Candida albicans* isolated from clinic. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(16), 7141-7150.
<https://doi.org/10.1007/s00253-013-5000-0>

Staley, C., Jones, M. K., Wright, A. C., & Harwood, V. J. (2011). Genetic and quantitative assessment of *Vibrio vulnificus* populations in oyster (*Crassostrea virginica*) tissues. *Environmental Microbiology Reports*, 3(5), 543-549.
<https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00256.x>

Stevick, R. J., Sohn, S., Modak, T. H., Nelson, D. R., Rowley, D. C., Tammi, K., Smolowitz, R., Markey Lundgren, K., Post, A. F., & Gómez-Chiarri, M. (2019). Bacterial Community Dynamics in an Oyster Hatchery in Response to Probiotic Treatment. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01060>

Tamplin, M. L., & Capers, G. M. (1992). Persistence of *Vibrio vulnificus* in tissues of Gulf Coast oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to seawater disinfected with UV light. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(5), 1506-1510.

Tirapé, A. (2007). *Contribution à l'étude de l'ontogenèse du système immunitaire chez l'huître creuse Crassostrea gigas*. [PhD Thesis, Université Montpellier II]. PhD Thesis.
<https://archimer.ifremer.fr/doc/00440/55113/>

Toranzo, A. E., Magariños, B., & Romalde, J. L. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246(1), 37-61.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.01.002>

Torreilles, J., Guérin, M. C., & Roch, P. (1996). [Reactive oxygen species and defense mechanisms in marine bivalves]. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie*, 319(3), 209-218.

U.S. Food and Drug Administration. (2009). *Backgrounder on measures to eliminate risk caused by Vibrio vulnificus infection from consumption of raw molluscan shellfish*.
<http://www.fda.gov/NewsEvents/Speeches/ucm187014.htm>.

Vanbelle, M., Teller, E., & Focant, M. (1990). Probiotics in animal nutrition: A review. *Archiv Fur Tierernahrung*, 40(7), 543-567.
<https://doi.org/10.1080/17450399009428406>

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 655-671.

- Vezzulli, L., Grande, C., Reid, P. C., Hélaouët, P., Edwards, M., Höfle, M. G., Brettar, I., Colwell, R. R., & Pruzzo, C. (2016). Climate influence on *Vibrio* and associated human diseases during the past half-century in the coastal North Atlantic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(34), E5062-5071. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609157113>
- Wang, D., Yu, S., Chen, W., Zhang, D., & Shi, X. (2010). Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster tissues following artificial contamination and depuration. *Letters in Applied Microbiology*, *51*(1), 104-108. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02865.x>
- Wang, Dapeng, Zhang, D., Chen, W., Yu, S., & Shi, X. (2010). Retention of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster tissues after chlorine dioxide treatment. *International Journal of Food Microbiology*, *137*(1), 76-80. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.022>
- Warner, E., & Oliver, J. D. (2008). Population Structures of Two Genotypes of *Vibrio vulnificus* in Oysters (*Crassostrea virginica*) and Seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(1), 80-85. <https://doi.org/10.1128/AEM.01434-07>
- West, P. A., Russek, E., Brayton, P. R., & Colwell, R. R. (1982). Statistical evaluation of a quality control method for isolation of pathogenic *Vibrio* species on selected thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agars. *Journal of Clinical Microbiology*, *16*(6), 1110-1116.
- Wong, K. C., Brown, A. M., Luscombe, G. M., Wong, S. J., & Mendis, K. (2015). Antibiotic use for *Vibrio* infections: Important insights from surveillance data. *BMC Infectious Diseases*, *15*(1), 226. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-0959-z>
- World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2005). *Risk assessment of Vibrio vulnificus in raw oysters: Interpretative summary and technical report*. <http://www.fao.org/3/a0252e/a0252e00.htm>
- Xu, H.-M., Rong, Y.-J., Zhao, M.-X., Song, B., & Chi, Z.-M. (2014). Antibacterial activity of the lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* M1 against multidrug-resistant *Vibrio* spp. Isolated from diseased marine animals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(1), 127-136. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5291-1>
- Ye, M., Huang, Y., Gurtler, J. B., Niemira, B. A., Sites, J. E., & Chen, H. (2013). Effects of pre- or post-processing storage conditions on high-hydrostatic pressure inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. vulnificus* in oysters. *International Journal of Food Microbiology*, *163*(2-3), 146-152. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.019>

- Yu, Y., Lee, C., Kim, J., & Hwang, S. (2005). Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(6), 670-679. <https://doi.org/10.1002/bit.20347>
- Yun, N. R., & Kim, D.-M. (2018). *Vibrio vulnificus* infection: A persistent threat to public health. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 33(6), 1070-1078. <https://doi.org/10.3904/kjim.2018.159>
- Zetti, Z. R., Norazlah, B., & Raha, A. R. (2009). A fatal case of *Vibrio vulnificus* cellulitis with septicaemia. *The Medical Journal of Malaysia*, 64(3), 246-247.
- Zhu, K., Chi, Z., Li, J., Zhang, F., Li, M., Yasoda, H. N., & Wu, L. (2006). The surface display of haemolysin from *Vibrio harveyi* on yeast cells and their potential applications as live vaccine in marine fish. *Vaccine*, 24(35-36), 6046-6052. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.043>

ANEXOS

ANEXO 1.

FOTOS DE PRUEBAS DE ANTAGONISMO MEDIANTE EL MÉTODO DE DISFUSIÓN EN POZO

CAJA PETRI CON Muller Hinton + 2%NaCl (Crecimiento del cultivo bacteriano A5 en PDB + 2% NaCl)

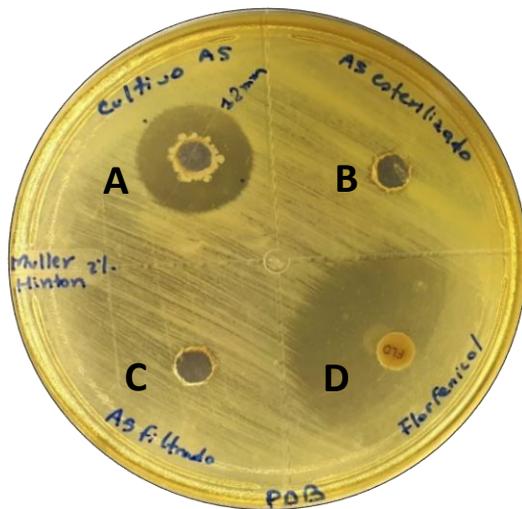


Foto 1.- Halos de inhibición.
A: Cultivo A5: 18mm.
B: Cultivo A5 centrifugado y filtrado: 0mm.
C: Cultivo A5 centrifugado, filtrado y esterilizado: 0mm.
D: Control: Florfenicol, 25mm.

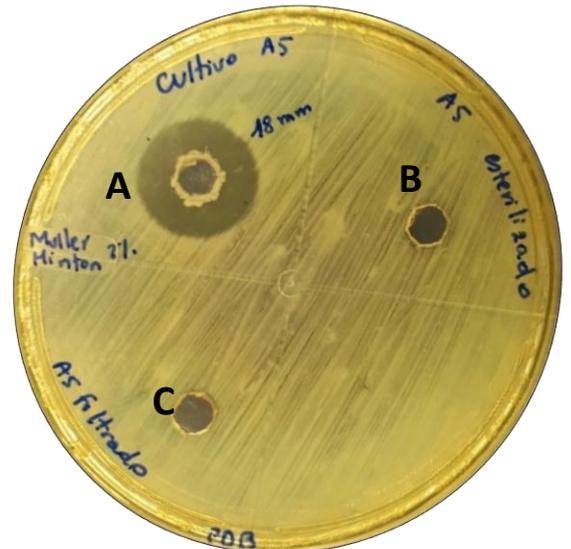


Foto 1.1.- Halos de inhibición.
A: Cultivo A5: 18mm.
B: Cultivo A5 centrifugado y filtrado: 0mm.
C: Cultivo A5 centrifugado, filtrado y esterilizado: 0mm.

CAJA PETRI CON Muller Hinton + 2%NaCl (Crecimiento del cultivo bacteriano A5 en TSB + 2% NaCl)



Foto 2.- Halos de inhibición.
A: Cultivo A5: 13mm.
B: Cultivo A5 centrifugado y filtrado: 0mm.
C: Cultivo A5 centrifugado, filtrado y esterilizado: 0mm.

CAJA PETRI CON TSA+ 2%NaCl (Crecimiento del cultivo bacteriano A5 en PDB + 2% NaCl)

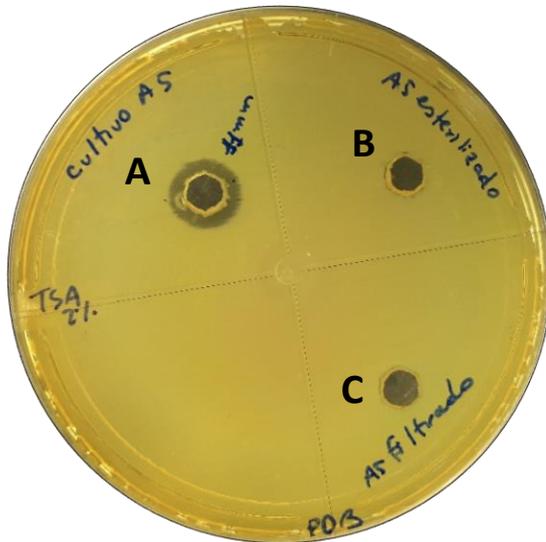


Foto 3.- Halos de inhibición.

A: Cultivo A5: 11mm.

B: Cultivo A5 centrifugado y filtrado: 0mm.

C: Cultivo A5 centrifugado, filtrado y esterilizado: 0mm.

CAJA PETRI CON TSA + 2%NaCl (Crecimiento del cultivo bacteriano A5 en TSB + 2% NaCl)

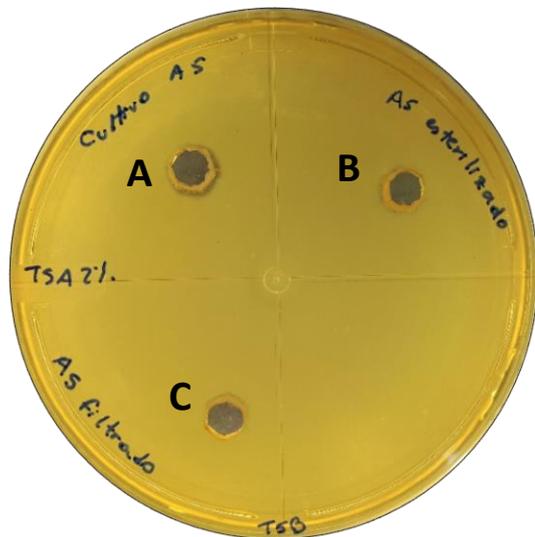


Foto 4. Halos de inhibición

A: Cultivo A5: 5mm.

B: Cultivo A5 centrifugado y filtrado: 0mm.

C: Cultivo A5 centrifugado, filtrado y esterilizado: 0mm.

PDA + 2%NaCl (Crecimiento del cultivo bacteriano A5 en PDB + 2% NaCl)

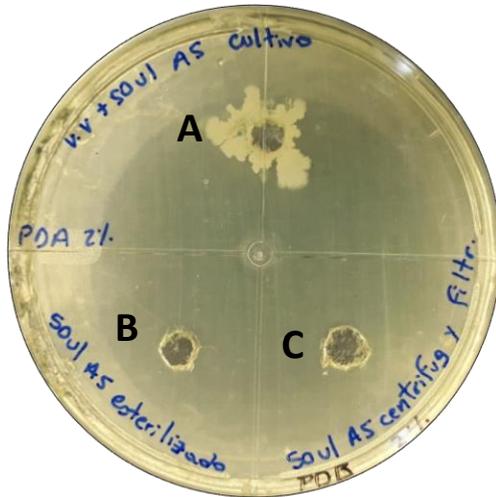


Foto 5.- No presenta halos de inhibición. No existe presencia de crecimiento del *V. vulnificus*.

ANEXO 2.

FOTOS DE ACTIVIDAD ANTAGONISTA MEDIANTE EL CO-CULTIVO DE A5 Y *V. VULNIFICUS*

CAJA PETRI CON MULLER HINTON + 2%NaCl (Biocontrol inducido del co-cultivo bacteriano A5 y *V. vulnificus* en LB + 2% NaCl)



Foto 6. No presenta halos de inhibición

CAJA PETRI CON MULLER HINTON + 2%NaCl (Biocontrol inducido del co-cultivo bacteriano A5 y *V. vulnificus* en TSB + 2% NaCl)



Foto 7. No presenta halos de inhibición

ANEXO 3.

FOTOS DE LA ACTIVIDAD VOLÁTIL ANTIBACTERIANA DE A5 CONTRA *V. VULNIFICUS*

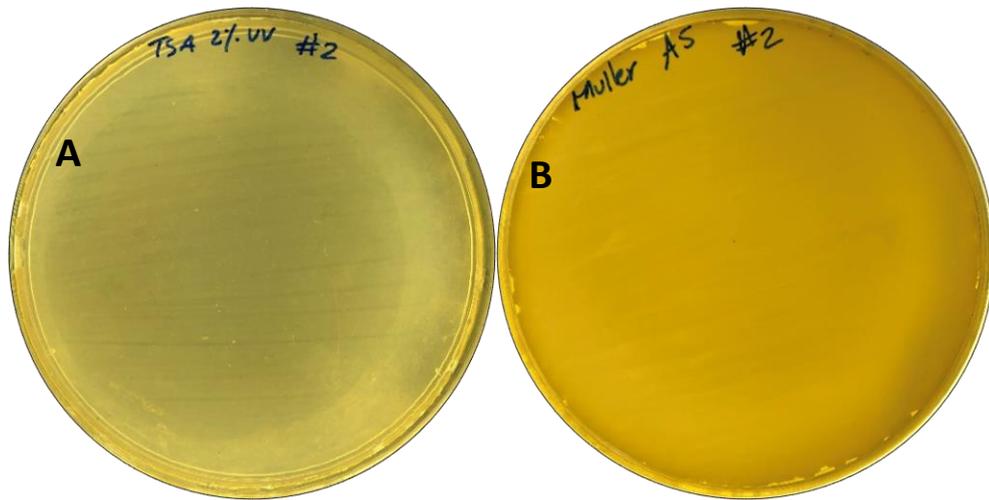


Foto 8. No presenta halos de inhibición

A: Crecimiento de *V. vulnificus* en placa Petri con TSA + 2% NaCl

B: Crecimiento de A5 en placas Petri con Muller Hinton

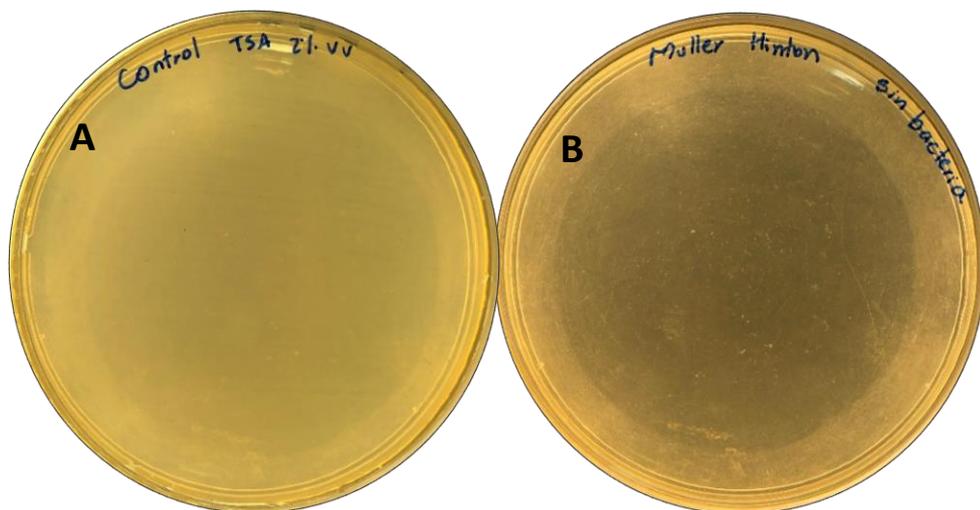


Foto 9. Ensayo Control

A: Crecimiento de *V. vulnificus* en placa Petri con TSA + 2% NaCl

B: Placa Petri con Muller Hinton sin bacteria.

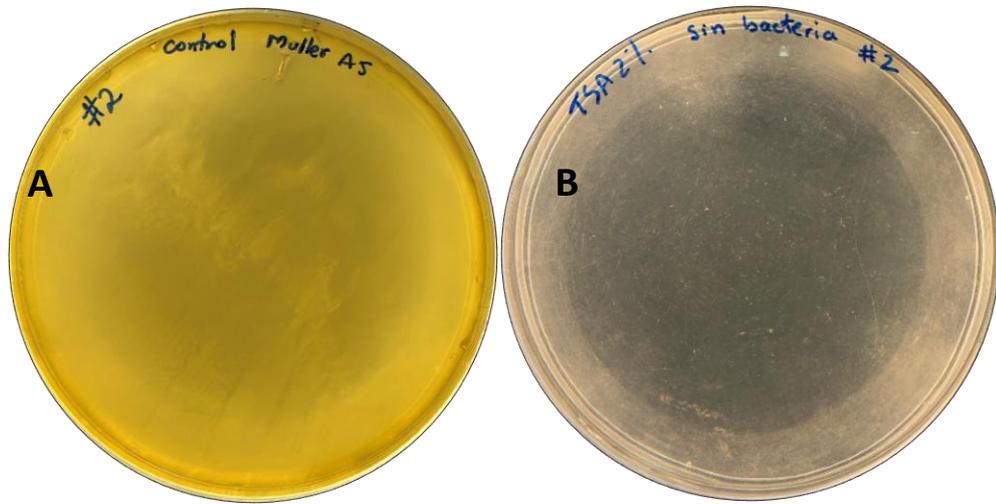


Foto 10. Ensayo Control

A: Crecimiento de A5 en placa Petri con Muller Hinton

B: Placa Petri con TSA + 2% NaCl sin bacteria.